



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDO DOS EFEITOS ESPECÍFICOS DOS ÍONS DA SÉRIE DE HOFMEISTER NA
INTERAÇÃO DE MOLÉCULAS UNITÁRIAS COM NANOPOROS INDIVIDUAIS
PROTÉICOS**

DIJANAH COTA MACHADO

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Adriana Fontes

Prof. Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov (*in memoriam*)

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues

RECIFE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDO DOS EFEITOS ESPECÍFICOS DOS ÍONS DA SÉRIE DE HOFMEISTER NA
INTERAÇÃO DE MOLÉCULAS UNITÁRIAS COM NANOPOROS INDIVIDUAIS
PROTÉICOS**

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas.**

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

Machado, Dijanah Cota

Estudo dos efeitos específicos dos íons da série de Hofmeister na interação de moléculas unitárias com nanoporos individuais protéicos / Dijanah Cota Machado. – Recife, 2014.

104 f.: il.

Orientador: Adriana Fontes, Claudio Gabriel Rodrigues

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2014. Inclui referências e anexos

1. Bioquímica 2. Estrutura molecular I. Fontes, Adriana (orient.) II. Rodrigues, Claudio Gabriel (coorient) III. Título.

572.33

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-415

DIJANAH COTA MACHADO

Estudo dos efeitos específicos dos íons da série de Hofmeister na interação de moléculas unitárias com nanoporos individuais proteicos

TESE APROVADA EM: 26 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Membros Titulares

Prof^a. Dr^a. Adriana Fontes

Departamento de Biofísica e Radiobiologia – UFPE

Prof^a. Dr^a. Rosa Amália Fireman Dutra

Departamento de Engenharia Biomédica – UFPE

Prof^a. Dr^a. Beate Saegesser Santos

Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPE

Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira

Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal - UFRPE

Dr. Laércio Pol Fachin

Departamento de Química Fundamental - UFPE

Dedico esta Tese ao Prof. Dr. Oleg Krasilnikov (*in memoriam*). Um homem ímpar, excelente professor e magnífico pesquisador que tive a enorme satisfação de conviver cientificamente ao longo de quase sete anos. Seu profissionalismo, competência e seriedade foram essenciais para o meu aperfeiçoamento pessoal, acadêmico e profissional. Saudades eternas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela graça da vida.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Adriana Fontes, por todo o apoio, compreensão e orientação.

Ao Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues, agradeço enormemente pelas valiosas contribuições, fundamentais para esta tese, e por toda paciência, tempo e atenção dedicados.

À minha família, meus pais e meus irmãos, pelo incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.

A todos os amigos do Laboratório de Biofísica de Membranas e Células-Tronco – Dr. Oleg Krasilnikov: Janilson, Juliana, Nina, Sheila, Gisely, Layse, Arthur que me ajudaram direta ou indiretamente na execução dos experimentos.

Às minhas amigas, Darlene e Lizandra, pela grande amizade e companheirismo.

Ao meu companheiro, Danilo, sua ajuda, paciência e apoio foram essenciais para que eu tivesse tranquilidade para realizar o doutorado.

Ao seu Fredson, sempre disponível para nos dar um “help” e alegrando os nossos dias com as suas sabedorias de vida.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio sempre que solicitada.

À Adenilda pela disponibilidade em auxiliar na resolução de pendências burocráticas no decorrer desta tarefa.

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

A todas as pessoas e amigos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização e conclusão desse trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A interação de moléculas unitárias com nanoporos individuais é relevante em diversos processos biológicos, químicos e físicos, uma vez que pode proporcionar o desenvolvimento de dispositivos analíticos, dentre os quais, podemos destacar: sensores, biossensores, espectrômetros de massa e sequenciadores moleculares. Nesse contexto, o nanoporo formado pela α -hemolisina (α -HL) de *Staphylococcus aureus* é de especial interesse no desenvolvimento de dispositivos sensores devido às suas características estruturais e funcionais. Várias estratégias são utilizadas para melhorar a sua capacidade de detecção pelo uso de adaptadores moleculares ou pela modificação química do nanoporo. O diferencial deste trabalho deve-se a modificação das condições físico-químicas da solução banhante do elemento de reconhecimento molecular ou seja, o nanoporo unitário. Os íons em meio aquoso podem causar efeitos específicos conhecidos como efeitos de Hofmeister. De acordo com a sua atuação na estrutura da água, os íons podem ser classificados como cosmotrópicos ou caotrópicos. A mudança da estrutura da água por sua vez é capaz de influenciar na solubilidade e estrutura dos co-solutos. Igualmente a composição iônica da solução pode alterar a interação das moléculas solubilizadas. Deste modo neste estudo investigamos os efeitos específicos induzidos pelos cátions e ânions da Série de Hofmeister na interação de moléculas unitárias orgânicas com nanoporos proteicos individuais. A confecção da bicamada lipídica plana e a inserção do nanoporo unitário na membrana, bem como os registros de correntes iônicas através dos poros foram obtidos em condições de fixação de voltagem. Na solução banhante do nanoporo utilizou-se os ânions da família VIIA, formando sais com o K^+ , ou, os cátions da família IA e o íon amônio, formando sais com o Cl^- , todos na concentração de 4M. A interação da molécula unitária (analito) com o nanoporo causa um bloqueio característico na corrente iônica que passa através dele. A análise desses eventos permite determinar as constantes cinéticas da interação analito-nanoporo. Avaliando a influência do íon amônio e dos íons da família IA e VIIA na interação do analito (polietilenoglicol 1294; PEG 1294) com o nanoporo observamos que esta é muito dependente do tipo do sal. Todos os íons utilizados nesse trabalho induziram efeitos específicos em sistema confinado. Com relação à influência na constante de associação, todos os ânions seguiram a típica série de Hofmeister: $F^- > Cl^- > Br^- > I^-$. Já para a constante de dissociação e a solubilidade do PEG, encontramos uma sequência de Hofmeister inversa: $F^- < Cl^- < Br^- < I^-$. Ao contrário do observado com os ânions, a influência dos cátions sobre as constantes de interação não seguiu a série de Hofmeister. Para a constante de associação, obtivemos a seguinte sequência: $Cs^+ > K^+ \geq Rb^+ > Na^+ > NH_4^+ > Li^+$. Para a constante de dissociação obtivemos: $K^+ < Rb^+ < Cs^+ < Na^+ < NH_4^+ < Li^+$. Uma forte correlação entre as mudanças das constantes cinéticas e a solubilidade do PEG também foi estabelecida. Demonstramos que o efeito salting-out é o responsável por mudanças estabelecidas na interação do analito com o nanoporo. Adicionalmente as constantes de interação PEG/nanoporo são dependentes do potencial transmembrana indicando que o polímero não iônico (PEG) atua como uma molécula com carga elétrica em meio aquoso iônico. Estabelecemos também que a sensibilidade do sensor ao PEG depende fortemente do tipo de íon presente na solução banhante do nanoporo.

Palavras-chaves: Nanoporo; Sensores estocásticos; Efeitos de Hofmeister; Salting-out.

ABSTRACT

The interaction of single molecules with single nanopores is important in several biological, chemical and physical processes because it can provide the development of analytical devices, such as sensors, biosensors, mass spectrometers and molecular sequencers. In this context, the nanopore formed by α -hemolysin (α -HL) of *Staphylococcus aureus* is very studied for the development of sensor devices due to their structural and functional characteristics. Several strategies are adopted to improve its detection ability, such as the use of molecular adapters and chemical modification of the nanopore. In this work, our approach is different, we modify the ionic composition of the bath solution of the nanopore protein. Ions in aqueous environment can cause specific effects known as Hofmeister effects. According to their influence on the structure of water, the ions can be classified as kosmotropic and chaotropic. The change in the structure of water in turn can influence the structure and solubility of the co-solutes. Then the ionic composition of the solution may change the interaction of solubilized molecules. The goal of this study was to investigate the specific effects induced by cations and anions from Hofmeister series on the interaction of single molecules with nanopores. The preparation of planar lipid bilayer, and single nanopore insertion into membrane, and records of ionic currents were conducted in conditions of voltage clamp. In the bath solution, we use the anions from group VIIA, forming salts with K^+ , and cations from group IA plus ammonium ion, forming salts with Cl^- at 4M concentration. The interaction of the analyte with the nanopore causes a blocking characteristic in ionic current through the pore protein. The analysis of these molecular events permit to determine the kinetic constants of the analyte-nanopore interaction. The influence of the anions and cations here investigated in interaction of the analyte (polyethylene glycol 1294, PEG 1294) with the nanopore is very dependent on the type of salt. All ions used in this study induced specific effects in confined spaces. With regard to the influence on the on-rate constant, all anions followed the typical Hofmeister series: $F^- > Cl^- > Br^- > I^-$. For the off-rate constant and solubility of PEG, we found an inverse Hofmeister sequence: $F^- < Cl^- < Br^- < I^-$. However, the influence of the cations on the rate constants didn't follow the Hofmeister series. For the on-rate constant, we obtained the following sequence: $Cs^+ > K^+ \geq Rb^+ > Na^+ > NH_4^+ > Li^+$. For the off-rate constant, we obtained : $K^+ < Rb^+ < Cs^+ < Na^+ < NH_4^+ < Li^+$. Strong correlation between the changes of the rate constants and the PEG solubility was established. We suggest that the salting-out effect is responsible for the changes on the interaction analyte/ nanopore. Additionally, we found that the rate constants are dependent on voltage transmembrane indicating that the non-ionic polymer (PEG) acts as a molecule with electric charge in an aqueous environment. We also established that the sensitivity of the nanopore it was strongly dependent on the type of ion present in the bath solution. So, the choice of the optimal electrolyte is an important step to stochastic sensors based on a single nanopore.

Keywords: Single nanopore; Hofmeister series; Specific ions effects; Salting-out.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

	Pág.
FIGURA 1: Modelo de hidratação de íons. (a) Modelo convencional de hidratação de ânions e cátions. (b) Orientações da molécula de água reveladas pela técnica de difração de nêutrons. Na camada de hidratação, o ânion cloreto coordena-se com a água através do átomo de hidrogênio de modo que a ligação H-O...Cl ⁻ é quase linear (linha tracejada), enquanto que para o cátion níquel a molécula de água orienta-se com o cátion por meio do átomo de oxigênio voltado para o íon (linha tracejada). Adaptada de BALL, 2008.....	21
FIGURA 2: Sequência de alguns íons da Série de Hofmeister. Os íons podem ser classificados de acordo com sua capacidade de hidratação em cosmotrópico (fortemente hidratado) ou caotrópico (fracamente hidratado). Adaptado de YANG, 2009.....	22
FIGURA 3: Íon e camada de hidratação. Representação esquemática da estruturação das moléculas de água ao redor de um ânion cosmotrópico. A circunferência tracejada indica a organização da segunda camada de hidratação. Adaptado de ZHANG & CREMER, 2006.....	23
FIGURA 4: Efeitos específicos dos íons. Sequência dos ânions da Série de Hofmeister e exemplos de alguns efeitos específicos promovidos por cosmotrópicos e caotrópicos. Adaptado de ZHANG & CREMER, 2006.....	26
FIGURA 5: Representação esquemática da teoria da <i>Lei de Coincidência de Afinidades pela Água</i> . O tamanho do íon controla a tendência de íons de cargas opostas formarem esferas internas de pares iônicos. (A) Íons pequenos de sinais opostos formam esferas internas de pares iônicos em meio aquoso espontaneamente; (B) Íons grandes de sinais opostos formam esferas internas de pares iônicos em meio aquoso espontaneamente; (C) íons de tamanhos diferentes e com sinais opostos não formam espontaneamente esferas internas de pares iônicos em meio aquoso. Adaptado de COLLINS, 2004.....	27
FIGURA 6: A energia de hidratação dos sais de Hofmeister. (A) Relação da entalpia da solução de sais (em diluição infinita) com a diferença entre as energias de hidratação absoluta dos ânions e cátions constituintes de cada sal. (B) Identificação dos íons como caotrópicos ou cosmotrópicos. Figura adaptada de COLLINS et al., 2007.....	29
FIGURA 7: Esquema geral dos componentes de um biossensor. Adaptado de VELUSAMY et al., 2010.....	31
FIGURA 8: Modelo do nanoporo formado pela α -HL inserido em bicamada lipídica e suas dimensões. Adaptado de GU & SHIM, 2010.....	33
FIGURA 9: Exemplos de nanoporos de α -HL de <i>Staphylococcus aureus</i> engenheirados: (A) poro geneticamente engenheirado, com um anel de 14 resíduos de arginina localizado próximo à região mais estreita do lúmen do poro; (B) poro contendo uma cadeia polimérica (PEG) fixada covalentemente no interior do nanoporo; (C) poro contendo um adaptador molecular (ciclodextrina) dentro do lúmen. Retirado de BAYLEY & JAYASINGHE, 2004.....	34
FIGURA 10: Esquema ilustrando o princípio do contador Coulter. (A) Setup experimental do contador que é composto por duas câmaras preenchidas com soluções eletrolíticas que estão conectadas por meio de um microcanal, dois eletrodos e um potenciostato são usados para estabelecer um potencial. (B) O potencial aplicado que gera uma corrente iônica que flui através do orifício equivalente a uma resistência constante da solução. (C) Quando partículas micrométricas ou células são adicionadas em um das câmaras, a passagem	

dessas pelo orifício causa um bloqueio do microcanal e causa alterações na resistência da solução. O contador detecta essas mudanças na resistência elétrica. Adaptado de HOWORKA & SIWY, 2009..... 35

FIGURA 11: Esquema do diagrama experimental. (A) Câmara experimental que consiste de duas hemicâmaras, *cis* e *trans*, separadas por uma película de Teflon[®] que possui um orifício para a formação da bicamada lipídica plana. (B) Ilustração da bicamada e da inserção do nanoporo protéico de α -HL. Uma voltagem é aplicada através dos eletrodos via um circuito externo, e a corrente iônica que flui pelo nanoporo é monitorada. A aplicação do potencial transmembrana é controlada pelo amplificador de fixação de voltagem. (C) Esquema do circuito elétrico equivalente para a parte iônica do sistema. R_s , R_p e C representam a resistência da solução, a resistência do poro e a capacitância da bicamada lipídica onde o nanoporo está inserido, respectivamente. Os eventos, em escala molecular, que ocorrem no poro correspondem a mudanças temporárias no valor de R_p . Adaptado de LEMAY, 2009 e MOHAMMAD & MOVILEANU, 2012..... 36

FIGURA 12: Esquema da interação da molécula do analito com o nanoporo protéico inserido em uma bicamada lipídica plana. (A) Ligação reversível de diferentes analitos (representados por bolas verdes e vermelhas) a um receptor engenheirado no nanoporo protéico. (B) Série temporal dos bloqueios da corrente gerados pela entrada da molécula unitária no lúmen do nanoporo. A análise das amplitudes e durações (tempo de residência) dos bloqueios permite a identificação dos analitos e a análise da frequência dos bloqueios permite quantificá-los. Adaptado de GU & SHIM, 2010..... 37

FIGURA 13: Detecção estocástica simultânea de íons metálicos divalentes. (A) O nanoporo mutante (engenheirado) possui um sítio de ligação que é ocupado de maneira mutuamente exclusiva pelos íons divalentes adicionados no lado *trans* da bicamada. (B) Registros de bloqueios da corrente iônica induzidos pelos íons Zn^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} (voltagem aplicada: +40 mV). (C) Registros de corrente na presença de Zn^{+2} e Co^{+2} simultaneamente (em + 40 mV), a concentração de Co^{+2} é de aproximadamente 4.6 μ M enquanto que a de Zn^{+2} varia de 0 a 231 nM. Adaptado de BRAHA et al., 2000..... 38

FIGURA 14: Detecção estocástica de enantiômeros do fármaco ibuprofeno. Registros dos bloqueios da corrente iônica característicos (A) do enantiômero (*S*)-ibuprofeno; (B) do enantiômero (*R*)-ibuprofeno; e (C) registro de ambas as moléculas simultaneamente, com seus respectivos histogramas de amplitude de corrente ao lado. Voltagem aplicada: -80 mV. Adaptado de KANG et al., 2006..... 39

FIGURA 15: Aplicação do nanoporo na neuroquímica: detecção de seis neurotransmissores utilizando um nanoporo de α -HL modificado (inserção de um íon cobre (II) no lúmen do poro). (A) Registros dos bloqueios característicos da corrente para cada neurotransmissor. 1: glutamato; 2: dopamina; 3: norepinefrina; 4: epinefrina; 5: ATP; 6: ADP. Voltagem aplicada: -50 mV. Adaptado de BOERSMA et al., 2012..... 40

FIGURA 16: O nanoporo de α -HL como espectrômetro de massas. A distribuição de massa obtida com nanoporo unitário formado pela α -HL (figura superior) comparada com o convencional espectro de massas MALDI-TOF (parte inferior da figura) para o PEG polidisperso ($M_r=1.500$ g/mol). Maiores valores de I/I_{open} correspondem a massas inferiores de PEG. Adaptado de ROBERTSON et al. 2007..... 41

FIGURA 17: Representação esquemática do sequenciamento do DNA com nanoporo. (A) Translocação da fita simples de DNA através do nanoporo protéico. (B) Registro da corrente iônica residual referente à passagem do DNA pelo nanoporo. A redução da corrente provocada pela passagem dos nucleotídeos individuais através do nanoporo é dependente do tipo de base nitrogenada do nucleotídeo. Imagens adaptadas de VENKATESAN & BASHIR, 2011 e BASHIR, 2013..... 42

LISTA DE FIGURAS DOS ARTIGOS

Capítulo 1: Hofmeister Effect in Confined Spaces: Halogen Ions and Single Molecule Detection

	Pág.
FIGURE 1: The correlation between the ionic conductivity of halogens and the α HL channel conductance (extrapolated to zero voltage) in 4 M halide solutions. Values of α HL channel conductance at zero voltage were obtained by fitting the experimental data points of G/V curves (obtained in the range of 5200 mV) with second-order polynomial function. (Data points) Means from at least three separate experiments 5 SD. (Line) First-order regression fit of the data. The correlation coefficient is shown in the figure.....	56
FIGURE 2: Effect of trans-side addition of PEG1294 to membrane-bathing solutions on channel conductance. (A) 4 M KCl; (B) 4 M KBr. The result of at least three independent experiments (mean $\pm$ SE) is presented in each case.....	57
FIGURE 3: Typical traces of the ion current through single α HL channels in the presence of PEG1294 in the bath solution at a time resolution of 0.1 ms. (Arrows) Voltage shift from zero to 40 mV. Halide concentration was 4 M. Concentration of PEG was 400 mM (for A–C) and 10 nM (for panel D). Note the change in the timescale and PEG concentration from panels A–D. The respective all-point histograms are shown at the right of each record and used to give the mean value of blockage amplitudes. The effectiveness of such inhibition was very similar for all halides and comprised 73–80% of the maximal current.....	57
FIGURE 4: Specific ionic effect on the PEG1294/ α HL pore interaction. The average on-rate (solid line), off-rate (dashed line) (A), and PEG/ α HL pore complex formation constant (B) in 4 M solutions of different halides. (Data points) Means ($\pm$ SD) of at least three single protein nanopores reconstituted in separate experiments with >5000 events as in Fig. 3.(Lines) Guide for the eye. The data presented in panel A were used to build the dependence shown in panel B.....	58
FIGURE 5: Solubility of PEG in 4M halide solutions. (A) PEG solubility as a function of different molar fractions of KF, KBr, and KI in KCl solution. (Inset) The zone of the anomalous molar fraction effect for KI/KCl mixtures visualized at higher resolution. (B) Solubility of PEG at 1:1 (M/M) KX/KCl ratio, where X represents F ⁻ , Br ⁻ , or I ⁻ . (Lines) Guide for the eye. Total salt concentration was 4 M. (Data points) Means of 5–8 separate experiments $\pm$ SD.....	58
FIGURE 6: The on-rate (A) and off-rate (B) constants of PEG/ α HL channel interaction as a function of PEG solubility. (Data points) Means of 5–8 separate experiments $\pm$ SD for solubility and at least three separate experiments for the rate constants. (Lines) First-order regression fits of the data. The correlation coefficient is shown in the figure.....	59
FIGURE 7: Transition rate and PEG concentration. The concentration of PEG1294 as a function of the transition rate in different halide solutions. (Lines) First-order regression fits of the data with a slope of 0.97 ± 0.06 . (Data points) Means of at least three separate experiments. Standard deviations were omitted for clarity. (Horizontal arrows) Background equivalent PEG concentration at an event frequency of 1 Hz. (Inset) The background equivalent PEG concentration at different halide solutions. The number shown in the figure is the difference in values obtained in KI and KF solutions.....	59
FIGURE 8: Rate constants of PEG/ α HL channel interactions in halide solutions as function of hydration enthalpy of anions. Enthalpy values were taken from Marcus. The correlation coefficient is shown in the figure.....	60

Capítulo 2: Effects of alkali and ammonium ions in the detection of poly(ethyleneglycol) by alpha-hemolysin nanopore sensor

Pág.

FIGURE 1: Voltage-dependent conductance (G–V curve) of α HL nanopore (a) and the asymmetry factor (I_+/I_-) (b) measured using 4 M solution of Li^+ (black squares), Na^+ (pink circles), K^+ (blue triangles), Rb^+ (gray squares), Cs^+ (green triangles) and NH_4^+ (red circles) chloride. Activity coefficient of alkali- and ammonium chlorides as a function of its concentration (c) and asymmetry of G–V curves (d). Values of the activity coefficients were taken from the literature. Dashed line is a first-order regression for the data. Correlation coefficient is shown in figure. Lines were drawn to guide the eye. First-order regression was used to fit the data and the standard deviations were omitted for clarity.

65

FIGURE 2: Effect of *trans*-side addition of PEG1294 to membrane-bathing solutions on nanopore conductance. PEG concentrations and type of salt are shown in figure. The result of at least three independent experiments (mean $\pm$ SE) is presented in each case.....

66

FIGURE 3: Typical traces of the ion current through single α HL channels in the presence of PEG1294 in the bath solution at a time resolution of 0.1 ms. (Arrows) Voltage shift from zero to 40 mV. Alkali- or ammonium chloride concentration was 4 M. Type of the electrolyte is shown in figure. The concentration of PEG was 400 μM . It can be seen that only in panel (a) the timescale changes in relation to the panels (b)–(f). The respective all-point histograms are shown at the right of each record and were used to give the mean value of blockage amplitudes.....

67

FIGURE 4: Voltage dependence and specific ionic effect of alkali- and ammonium chlorides on the PEG/ α HL pore interaction. The average on-rate (a), off-rate (b), and PEG/ α HL pore complex formation constant (c) are shown as a function of transmembrane voltage at different alkali- and ammonium chloride. The minimal values of k_{off} are at 40 ± 10 mV. The data presented in (a) and (b) were used to build the dependence presented in (c). Transition rate and PEG concentration (d), the slope of the transition rate/PEG increases linearly and depends strongly on the salt type. Sensitiveness of α HL nanopore is dependent significantly on the cation type, the slope values are: 0.02 ± 0.01 (LiCl); 0.21 ± 0.01 (NH₄Cl); 0.52 ± 0.01 (NaCl); 1.12 ± 0.04 (RbCl); 1.62 ± 0.02 (KCl); 2.02 ± 0.02 (CsCl). (Inset in d) Detection limit of PEG with α HL nanopore is dependent significantly on the cation type. The arrows indicate the lowest (CsCl: 0.52 ± 0.12 mM) and the highest (110.2 ± 5.2 mM) background equivalent PEG concentration at an event frequency of 1 Hz. The highest sensitivity was established for CsCl solution and the lowest for LiCl. First-order regression fitted well for the data with a slope of 1.01 ± 0.08 and the correlation coefficient is 0.99 ± 0.01 . Li^+ (black square), Na^+ (pink circles), K^+ (blue triangles), Rb^+ (gray squares), Cs^+ (green triangles) and NH_4^+ (red circles) chloride.....

68

FIGURE 5: Solubility of PEG at 1:1 (M/M) XCl/KCl ratio, where X represents Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , Cs^+ or Rb^+ (a) dependence of the on-rate (b) and off-rate (c) constants of PEG/ α HL nanopore interaction on solubility of PEG. The rate constant values were obtained at 40 mV of transmembrane potential. Total salt concentration was 4 M. (Data points) Means of 6–11 separate experiments $\pm$ SD. Correlation coefficient is shown in figure.....

69

FIGURE 6: Dependence of associated (a) and dissociated (b) rate constants at the difference between the absolute heats of hydration anion and cation ($E_{\text{Cl}} - E_{\text{Me}}$). Values of the absolute energy of hydration were obtained from literature.....

70

Capítulo 3: Cloud point measurements and molecular dynamics simulations: influence of the halogen ions on the poly(ethyleneglycol) solubility

	Pág.
FIGURE 1: Photography of the cloud point technique. The cloud point formation of PEG 1500 in 4 M KCl solution. In tube 1, the solution is translucent (there is not cloud point). In tube 2, it is occurring cloud point. We can observe turbidity in the solution, which it is indicated of droplets of polymer emulsions.....	76
FIGURE 2: PEG solubility at 1:1 (M/M) KX/KCl ratio, where X represents F ⁻ , Br ⁻ or I ⁻ 4 M halide solutions. Total salt concentration was 4 M. Means of 5-8 separate experiments ± SD. Lines were drawn to guide the eye.....	77
FIGURE 3: (A) Dependence of PEG solubility on the ionic radius. (B) Dependence of PEG solubility on the lyotropic number. Values of the ionic radius and lyotropic number were taken from Marcus (1997) and Kunz et al. (2004), respectively.....	78
FIGURE 4: (A) Radial distribution function g(r) of the water molecules in the shells solvation centered on oxygen of the hydroxyl terminal of the PEG (atom O1) in presence of iodide (red profile) and fluoride (black profile). (B) Frame of the PEG oxygen terminal (O1) and water molecules. Simulations were performed in triplicate.....	79

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

	Pág.
TABELA 1: Valores dos coeficientes B de viscosidade Jones-Dole (B) e dos ADHN (números de hidratação dinâmica aparente) para diversos cátions e ânions. Fonte: tabela adaptada de COLLINS, 2006.....	25

LISTA DE TABELAS DOS ARTIGOS

Capítulo 3: Cloud point measurements and molecular dynamics simulations: influence of the halogen ions on the poly(ethyleneglycol) solubility

	Pág.
TABLE 1: Parameters: Energy of interaction WATER-PEG, surface area solvent accessible and radius of gyrations of PEG. The surface area solvent accessible was calculated with the popular molecular graphics program PyMOL, using the most stable conformations of PEG after 50ns simulation for each system. Simulations were performed in triplicate.....	80

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°	Grau
°C	Grau Celsius
®	Marca registrada
ΔH	Variação de entalpia
τ	tau
Å	Ångström
α -HL	Alfa-hemolisina (do inglês <i>alpha-hemolysin</i>)
ADHN	Número de hidratação dinâmica aparente (do inglês <i>apparent dynamics hydration numbers</i>)
Ag	Prata
AgCl	Cloreto de prata
Br ⁻	Íon brometo
C	Concentração
Cl ⁻	Íon cloreto
Cs ⁺	Íon céσιο
CsCl	Cloreto de céσιο
DLVO	Teoria Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPhPC	Diftanoilglicerofosfocolina (do inglês <i>1,2-diphytanoil-sn-glicero-3-phosphocholine</i>)
Eq	Equação
F ⁻	Íon fluoreto
f	Frequência
I ⁻	Íon iodeto
K ⁺	Íon potássio
kDa	kiloDalton
KBr	Brometo de potássio
KCl	Cloreto de potássio
KI	Iodeto de potássio
KF	Fluoreto de potássio
Li ⁺	Íon lítio
LiCl	Cloreto de lítio

ms	Milissegundos
mV	Milivolts
μm	Micrômetro
M	Molar
mM	Milimolar
μM	Micromolar
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
Na ⁺	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NH ₄ ⁺	Íon amônio
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
pA	picoampère
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
Rb ⁺	Íon rubídio
RbCl	Cloreto de rubídio
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
ssDNA	Fita simples do ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>single-stranded deoxyribonucleic acid</i>)
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Água.....	19
2.2 Íons.....	20
2.3 Série de Hofmeister.....	21
2.4 Efeitos específicos dos íons.....	25
2.4.1 Influência dos sais em sistemas confinados.....	29
2.5 Biossensor.....	30
2.6 Nanoporo da alfa-hemolisina como elemento sensor.....	32
2.7 Sensor estocástico.....	34
2.7.1 Aplicações.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
3. OBJETIVOS.....	53
CAPÍTULO 1: Hofmeister Effect in Confined Spaces: Halogen Ions and Single Molecule Detection.....	54
CAPÍTULO 2: Effects of alkali and ammonium ions in the detection of poly(ethyleneglycol) by alpha-hemolysin nanopore sensor.....	62
CAPÍTULO 3: Cloud point measurements and molecular dynamics simulations: influence of the halogen ions on the poly(ethyleneglycol) solubility.....	72
4. CONCLUSÕES.....	85
ANEXOS.....	86
Anexo A: Metodologia.....	86
Anexo B: Depósito de patente.....	91
Anexo C: Resumos apresentados em congressos nacionais.....	101

1. INTRODUÇÃO

Os biossensores são dispositivos analíticos, que possuem como elemento sensor um componente biológico em contato direto com o elemento de transdução, que detectam rapidamente analitos químicos e/ou biológicos qualitativa e quantitativamente (SHELLER et al., 2001). Possuem grande importância devido a sua capacidade de resolver um número potencialmente grande de problemas analíticos e desafios em áreas diversas como defesa, agricultura e segurança alimentar, monitoramento ambiental, medicina, farmacologia, indústria, entre outros (KIRSCH et al., 2013). Assim sendo, o desenvolvimento de novos sensores e biossensores desperta interesse na comunidade científica.

O biossensor baseado no nanoporo proteico unitário, formado pela alfa-hemolisina (α -HL) de *Staphylococcus aureus*, vem desenvolvendo-se nos últimos anos como versátil detector de molécula unitária. O princípio do sensoriamento é baseado no transporte das moléculas individuais através do nanoporo gerando decréscimos (bloqueios) detectáveis da corrente iônica do poro permitindo a sua identificação e quantificação. O nanoporo sensor é talvez a mais recente técnica de detecção de molécula unitária desenvolvida até o momento, oferece uma plataforma de detecção altamente sensível, rápida e multifuncional. Em menos de duas décadas, pesquisas nesta área permitiram uma gama de estudos sobre biomoléculas pequenas, ácidos nucleicos e proteínas (WANUNU, 2012). O melhoramento da capacidade de detecção, ou seja, o aumento da sensibilidade do nanoporo é essencial.

Muitos grupos investigam métodos para melhorias na capacidade de detecção por meio do uso de adaptadores moleculares ou pela modificação química do nanoporo. Neste trabalho, a nossa abordagem é diferente, uma vez que não modificaremos o nanoporo e sim a composição iônica da solução que banha o sistema nanoporo-sensor. Estudos anteriores (RODRIGUES et al., 2008; GURNEV et al., 2009) mostraram que a composição iônica da solução banhante do sensor nanoscópico pode alterar a energia de interação do complexo analito-nanoporo, e desse modo, modifica-se a sensibilidade do nanoporo.

Os íons promovem efeitos específicos em diversos sistemas devido à capacidade que possuem de ordenar menos ou mais moléculas de água ao seu redor. Assim, pode-se classificar o íon em caotrópico (fracamente hidratado) ou cosmotrópico (fortemente hidratado) dependendo da quantidade de moléculas de água que se ordenam ao redor do

íon. Os efeitos específicos induzidos por íons em diversas condições são conhecidos como os efeitos de Hofmeister. Apesar dos inúmeros estudos desde o seu primeiro relato (HOFMEISTER, 1888), não é elucidado como esse fenômeno apresenta-se em sistemas confinados. Portanto, neste trabalho investigamos os efeitos específicos induzidos pelos cátions e ânions da Série de Hofmeister na interação de moléculas unitárias orgânicas com nanoporos individuais protéicos visando o entendimento dos mecanismos moleculares do processo, bem como estabelecer as condições ótimas para utilização dos nanoporos como sensores estocásticos para diversas moléculas orgânicas.

Este trabalho está dividido em três seções (revisão da literatura, objetivos e conclusões) e três capítulos (artigos e manuscrito). A seção *revisão da literatura* tem o intuito de introduzir conceitos básicos, porém, contextualizados sistematicamente para a fundamentação e entendimento da temática abordada nesse trabalho. Na seção *objetivos*, são apresentadas as proposições dos objetivos atingidos com o desenvolvimento da tese. Em seguida, são apresentados dois artigos e um manuscrito, nos capítulos 1, 2 e 3, respectivamente. O Capítulo 1 trata do estudo da influência dos ânions halogênios, formando sais com o íon potássio, na formação do complexo polietilenoglicol-nanoporo visando o entendimento dos efeitos específicos desses íons em sistemas confinados. No Capítulo 2, investigamos os efeitos específicos induzidos pelos cátions da família 1A e o íon amônio, formando sais com o íon cloreto, nos parâmetros cinéticos, constantes de interação do complexo polietilenoglicol-nanoporo e na sensibilidade do sensor. No Capítulo 3, investigamos a influência dos íons halogênios na solubilidade do polietilenoglicol (PEG) experimental e teoricamente. Por fim, na seção *conclusões* expomos as deduções e considerações finais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Água

A água tem importância vital para os seres vivos, está presente em 70% ou mais da massa dos organismos vivos, sendo essencial para a estrutura, estabilidade, dinâmica e função das mais diversas macromoléculas biológicas (LEVY & ONUCHIC, 2006; LEHNINGER, 2011).

A molécula da água tem uma estrutura química simples, composta por dois átomos de hidrogênio ligados covalentemente a um átomo de oxigênio. Cada átomo de hidrogênio compartilha um par de elétrons com o átomo de oxigênio (LEHNINGER, 2011). Este compartilhamento é desigual o que resulta em uma distribuição assimétrica dos elétrons sobre a estrutura da água dotando esta molécula de um forte caráter dipolar.

Por meio de análises de absorção no infravermelho, foram estimadas que as ligações interatômicas na molécula de água formam um ângulo de 104.5°(NORDLUND, 2011), assim a molécula da água assume uma conformação semelhante a um tetraedro com os dois átomos de hidrogênios e os elétrons não compartilhados ocupando os cantos do tetraedro (HARPER, 2003).

Apesar da simplicidade estrutural, a água possui algumas propriedades incomuns, resultante da sua capacidade em formar ligações de hidrogênio entre as suas moléculas. Uma dessas propriedades peculiares é a sua densidade máxima a 4 °C (POOLE et al., 1994). A ligação de hidrogênio é reconhecida como a principal força intermolecular determinante dos padrões espaciais e dinâmicos da água, contudo a natureza da água pode depender também da competição entre forças de van der Waals e ligações de hidrogênio (LIN et al., 2009). Estudos indicam que forças de van der Waals podem estar envolvidas na densidade da água, modulando fortemente a flexibilidade da rede de ligações de hidrogênio dando origem à máxima densidade na água líquida e fazendo com que o gelo seja menos denso do que a água no estado líquido (WANG et al., 2011).

Por ser um forte dipolo e possuir alta constante dielétrica (78.5 a 25 °C), a água é um excelente solvente para íons (HARPER, 2003). De fato, quanto maior a constante dielétrica de um solvente maior será seu poder de solvatação. A alta constante dielétrica da água blindar o potencial coulômbico dos íons evitando a agregação e cristalização de íons de cargas opostas. Da mesma maneira, a água é um eficiente solvente para

polieletrólitos, como proteínas e ácidos nucleicos, também pela blindagem das cargas presentes nas estruturas de tais biomoléculas (BALL, 2008).

2.2 Íons

Íons são ubíquos na natureza e possuem papel importante em diversos sistemas e processos (por exemplo: químico, bioquímico, fisiológico, tecnológico, entre outros). Em condições normais, íons isolados não são encontrados como entidades livres, eles tendem a agregar-se formando sais iônicos eletroneutros (ou, em casos especiais, líquidos iônicos) devido à natureza e à grande magnitude das interações eletrostáticas. Entretanto, a situação é diferente em solventes polares, principalmente a água, que são capazes de dissolver os íons, isto é, de estabilizá-los como entidades dissociadas, pelo menos até certa concentração correspondente à saturação. Esta estabilização tem a sua origem nas interações eletrostáticas entre os íons isolados e os dipolos da água, ou seja, nas forças de solvatação específicas (HÜNENBERGER & REIF, 2011).

Caso o solvente seja a água, o processo de solvatação é denominado de hidratação e refere-se a uma camada de moléculas de água ligadas fortemente que circunda cada molécula ou íon dissolvido. Esta camada de hidratação é o resultado das forças intermoleculares entre o soluto e o solvente (REICHARDT & WELTON, 2011). No caso dos íons, para os ânions, as moléculas de água se ordenam com o pólo positivo voltado para o íon, fazendo com que as moléculas de água permaneçam mais fortemente ligadas ao redor do ânion. No caso dos cátions, a parte voltada para o íon é o pólo negativo, o que faz com que as moléculas de água se agrupem de forma mais fraca ao redor do íon (Figura 1) (BALL, 2008).

Os ânions são mais hidratados do que os cátions para o mesmo raio iônico. Os átomos de hidrogênio da água se aproximam do ânion de modo mais eficiente do que os átomos de oxigênio, hidratando assim melhor o ânion. Segundo Collins (1997), há pelo menos duas razões para a maior hidratação dos ânions: 1. cálculos de mecânica quântica indicam que os ânions, por interagirem com o átomo de hidrogênio da água, formam uma camada interna de ligação de hidrogênio com as moléculas de água de solvatação, enquanto que, os cátions que interagem com o oxigênio da água não formam essa camada; 2. a transferência de carga para o solvente caracteriza forte hidratação, como o átomo de oxigênio da água é muito eletronegativo, é mais fácil aceitar carga negativa dos ânions do que carga positiva dos cátions.

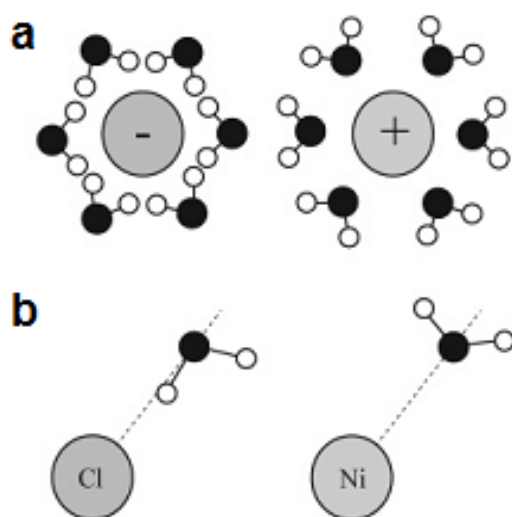


Figura 1: Modelo de hidratação de íons. (a) Modelo convencional de hidratação de ânions e cátions. (b) Orientações da molécula de água reveladas pela técnica de difração de nêutrons. Na camada de hidratação, o ânion cloreto coordena-se com a água através do átomo de hidrogênio de modo que a ligação $\text{H-O}\cdots\text{Cl}^-$ é quase linear (linha tracejada), enquanto que para o cátion níquel a molécula de água orienta-se com o cátion por meio do átomo de oxigênio voltado para o íon (linha tracejada). Adaptada de BALL, 2008.

2.3 Série de Hofmeister

Há mais de um século, Franz Hofmeister, Professor de Farmacologia da Universidade de Praga, juntamente com outros pesquisadores, iniciou um estudo sistemático sobre os efeitos específicos dos íons. Ele observou uma habilidade particular de certos sais em precipitar proteínas em solução aquosa e concluiu que a eficácia dos sais em precipitá-las aumenta com a sua capacidade em “ordenar” a água ao seu redor. Seus achados permitiram classificar os sais em dois grupos: um primeiro grupo de sais conforme sua eficiência em precipitar proteínas (*salting-out*) e um segundo grupo de sais de acordo com sua eficácia em solubilizar proteínas (*salting-in*) originando a Série de Hofmeister ou série liotrópica (HOFMEISTER, 1888; KUNZ et al., 2004; TADEO et al., 2007).

Efeito *salting* é a mudança na solubilidade de um não-eletrólito em meio aquoso resultante da adição de um eletrólito. Pode ocorrer uma diminuição (*salting-out*) ou aumento (*salting-in*) na solubilidade de um não-eletrólito com a adição de concentrações crescentes do sal. Matematicamente, a influência de um eletrólito sobre a solubilidade, em meio aquoso, de um não-eletrólito pode ser expressa pela equação de Setschenow, definida a seguir:

$$\log (s_0/s) = kc_s \quad \text{Eq. (1)}$$

onde, s_0 e s são as solubilidades de um não-eletrólito em água pura e em solução eletrolítica, respectivamente, c_s é a concentração de sal, e k é a constante *salting*. Valor positivo de k indica *salting-out* e valor negativo indica *salting-in*. O valor de k é a soma das constantes *salting* catiônica (k^+) e aniônica (k^-) (LO NOSTRO & NINHAM, 2012).

Como os cátions e ânions possuem constantes *salting* diferentes, as diversas combinações que eles podem realizar formando sais são diferidas pela sua tendência em promover *salting-out*. Isso tem sido atribuído às diferenças de: estrutura, tamanho, densidade de carga, hidratação, e polarizabilidade do íon, bem como, à polarizabilidade do solvente. O efeito da adição de sais em soluções de não-eletrólitos é muito complexo devido aos diferentes tipos de interações intermoleculares envolvendo os íons, o solvente e as moléculas do soluto (LO NOSTRO & NINHAM, 2012).

Os íons induzem efeitos na estrutura da água alterando a formação natural das ligações de hidrogênio, consequentemente, as moléculas de água se ordenam de forma diferente ao redor de cada íon. Assim, pode-se classificar o íon em fracamente hidratado ou fortemente hidratado dependendo da quantidade de moléculas de água que se ordenam ao redor dele (Figura 2). De acordo com a sua atuação na estrutura da água, os íons da Série de Hofmeister podem ser classificados como:

- Cosmotrópicos: sulfato (SO_4^{2-}), fluoreto (F^-), cálcio (Ca^{+2}), magnésio (Mg^{+2}), entre outros.
- Caotrópicos: tiocianato (SCN^-), perclorato (ClO_4^-), iodeto (I^-), amônio (NH_4^+), entre outros.

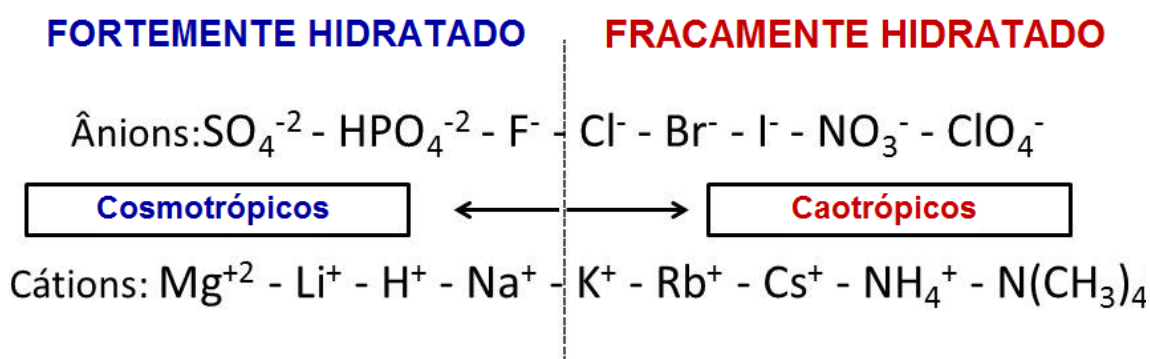


FIGURA 2: Sequência de alguns íons da Série de Hofmeister. Os íons podem ser classificados de acordo com sua capacidade de hidratação em cosmotrópico (fortemente hidratado) ou caotrópico (fracamente hidratado). Adaptado de YANG, 2009.

De modo geral, os cosmotrópicos possuem a capacidade de estruturar as moléculas de água e estabilizar proteínas, enquanto que, os caotrópicos desestruturaram as moléculas de água e desestabilizam proteínas (ZHANG & CREMER, 2006). Os íons cosmotrópicos possuem interação mais forte com moléculas de água do que às moléculas de água entre si (Figura 3), já os caotrópicos no contrário, interagem com a água mais fracamente do que às moléculas de água entre si (LO NOSTRO et al., 2006).

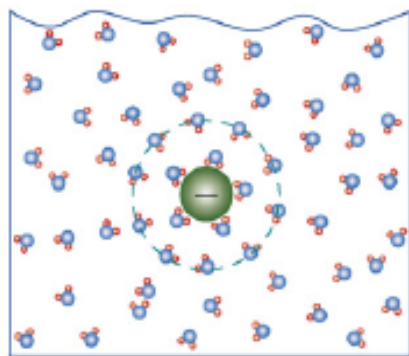


FIGURA 3: Íon e camada de hidratação. Representação esquemática da estruturação das moléculas de água ao redor de um ânion cosmotrópico. A circunferência tracejada indica a organização da segunda camada de hidratação. Adaptado de ZHANG & CREMER, 2006.

A sequência dos íons de Hofmeister apresentada na Figura 2 representa a influência dos íons na água. Porém, esta sequência não é fixa e depende do sistema em estudo, alguns íons podem mudar a sua posição na série ou até mesmo invertê-la, ou seja, um dado íon pode interagir com apenas moléculas de água ou com uma macromolécula podendo apresentar um comportamento caotrópico ou cosmotrópico a depender do sistema (LYKLEMA, 2009; KUNZ, 2010).

Em geral, e somente para íons inorgânicos, os efeitos específicos dos cátions são menos pronunciados do que os efeitos específicos dos ânions, pois as interações dos ânions com a água são mais fortes do que com os cátions para o mesmo tamanho e densidade de carga absoluta. Contudo, isto é apenas válido quando as interações íon-água são dominantes para os efeitos específicos do íon. Quando as interações diretas íon/íon ou íon/co-soluto são predominantes, os efeitos específicos dos cátions podem ser da mesma ordem de intensidade como nos efeitos específicos dos ânions (KUNZ, 2010).

O parâmetro físico-químico mais utilizado para descrever a série de Hofmeister de maneira quantitativa é o coeficiente B de viscosidade de Jones-Dole. Os íons podem ser sistematicamente classificados como caotrópicos ou cosmotrópicos a partir do sinal desse coeficiente. O coeficiente B de viscosidade de Jones-Dole correlaciona-se com a densidade de carga dos íons e oferece informações relativas à hidratação dos íons

(JENKINS & MARCUS, 1995; COLLINS, 1997). Para uma ampla faixa de concentrações, entre 5×10^{-3} a 1 M, a viscosidade específica é definido pela seguinte equação:

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

onde, c é a concentração do sal; η é a viscosidade da solução eletrolítica aquosa; η_0 é a viscosidade da água pura à mesma temperatura; A é um termo eletrostático, que em concentrações moderadas do sal é igual a 1; e B é uma medida direta da força das interações íon-água normalizada com a força das interações água-água no seio da solução (*bulk solution*).

O coeficiente B permite-nos dividir os íons em dois grupos: coeficientes B com sinal negativo para íons fracamente hidratados (íons caotrópicos, $\eta < \eta_0$) e coeficientes B com sinal positivo para íons fortemente hidratados (íons cosmotrópicos, $\eta > \eta_0$) (LO NOSTRO & NINHAM, 2012). Os valores dos coeficientes de viscosidade B de Jones-Dole para uma série de íons são apresentados na Tabela 1. O ponto no qual esse parâmetro muda de sinal representa o comportamento ideal definido pela força de interação água-água no seio da solução (COLLINS, 2004). Nessa mesma tabela, são também apresentados os valores de números de hidratação dinâmica aparente (ADHN, *apparent dynamic hydration numbers*) que indicam o número de moléculas de água fortemente ligadas ao íon (KIRIUKHIN & COLLINS, 2002).

TABELA 1: Valores dos coeficientes B de viscosidade Jones-Dole (B) e dos ADHN (números de hidratação dinâmica aparente) para diversos cátions e ânions. Fonte: tabela adaptada de COLLINS, 2006.

Cátions	B	ADHN	Ânions	B	ADHN
Mg^{+2}	0.385	5.8	PO_4^{-3}	0.590	5.1
Ca^{+2}	0.285	2.1	HPO_4^{-2}		4.0
			$\text{H}_2\text{PO}_4^{-2}$		1.9
			CH_3CO_2^-	0.250	
Ba^{+2}	0.22	0.35	SO_4^{-2}	0.208	1.8
H^+		1.93			
Li^+	0.150	0.6	F^-	0.1	5.0
			HO^-		2.8
Na^+	0.086	0.22	HCO_2^-	0.052	2.0
K^+	-0.007	0	Cl^-	-0.007	0
NH_4^+	-0.007	0	Br^-	-0.032	0
Rb^+	-0.030	0	NO_3^-	-0.046	0
Cs^+	-0.045	0	ClO_4^-	-0.061	0
			I^-	-0.068	0
			SCN^-	-0.103	0

2.4 Efeitos específicos dos íons

Efeitos específicos induzidos por íons em diversas condições são conhecidos como os efeitos de Hofmeister (Figura 4). Os efeitos dos íons dessa série são observados em várias situações como na estabilidade de proteínas (TADEO et al., 2009), interações proteína-proteína, cristalização de proteínas (COLLINS, 2006), atividade enzimática (NISHIMURA et al., 1999), estruturação e desnaturação de macromoléculas biológicas (ZHANG & CREMER, 2006), crescimento bacteriano, estruturas anfífilas (LO NOSTRO et al., 2006). Além disso, a Série de Hofmeister é observada em muitos fenômenos físico-químicos como tensão superficial (PEGGRAM & RECORD, 2007), concentração micelar crítica (WANG & SATOH, 2009) e estabilidade coloidal (LÓPEZ-LÉON et al., 2005).

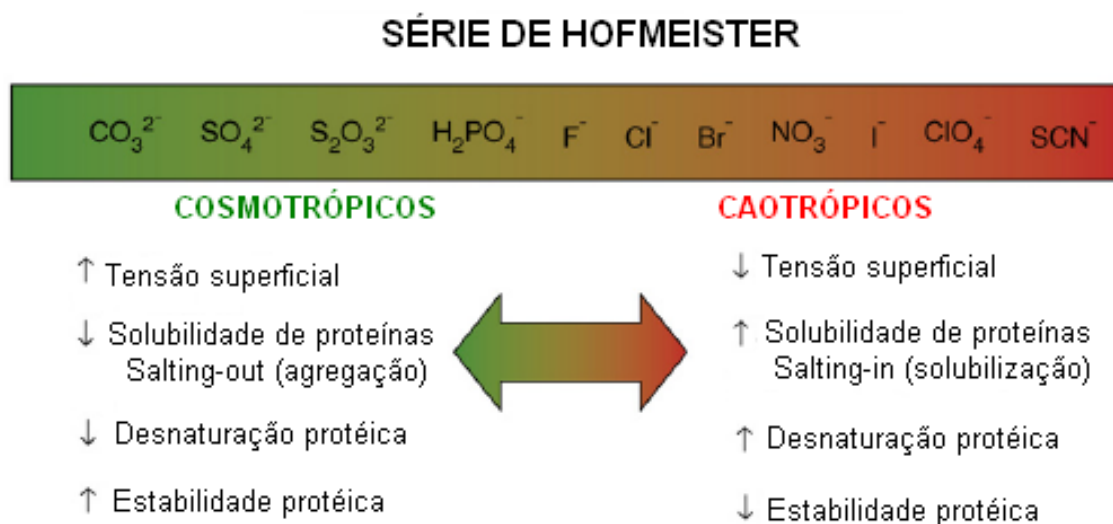


FIGURA 4: Efeitos específicos dos íons. Sequência dos ânions da Série de Hofmeister e exemplos de alguns efeitos específicos promovidos por cosmotrópicos e caotrópicos. Adaptado de ZHANG & CREMER, 2006.

Os efeitos específicos dos íons são dependentes da concentração do sal. Geralmente, em baixas concentrações de sal ($<0,1$ M) quase não se observa especificidade iônica, pois as interações eletrostáticas são dominantes. Contudo, em concentrações intermediárias (0,1 até 2 M), os efeitos específicos são mais pronunciados e observados, pois nessa situação as interações eletrostáticas são blindadas significativamente (KUNZ, 2010).

Diversas teorias foram propostas na tentativa de explicar os efeitos dos íons nos diferentes sistemas. As primeiras tentativas para explicar a especificidade iônica referem-se à habilidade do íon em quebrar ou realizar ligações de hidrogênio considerando, apenas, as forças eletrostáticas e de hidratação. Uma das teorias clássicas, a teoria Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO) de interações entre partículas coloidais, faz um balanço entre as forças atrativas de van der Waals (força atrativa de curto alcance) e as forças repulsivas da dupla camada elétrica. Uma das principais aproximações na teoria DLVO é o uso da equação de Poisson-Boltzman para descrever as interações eletrostáticas. Esse método trata os íons como cargas pontuais e somente pode ser adotado em situações de baixa concentração de sal (até $\sim 0,01$ M) onde as forças eletrostáticas são dominantes, consequentemente, para descrever os efeitos dos íons essa teoria não é a ideal. Para solucionar essa simplificação, Ninham e cols (BOSTRÖM et al., 2001) propuseram a incorporação do termo referente ao potencial de dispersão na teoria DLVO, a partir desse modelo modificado foi possível analisar os

efeitos específicos dos íons na interação com partículas carregadas e em concentrações acima de 0,01 M (ZHANG & CREMER, 2006).

Contudo, os efeitos específicos dos íons não conseguem ser bem explicados apenas pelas teorias clássicas baseadas nas forças eletrostáticas. O tamanho dos íons e a estrutura da água devem ser considerados também, pois os íons afetam a estrutura e a dinâmica da água, principalmente, nas suas camadas de hidratação (XIE et al., 2014). Com uma abordagem relativamente simples, Collins (2004) propôs uma teoria denominada *Lei de Coincidência de Afinidades pela Água* (em inglês: “Law of Matching Water Affinities”) para explicar os efeitos de Hofmeister. Essa teoria permite interpretar os efeitos específicos dos íons qualitativamente e baseia-se, principalmente, na concepção de que íons de cargas opostas em solução formam esferas internas de pares iônicos espontaneamente somente quando estes íons possuem energias livres de hidratação absolutas similares (afinidades iguais pela água). A energia livre de hidratação absoluta de um íon é uma função monotônica da sua densidade de carga de superfície, a partir disso, segundo essa lei, há uma tendência de íons com cargas iguais se ordenarem de acordo com o tamanho: ânions grandes formam esferas internas de pares iônicos com cátions grandes, enquanto que, ânions pequenos formam esferas internas de pares iônicos com cátions pequenos (Figura 5) (COLLINS, 2006).

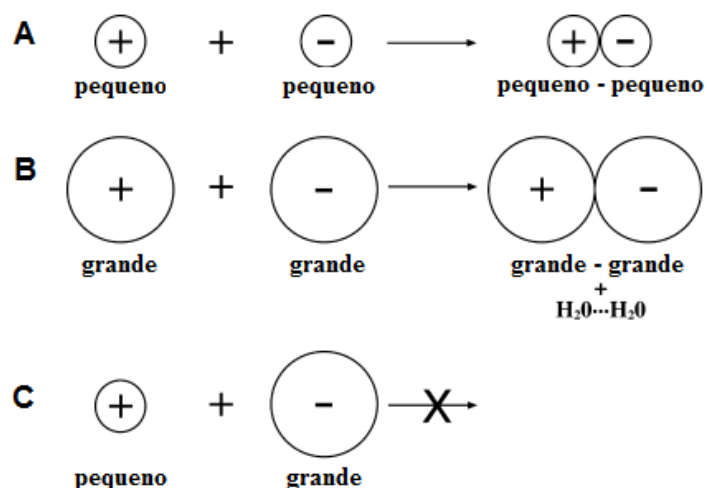


FIGURA 5: Representação esquemática da teoria da *Lei de Coincidência de Afinidades pela Água*. O tamanho do íon controla a tendência de íons de cargas opostas formarem esferas internas de pares iônicos. (A) Íons pequenos de sinais opostos formam esferas internas de pares iônicos em meio aquoso espontaneamente; (B) Íons grandes de sinais opostos formam esferas internas de pares iônicos em meio aquoso espontaneamente; (C) íons de tamanhos diferentes e com sinais opostos não formam espontaneamente esferas internas de pares iônicos em meio aquoso. Adaptado de COLLINS, 2004.

Basicamente, nessa teoria, íons simples são considerados como uma esfera com uma carga pontual no centro. Quando os íons são pequenos, as moléculas de água circundantes estão firmemente ligadas (íons cosmotrópicos), enquanto que, quando os íons são grandes a camada de hidratação fica ligada fracamente ao íon (íon caotrópico) (KUNZ & NEUEDER, 2010). Partindo da premissa da lei de Collins, sais com combinação de cátion-ânion cosmotrópico-cosmotrópico ou caotrópico-caotrópico (ou seja, associação de íons que possuem valores próximos de energias livres de hidratação) possuem uma tendência de formar par iônico mais forte do que combinações cátion-ânion cosmotrópico-caotrópico ou caotrópico-cosmotrópico (XIE et al., 2014). Vários grupos vêm tentando validar a teoria de Collins utilizando métodos de simulação computacional (VLACHY et al., 2009; XIE & GAO, 2013; XIE et al., 2014). Fennel e cols. (2009) investigaram a interação íon-íon em meio aquoso por meio de simulações por dinâmica molecular, permitindo uma interpretação microscópica das observações empíricas da lei de Collins, e demonstraram que as simulações foram consistentes com as proposições da lei.

Termodinamicamente, quando um sal é composto por dois íons que possuem energias livres de hidratação similares (sais cosmotrópico-cosmotrópico ou caotrópico-caotrópico) sua solubilização em meio aquoso é um processo endotérmico ($\Delta H_{\text{sol}} > 0$), ou seja, ocorre a produção de uma solução fria sugerindo que não estão ocorrendo interações fortes do íon com a água (COLLINS, 2004). A absorção de calor corresponde à formação de pares iônicos e é considerada um processo energeticamente favorável. No caso do par cosmotrópico-cosmotrópico, a tendência favorável na formação do par iônico é atribuída à grande interação eletrostática entre os dois íons pequenos que supera a forte ligação da água aos íons. Já no caso do par caotrópico-caotrópico, a reação de absorção de calor ocorre porque os íons caotrópicos são comprimidos pela água, deste modo, a água pode realizar ligações, mais favoráveis energeticamente, com outras moléculas de água no seio da solução em vez de realizar as fracas ligações íon caotrópico-água (LO NOSTRO & NINHAM, 2012). Porém, quando o sal possui íons constituintes com energias livres de hidratação diferentes (sais cosmotrópico-caotrópico ou caotrópico-cosmotrópico) a sua solubilização em meio aquoso é um processo exotérmico ($\Delta H_{\text{sol}} < 0$), há a formação de soluções quentes, sugerindo que há uma forte interação do íon pequeno (cosmotrópico) com a água e que os íons de cargas opostas do sal dissolvido tendem a ficar separados (LO NOSTRO & NINHAM, 2012).

A Figura 6 relaciona a entalpia da solução com a diferença entre as energias livres de hidratação dos íons constituintes do sal. Podemos observar que os sais que

estão acima da linha sólida horizontal (em zero) produzem soluções frias na dissolução; enquanto que, os sais que estão abaixo da linha produzem soluções quentes na dissolução em meio aquoso. Como todos os sais apresentados nessa figura são monovalentes, os campos elétricos de longo alcance gerados por cada sal devem ser muito similares, desse modo, os diferentes comportamentos observados devem ocorrer, provavelmente, por diferenças na força de interação química de curto alcance com a água (COLLINS et al., 2007).

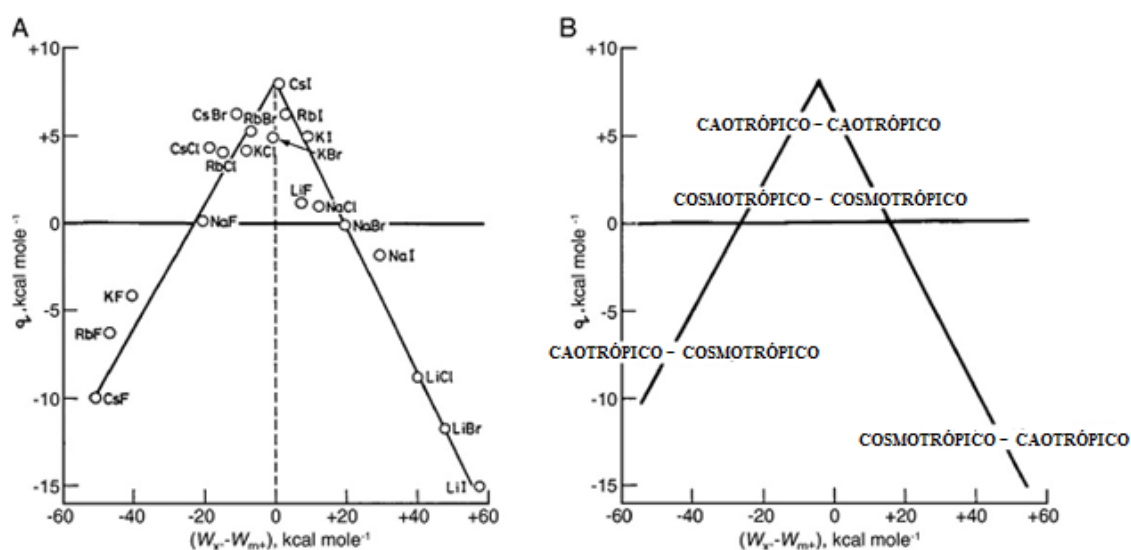


FIGURA 6: A energia de hidratação dos sais de Hofmeister. (A) Relação da entalpia da solução de sais (em diluição infinita) com a diferença entre as energias de hidratação absoluta dos ânions e cátions constituintes de cada sal. (B) Identificação dos íons como caotrópicos ou cosmotrópicos. Figura adaptada de COLLINS et al., 2007.

2.4.1 Influência dos sais em sistemas confinados

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

Um dos primeiros estudos avaliando a influência dos íons nas características físicas dos canais iônicos foi realizado por Grigorjev e Bezrukov em 1994. Eles avaliaram a influência dos íons halogênicos (F^- , Cl^- , Br^- , I^-), formando sais com o K^+ , nas propriedades biofísicas (condutância e seletividade) do canal iônico formado pelo

antibiótico *roflamycoin*. Tanto a condutância quanto a seletividade iônica foram dependentes do tipo de eletrólito. A condutância do canal iônico unitário aumentou ao longo da série $F^- < Cl^- < Br^- < I^-$. Com relação à seletividade, observou-se uma redução gradual da seletividade aniônica do canal iônico ao longo da sequência $F^- > Cl^- > Br^- > I^-$. Houve uma inversão na seletividade, partindo de uma seletividade aniônica com KF para uma seletividade catiônica com KI. Estabeleceu-se que quanto maior for a natureza caotrópica do ânion, mais forte é a ligação dos ânions na estrutura protéica do canal e este desenvolve uma seletividade catiônica devido a redução da barreira eletrostática para os cátions.

O estudo dos efeitos dos íons em sistemas confinados, como os sensores estocásticos baseados no nanoporo protéico unitário, também vem se intensificando nos últimos anos, tendo em vista a grande importância biotecnológica deste sensor (GURNEV et al., 2009; BHATTACHARYA et al., 2011). Particularmente, Rodrigues e cols. (2008) mostraram que o simples aumento da concentração do KCl (de 1M para 4M) melhora qualitativamente as características do sensor formado pela α -hemolisina de *Staphylococcus aureus* em bicamada lipídica plana. Nesse estudo, foi estabelecida uma forte relação entre o aumento da concentração do sal com o nível de resolução do sensor para moléculas unitárias do PEG e com a solubilidade do polímero indicando a importância do efeito salting-out do KCl.

Diante desse cenário surgiu a motivação para esse trabalho, a de investigar a influência dos ânions e cátions da série de Hofmeister na sensibilidade e no sistema de detecção do biossensor baseado no nanoporo protéico unitário formado pela α -HL de *Staphylococcus aureus*.

2.5 Biossensor

Biossensor é um dispositivo analítico que integra um elemento de reconhecimento biológico ou derivado biológico a um transdutor. O elemento de reconhecimento interage seletivamente com um analito, de forma direta ou indireta, produzindo um sinal biológico que é captado pelo transdutor que o converte para um sinal elétrico mensurável e correlacionado com a concentração ou atividade do analito presente na amostra (OTLES & YALCIN, 2012).

O biossensor pode ser representado, em um diagrama de blocos, por três partes (Figura 7). A primeira parte é composta pelo elemento sensor (camada de biorreconhecimento) que é um elemento biológico (por exemplo: enzima, ácido

nucleico, anticorpo, proteína, entre outros) que possui a propriedade de reconhecer seletivamente e interagir com o analito. A interação resulta na alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas (modificação de pH, transferência de elétrons, variação de massa, transferência de calor, liberação de gases ou íons) que são captadas e medidas pelo transdutor. A segunda parte é composta pelo transdutor o qual funciona como um estágio que capta os eventos biológicos, ocorridos na etapa de detecção, e os transformam em sinais eletrônicos proporcionais em magnitude e/ou frequência à concentração de um determinado analito ou grupo de analitos que interagem com o elemento sensor. A terceira parte (processamento) diz respeito à saída de dados na forma de sinais eletrônicos do transdutor para torná-los legíveis em uma interface humana qualquer como um medidor, um display ou tela de computador (FURTADO et al., 2008, KOYUN et al., 2012).

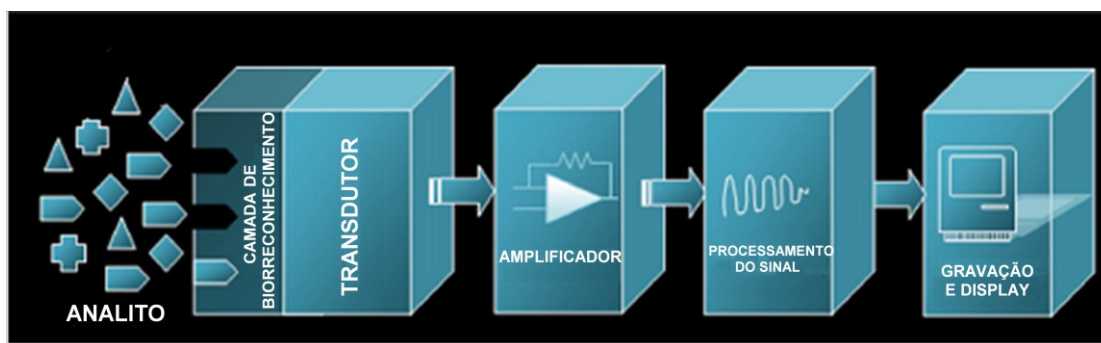


FIGURA 7: Esquema geral dos componentes de um biossensor. Adaptado de VELUSAMY et al., 2010.

Os biossensores podem ser classificados levando em consideração aspectos do mecanismo de detecção, de transdução e o modo de interação entre o analito e o elemento de reconhecimento. Com relação à natureza do elemento de reconhecimento, os biossensores podem ser classificados como: biossensores baseados em células, biossensores baseados em enzimas, biossensores baseados em anticorpos (imunossensores), biossensores baseados em receptores de membrana (THÉVENOT et al., 2001). De acordo com o transdutor utilizado, o biossensor pode ser classificado como: eletroquímico (potenciométrico, amperométrico, condutimétrico e impedimétrico), óptico (medida de luminescência, fluorescência, elipsometria, entre outros), detector de massa ou piezoelétrico (relaciona a variação da frequência dos cristais piezoelétricos com a massa), termométrico (SETHI, 1994). O biossensor ainda pode ser classificado, de acordo com o tipo de interação que ocorre entre o analito e o

elemento sensor, em catalítico (detecta as reações que produzem ou consomem o analito) ou de afinidade (detecção direta da concentração do analito) (THÉVENOT et al., 2001; RICCARDI et al., 2002; VELUSAMY et al., 2010).

O sensor utilizado neste trabalho é baseado no nanoporo aquoso unitário formado pela α -HL de *Staphylococcus aureus* inserido em uma bicamada lipídica plana. Este dispositivo representa a classe dos sensores estocásticos que permitem a detecção de analitos a nível de molécula unitária oferecendo, potencialmente, uma plataforma de sensoriamento altamente sensível, rápida e multifuncional (LIU et al., 2010). O termo sensoriamento estocástico advém da interação molecular entre o elemento sensor e o analito a qual é um processo estocástico, ou seja, o número de moléculas do analito que interagem com o sensor em um dado intervalo de tempo é uma variável aleatória (DAS et al., 2009; SHAMAIAH, 2012).

A seguir abordaremos as características, funcionamento e aplicações desse nanobiossensor.

2.6 Nanoporo da alfa-hemolisina como elemento sensor

Um poro protéico “robusto” é pré-requisito para o desenvolvimento de um elemento sensor estocástico. Estudos nas áreas da proteômica e biologia estrutural revelam que proteínas de membrana com configuração β -barril cumprem essa exigência (CHEN et al., 2008). A maioria das proteínas β -barril dobra-se formando poros aproximadamente cilíndricos com as cadeias laterais hidrofílicas voltadas para o lúmen do poro e os resíduos hidrofóbicos interagindo com a bicamada lipídica. A estrutura dessas proteínas é estabilizada por uma disposição espacial das ligações de hidrogênio entre as fitas β adjacentes que confere à proteína estabilidade termodinâmica (MOVILEANU, 2009).

Um modelo de elemento de reconhecimento para biossensor estocástico muito utilizado é o nanoporo formado pela α -HL a qual é uma das várias toxinas secretadas pela bactéria *Staphylococcus aureus*. A α -HL é uma citolisina dotada da capacidade de formar poros aquosos tanto em membranas biológicas (BHAKDI et al., 1991) quanto em bicamadas lipídicas artificiais (KRASILNIKOV et al., 2000). A proteína possui peso molecular em torno de 33 kDa e é liberada na forma de monômeros de polipeptídeos de 293 aminoácidos (GRAY & KEHOE, 1984) solúveis em água, os quais se inserem em membranas e então se oligomerizam para formar o poro heptamérico transmembrana (Figura 8), permitindo a passagem de água e de diversas moléculas pelo seu interior

(ZHAO et al., 2009). O nanoporo formado possui comprimento de ~ 10 nm e o diâmetro interno de ~ 2 nm. O conhecimento da estrutura tridimensional em alta resolução do poro formado pela α -HL (SONG et al., 1996), sua elevada condutância (~ 4 nS em 4 M KCl) (RODRIGUES et al., 2008) e sua estabilidade em soluções aquosas com $\text{pH} > 7.0$ (KRASILNIKOV et al., 1988) torna o registro e análise dos eventos moleculares com esse sensor relativamente simples e, conseqüentemente, atraente.

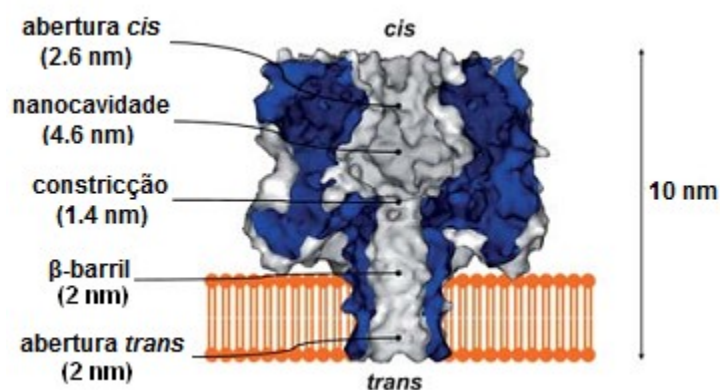


FIGURA 8: Modelo do nanoporo formado pela α -HL inserido em bicamada lipídica e suas dimensões. Adaptado de GU & SHIM, 2010.

Para otimizar a identificação do analito, a α -HL pode ser usada na forma nativa, genética ou quimicamente modificada para a detecção de íons metálicos (BRAHA et al., 2000), DNA (VENKATESAN & BASHIR, 2011), proteínas (ROTEM et al., 2012), pequenas moléculas orgânicas (RODRIGUES et al., 2011), segundo mensageiro (CHELEY et al., 2002), enantiômeros de fármacos (KANG et al., 2006), toxinas (LIU et al., 2010), organofosforados (WANG et al., 2009), entre outros.

Nanoporos protéicos formados pela α -HL podem ser engenheirados¹ utilizando a técnica de mutagênese sítio-dirigida onde apenas um, ou um grupo de aminoácidos, que compõe a estrutura protéica do nanoporo pode ser substituído por outros aminoácidos gerando uma variedade de cadeias laterais de diferentes tamanhos, formas, polaridade e reatividade. Nanoporos também podem ser modificados quimicamente. Na modificação química um aminoácido da cadeia lateral, geralmente cisteína, é seletivamente modificado com um reagente químico permitindo uma diversidade de funcionalidades que podem ser incorporadas ao poro (BAYLEY et al., 2004). Além disso, há estudos para modular a seletividade do poro, com o uso de adaptadores moleculares (modificação não-covalente) introduzidos no lúmen do poro formado pela α -HL

¹ Termo utilizado para nanoestruturas projetadas/produzidas em laboratório.

tornando ainda mais estreita a sua constrição, e desse modo, favorecendo uma seletividade específica com intuito de facilitar a identificação e a quantificação do analito (KANG et al, 2006).

Nanoporos de α -HL engenheirados têm sido estudados com a finalidade de tornar mais específica a detecção do analito pelo biossensor. A detecção de polipeptídeos no interior do nanoporo tem suas limitações, como as proteínas são muito grandes para transitarem através do nanoporo, várias abordagens foram estudadas para superar essa limitação (MOVILEANU, 2009; OUKHALED et al., 2012; ROTEM et al., 2012).

Uma delas é a adição covalente da extremidade de uma cadeia polimérica, como por exemplo, o polietilenoglicol (PEG), no interior do nanoporo. Na outra extremidade do polímero é adicionado um ligante covalentemente. Esse ligante fica livre na parte externa do nanoporo, a interação do analito com esse ligante gera um sinal que é transmitido para o interior do nanoporo a fim de que a corrente iônica seja alterada e o analito detectado (BAYLEY & JAYASINGHE, 2004; ROTEM et al., 2012) (Figura 9). Os nanoporos protéicos engenheirados são utilizados na detecção estocástica de uma ampla variedade de moléculas em solução aquosa e como uma plataforma ultrarrápida e de baixo custo para o sequenciamento de RNA ou DNA (MAITRA et al., 2012; ROTEM et al, 2012).

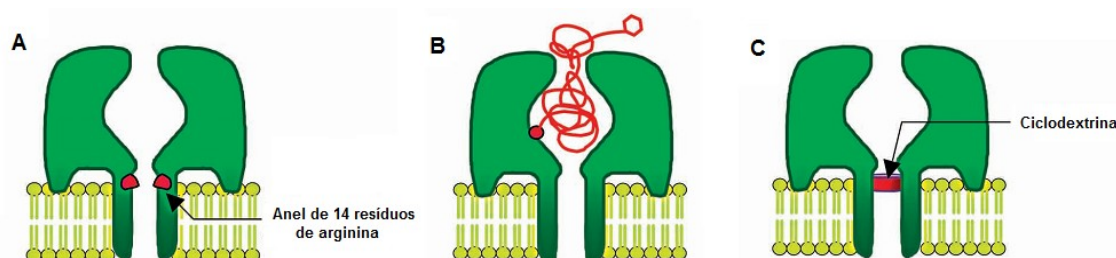


FIGURA 9: Exemplos de nanoporos de α -HL de *Staphylococcus aureus* engenheirados: (A) poro geneticamente engenheirado, com um anel de 14 resíduos de arginina localizado próximo à região mais estreita do lúmen do poro; (B) poro contendo uma cadeia polimérica (PEG) fixada covalentemente no interior do nanoporo; (C) poro contendo um adaptador molecular (ciclodextrina) dentro do lúmen. Retirado de BAYLEY & JAYASINGHE, 2004.

2.7 Sensor estocástico

O conceito de utilizar pequenos poros para analisar partículas biológicas foi inspirado no princípio de funcionamento do contador Coulter (COULTER, 1953) e os sensores estocásticos baseados em nanoporos são descendentes miniaturizados desse

contador (KASIANOWICZ et al. 2008). Resumidamente, no contador Coulter, partículas microscópicas e células passam através de um poro (microcanal) e causam uma modulação detectável na corrente iônica que flui através dele. A frequência dessas modulações pode ser usada para determinar o número de partículas, enquanto que a magnitude das modulações é proporcional ao tamanho da partícula/célula. A relação entre o tamanho molecular e a magnitude do bloqueio é importante porque indica que moléculas unitárias podem ser detectadas quando o diâmetro do poro possui dimensões nanométricas semelhantes. Com base nisso, pode-se inferir que os sensores baseados nos nanoporos são representantes do contador Coulter em nanoescala (HOWORKA & SIWY, 2009). Um típico contador Coulter está esquematizado na Figura 10.

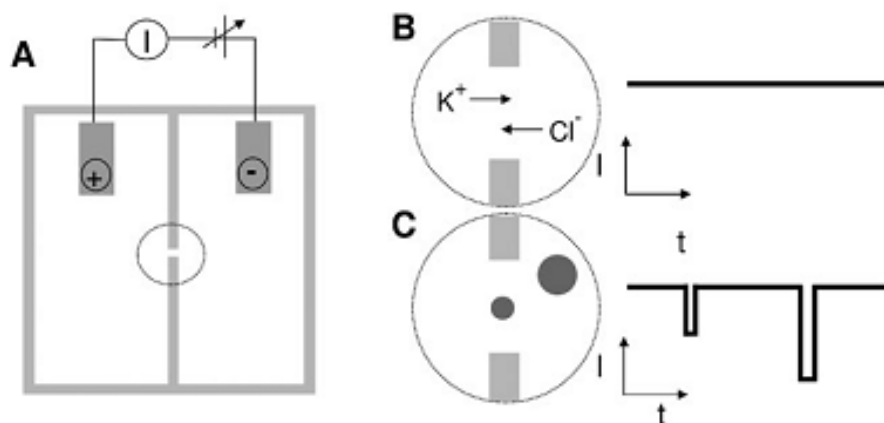


FIGURA 10: Esquema ilustrando o princípio do contador Coulter. (A) Setup experimental do contador que é composto por duas câmaras preenchidas com soluções eletrolíticas que estão conectadas por meio de um microcanal, dois eletrodos e um potenciostato são usados para estabelecer um potencial. (B) O potencial aplicado que gera uma corrente iônica que flui através do orifício equivalente a uma resistência constante da solução. (C) Quando partículas micrométricas ou células são adicionadas em um das câmaras, a passagem dessas pelo orifício causa um bloqueio do microcanal e causa alterações na resistência da solução. O contador detecta essas mudanças na resistência elétrica. Adaptado de HOWORKA & SIWY, 2009.

Sensores baseados em nanoporos protéicos podem identificar e quantificar analitos baseados na análise da mudança na corrente iônica que flui através do poro (MOBILEANU, 2009). São ideais para serem usados como sensores por diversas razões: o analito ao interagir com o nanoporo cria um sinal pelo bloqueio estérico do poro ou pela mudança no potencial eletrostático na vizinhança ou dentro do poro; o analito não precisa, necessariamente, ser marcado (por exemplo, sonda fluorescente)

para ser detectado como uma entidade unitária; a técnica permite a detecção de mais de um analito presente na solução simultaneamente (KANG et al., 2006) e também apresenta alta sensibilidade e rapidez na análise (KASIANOWICZ et al., 2007).

O princípio do sensor estocástico, baseado no nanoporo protéico unitário formado pela α -HL, está na detecção das moléculas unitárias feita pelo nanoporo para identificar e quantificar diversas moléculas em solução aquosa (CHELEY et al, 2002). O resultado de cada interação se reflete na mudança transitória da corrente iônica que passa através do nanoporo. O poro unitário incorpora-se em uma bicamada lipídica plana a qual separa dois compartimentos com solução salina (Figura 11).

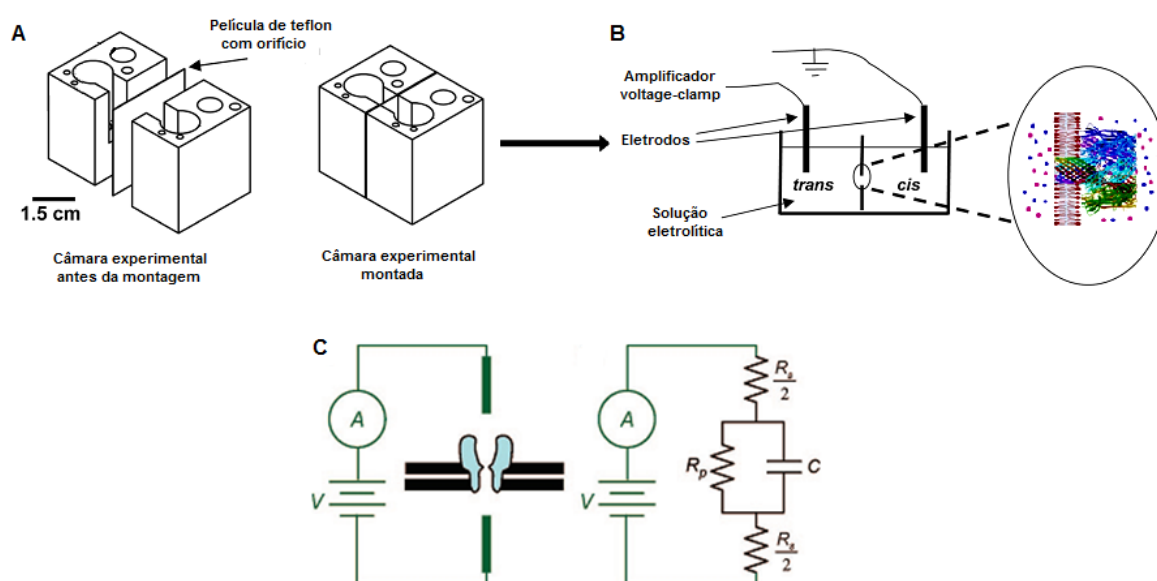


FIGURA 11: Esquema do diagrama experimental. (A) Câmara experimental que consiste de duas hemicâmaras, *cis* e *trans*, separadas por uma película de Teflon® que possui um orifício para a formação da bicamada lipídica plana. (B) Ilustração da bicamada e da inserção do nanoporo protéico de α -HL. Uma voltagem é aplicada através dos eletrodos via um circuito externo, e a corrente iônica que flui pelo nanoporo é monitorada. A aplicação do potencial transmembrana é controlada pelo amplificador de fixação de voltagem. (C) Esquema do circuito elétrico equivalente para a parte iônica do sistema. R_s , R_p e C representam a resistência da solução, a resistência do poro e a capacitância da bicamada lipídica onde o nanoporo está inserido, respectivamente. Os eventos, em escala molecular, que ocorrem no poro correspondem a mudanças temporárias no valor de R_p . Adaptado de LEMAY, 2009 e MOHAMMAD & MOVILEANU, 2012.

Quando um potencial elétrico é aplicado, os íons fluem através do poro gerando uma corrente iônica máxima. Toda vez que o analito ocupa o lúmen, induz uma modulação discreta (evento ou bloqueio), diminuindo a corrente iônica máxima. Na

situação mais simples, o elemento sensor tem dois estados - ocupado (pelo analito) e não-ocupado - e uma saída característica associada a cada um dos respectivos estados. A frequência da ocorrência dos eventos está relacionada com a concentração do analito, enquanto que a “assinatura digital de corrente”, ou seja, os tempos médios de duração e profundidade de bloqueio permitem a identificação do analito (Figura 12). O processo de ocupação da molécula do analito no lúmen do nanoporo é um evento dinâmico que ocorre em função da difusão e concentração do analito, portanto, a distribuição dos eventos na escala de tempo é randômica, permitindo a aplicação da terminologia, detecção estocástica ou sensor estocástico (BAYLEY & CREMER, 2001; RHEE & BURNS, 2007; DAS et al., 2009).

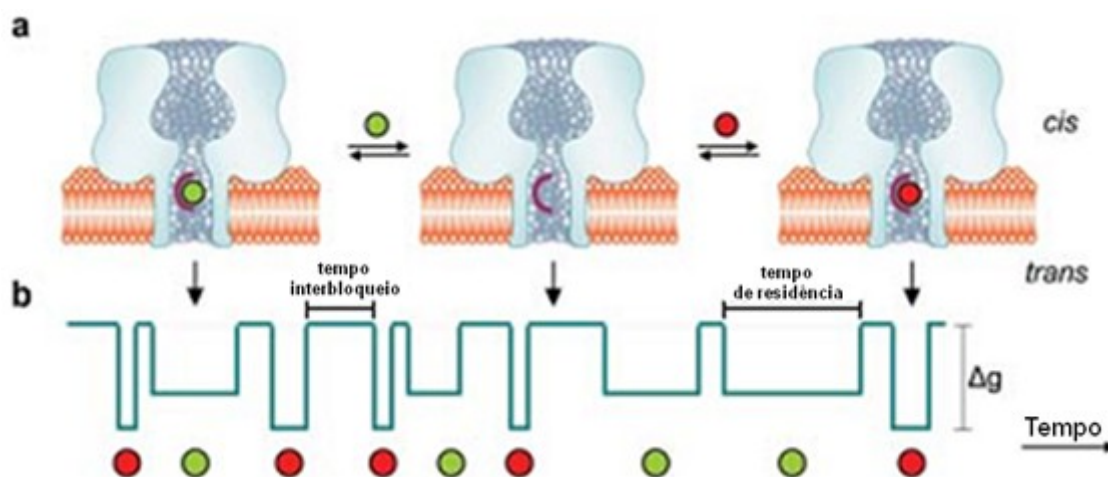


FIGURA 12: Esquema da interação da molécula do analito com o nanoporo protéico inserido em uma bicamada lipídica plana. (A) Ligação reversível de diferentes analitos (representados por bolas verdes e vermelhas) a um receptor engenhariado no nanoporo protéico. (B) Série temporal dos bloqueios da corrente gerados pela entrada da molécula unitária no lúmen do nanoporo. A análise das amplitudes e durações (tempo de residência) dos bloqueios permite a identificação dos analitos e a análise da frequência dos bloqueios permite quantificá-los. Adaptado de GU & SHIM, 2010.

Devido à natureza estocástica, as durações dos bloqueios individuais diferem entre si, porém, estatisticamente, seguem uma distribuição exponencial. A constante de ajuste da distribuição exponencial é definida como o tempo médio do bloqueio, τ_{off} . A mudança na amplitude da condutância (Δg) juntamente com o valor da τ_{off} representam a assinatura de identificação do analito. Com τ_{off} , podemos calcular a constante de dissociação, k_{off} , do complexo analito-nanoporo: $k_{off} = 1/\tau_{off}$. Adicionalmente, ao contar a frequência de eventos de ligação (bloqueios de corrente), pode-se quantificar o analito medindo o intervalo entre dois bloqueios adjacentes. Semelhante ao tempo de bloqueio,

os intervalos entre os bloqueios também seguem uma distribuição exponencial e a constante τ_{on} é o intervalo médio. O valor invertido da τ_{on} é a frequência de ocorrência dos eventos ($f = 1/\tau_{on}$) que é proporcional à concentração do analito ($[T]$), usando o coeficiente como a constante de associação analito-nanoporo (k_{on}), por exemplo: $f = k_{on}[T]$ (GU & SHIM, 2010).

Como visto acima, a cinética das flutuações da corrente iônica fornece informações adicionais que permitem quantificar e determinar a identidade do analito (KASIANOWICZ et al., 2008). No tópico a seguir, veremos algumas das aplicações do nanoporo unitário no sensoriamento de moléculas em meio aquoso.

2.7.1 Aplicações

O sensoriamento estocástico é uma técnica que se baseia na detecção de moléculas individuais de analitos das mais diversas classes, dessa maneira, apresenta uma grande versatilidade analítica. Braha e cols. (2000), utilizando um nanoporo de α -HL engenheirado (substituição dos aminoácidos das posições 123, 125, 133 e 135 por histidina), conseguiram detectar simultaneamente íons divalentes (Zn^{+2} , Co^{+2} e Cd^{+2}) em meio aquoso (Figura 13).

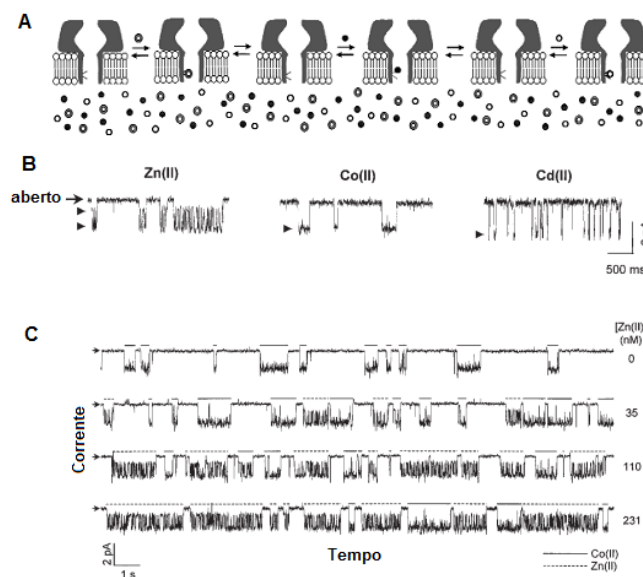


FIGURA 13: Detecção estocástica simultânea de íons metálicos divalentes. (A) O nanoporo mutante (engenheirado) possui um sítio de ligação que é ocupado de maneira mutuamente exclusiva pelos íons divalentes adicionados no lado *trans* da bicamada. (B) Registros de bloqueios da corrente iônica induzidos pelos íons Zn^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} (voltagem aplicada: +40 mV). (C) Registros de corrente na presença de Zn^{+2} e Co^{+2} simultaneamente (em +40 mV), a concentração de Co^{+2} é de aproximadamente 4.6 μ M enquanto que a de Zn^{+2} varia de 0 a 231 nM. Adaptado de BRAHA et al., 2000.

Em 2006, Kang e cols., utilizando um nanoporo mutante associado a um adaptador molecular (β -ciclodextrina), demonstraram que o sensor é capaz de distinguir simultaneamente os enantiômeros do fármaco ibuprofeno (Figura 14). Como cada enantiômero induz uma modulação distinta na corrente iônica, pode-se utilizar o sensor com uma abordagem farmacêutica, como por exemplo, no monitoramento da racemização.

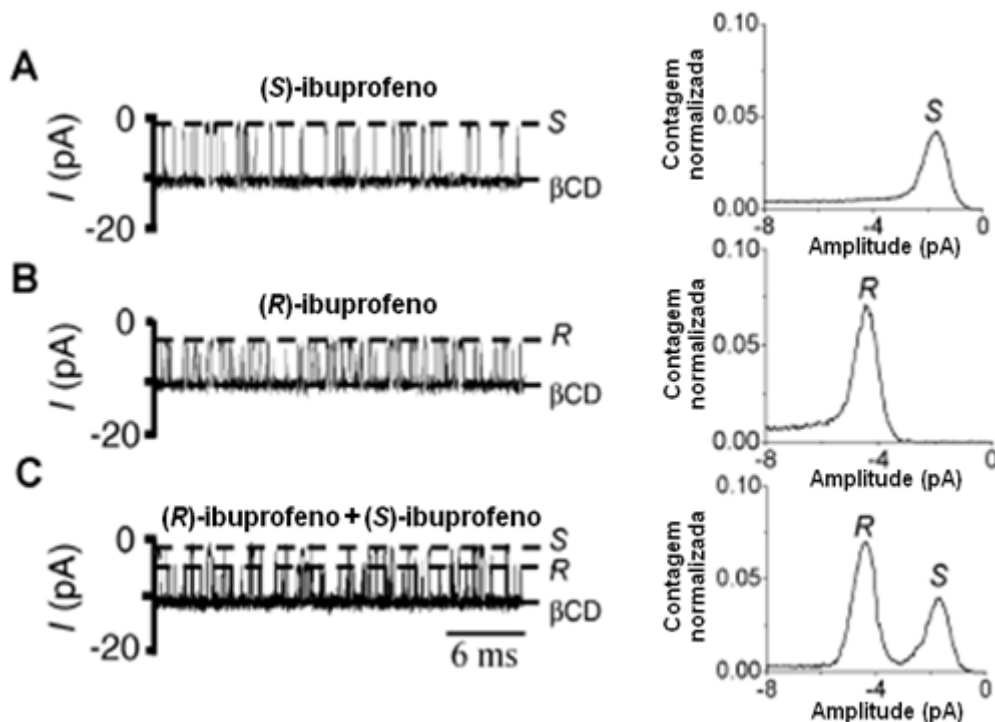


FIGURA 14: Detecção estocástica de enantiômeros do fármaco ibuprofeno. Registros dos bloqueios da corrente iônica característicos (A) do enantiômero (S)-ibuprofeno; (B) do enantiômero (R)-ibuprofeno; e (C) registro de ambas as moléculas simultaneamente, com seus respectivos histogramas de amplitude de corrente ao lado. Voltagem aplicada: -80 mV. Adaptado de KANG et al., 2006.

A detecção de neurotransmissores diversos em tempo real seria um recurso eficaz para o campo da neuroquímica. Sabendo que muitos neurotransmissores ligam-se reversivelmente a íons metálicos, especialmente o cobre, um grupo de pesquisadores, liderado por Hagan Bayley, aprimorou o sistema nanoporo-sensor permitindo detectar uma variedade de neurotransmissores em tempo real (BOERSMA et al., 2012) baseado na ligação reversível das moléculas dos analitos a um complexo de cobre inserido no interior do nanoporo protéico (Figura 15). Recentemente (ROSEN et al., 2014), o grupo de Bayley relatou a detecção, com o uso do nanoporo, dos padrões de fosforilação de uma proteína, a tioredoxina, que foi fosforilada em dois sítios adjacentes para esse

estudo. A análise da amplitude da corrente iônica e do ruído, a partir dos registros de bloqueios de corrente gerados pela passagem da proteína pelo nanoporo, permitiu a distinção entre os estados desfosforilada, monofosforilada e difosforilada da proteína. Esses achados impulsionam a tecnologia do nanoporo em direção a uma nova área de análise: a proteômica.

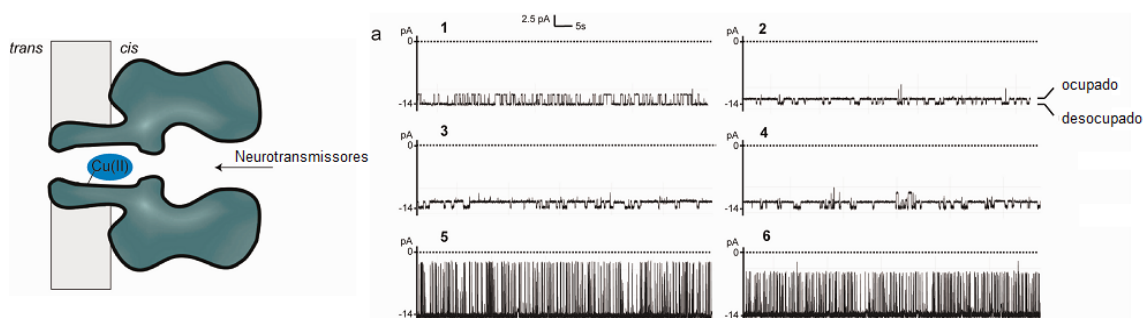


FIGURA 15: Aplicação do nanoporo na neuroquímica: detecção de seis neurotransmissores utilizando um nanoporo de α -HL modificado (inserção de um íon cobre (II) no lúmen do poro). (A) Registros dos bloqueios característicos da corrente para cada neurotransmissor. 1: glutamato; 2: dopamina; 3: norepinefrina; 4: epinefrina; 5: ATP; 6: ADP. Voltagem aplicada: - 50 mV. Adaptado de BOERSMA et al., 2012.

Nosso grupo de pesquisa, do Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-Tronco Dr. Oleg Krasilnikov, em colaboração com pesquisadores do National Institute of Standards and Technology (EUA), demonstrou uma técnica de discriminação de massa de polímeros polidispersos utilizando o nanoporo protéico unitário, ou seja, o uso do sensor como um espectrômetro de massas (ROBERTSON et al. 2007). Os achados desse estudo permitiram a geração e o depósito de uma patente (STANFORD et al., 2010). Esse método baseia-se na interação entre o nanoporo unitário e as moléculas poliméricas de tamanhos variados, que resulta em bloqueios da corrente iônica com profundidades de bloqueio e tempos de residência distintos e dependentes dos comprimentos das cadeias poliméricas ou massa molecular, resultando em uma espécie de espectrometria de massa em solução (Figura 16).

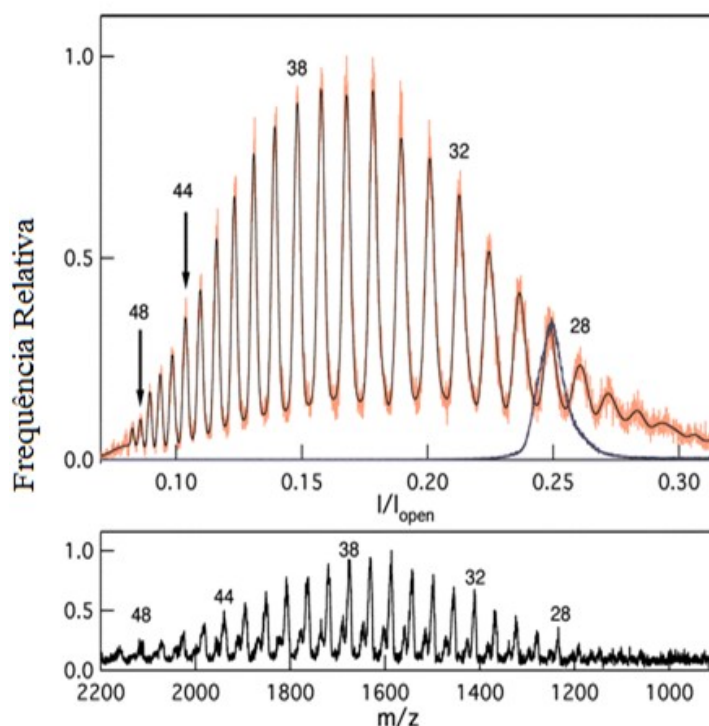


FIGURA 16: O nanoporo de α -HL como espectrômetro de massas. A distribuição de massa obtida com nanoporo unitário formado pela α -HL (figura superior) comparada com o convencional espectro de massas MALDI-TOF (parte inferior da figura) para o PEG polidisperso ($M_r=1.500$ g/mol). Maiores valores de I/I_{open} correspondem a massas inferiores de PEG. Adaptado de ROBERTSON et al. 2007.

Outra importante e interessante aplicação do nanoporo de α -HL é seu uso como um sequenciador molecular. Vários grupos vêm estudando o aprimoramento do sistema nanoporo-sensor para a detecção e caracterização de fitas simples de RNA e DNA (KASIANOWICZ et al., 1996; KASIANOWICZ et al., 2008; VENKATESAN & BASHIR, 2011; SCHNEIDER & DEKKER, 2012; CRACKNELL et al., 2013). O nanoporo proporciona um espaço interno altamente confinado no qual os ácidos nucleicos podem ser identificados sem a necessidade de amplificação ou marcação química.

É uma técnica que possui baixo custo e rapidez de análise da sequência das bases nucleotídicas do DNA. O sequenciamento ocorre da seguinte maneira: a fita simples de DNA (ssDNA) transloca-se, eletroforicamente, através do nanoporo unitário; as quatro bases nitrogenadas de ssDNA (adenina, guanina, citosina e timina) interagem individualmente e de forma específica com o nanoporo produzindo modulações características na corrente iônica; deste modo, a sequência das modulações na corrente reflete a sequência das bases nitrogenadas do ácido nucleico (Figura 17).

Para que haja o sequenciamento correto de ssDNA, o sistema precisa ser previamente calibrado, realizando-se a caracterização molecular de cada uma das bases nucleotídicas individualmente com o nanoporo de α -HL. Após isso, o sistema nanoporo-sensor estará apto para realizar o sequenciamento da ssDNA.

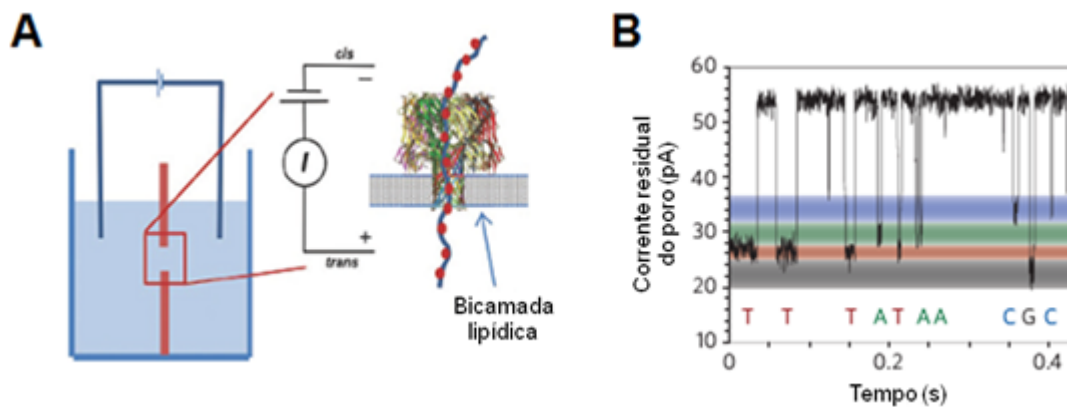


FIGURA 17: Representação esquemática do sequenciamento do DNA com nanoporo. (A) Translocação da fita simples de DNA através do nanoporo protéico. (B) Registro da corrente iônica residual referente à passagem do DNA pelo nanoporo. A redução da corrente provocada pela passagem dos nucleotídeos individuais através do nanoporo é dependente do tipo de base nitrogenada do nucleotídeo. Imagens adaptadas de VENKATESAN & BASHIR, 2011 e BASHIR, 2013.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALL, P. Water as an Active Constituent in Cell Biology. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 74-103, 2008.

BASHIR, R. Direct DNA Sequencing Using Nanopore Sensors. **Genetic Engineering & Biotechnology News**, 2013.

BAYLEY, H. & CREMER, P.S. Stochastic sensors inspired by biology. **Nature**, v. 413, p. 226-230, 2001.

BAYLEY, H. & JAYASINGHE, L. Functional engineered channels and pores (Review). **Molecular Membrane Biology**, v. 21, p. 209-220, 2004.

BAYLEY, H.; BRAHA, O.; CHELEY, S.; GU, L.Q. Engineered Nanopores. *In: Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives*. Editores: Niemeyer, C. & Mirkin, C. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. p. 93-112, 2004.

BHAKDI, S. & TRANUM-JENSEN, J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiological Research**, v. 55, p. 733-751, 1991.

BHATTACHARYA, S.; MUZARD, J.; PAYET, L.; MATHÉ, J.; BOCKELMANN, U.; AKSIMENTIEV, A.; VIASNOFF, V. Rectification of the Current in α -Hemolysin Pore Depends on the Cation Type: The Alkali Series Probed by Molecular Dynamics Simulations and Experiments. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, p. 4255-4264, 2011.

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

BOSTRÖM, M.; WILLIAMS, D.R.M.; NINHAM, B.W. Specific ion effects: why DLVO theory fails for biology and colloid systems. **Physical Review Letters**, v. 87, p. 1-4, 2001.

BRAHA, O.; GU, L.Q.; ZHOU, L.; LU, X.; CHELEY, S.; BAYLEY, H. Simultaneous stochastic sensing of divalent metal ions. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 1005-1007, 2000.

CHELEY, S.; GU, L.Q.; BAYLEY, H. Stochastic sensing of nanomolar inositol 1,4,5-trisphosphate with an engineered pore. **Chemistry & Biology**, v. 9, p. 829-838, 2002.

CHEN, M.; KHALID, S.; SANSOM, M.S.P.; BAYLEY, H. Outer membrane protein G: Engineering a quiet pore for biosensing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 6272-6277, 2008.

CRACKNELL, J.A.; JAPRUNG, D.; BAYLEY, H. Translocating Kilobase RNA through the Staphylococcal α -Hemolysin Nanopore. **Nano Letters**, v. 13, p. 2500-2505, 2013.

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

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

COLLINS, K.D. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. **Methods**, v. 34, p. 300-311, 2004.

COLLINS, K.D. Ion hydration: Implications for cellular function, polyelectrolytes, and protein crystallization. **Biophysical Chemistry**, v. 119, p. 271-281, 2006.

COLLINS, K.D.; NEILSON, G.W.; ENDERBY, J.E. Ions in water: Characterizing the forces that control chemical processes and biological structure. **Biophysical Chemistry**, v. 128, p. 95-104, 2007.

COULTER, W.H. US Pat., 2656508, 1953.

DAS, S.; VIKALO, H.; HASSIBI, A. On scaling laws of biosensors: a stochastic approach. **Journal of Applied Physics**, v. 105, p. 102021, 2009.

FENNELL, C.J.; BIZJAK, A.; VLACHY, V.; DILL, K.A. Ion pairing in molecular simulations of aqueous alkali halide solutions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, p. 6782-6791, 2009.

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

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

GRIGORJEV, P.A. & BEZRUKOV, S.M. Hofmeister effect in ion transport: reversible binding of halide anions to the roflamycoin channel. **Biophysical Journal**, v. 67, p. 2265-2271, 1994.

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

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

HOFMEISTER F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Zweite Mittheilung. **Archiv for Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v.24, p. 247-260, 1888.

HOWORKA, S. & SIWY, Z. Nanopore analytics: sensing of single molecules. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 2360-2384, 2009.

HÜNENBERGER, P. & REIF, M. Single-Ion Solvation: Experimental and Theoretical Approaches to Elusive Thermodynamic Quantities. RSC Publishing, Cambridge, UK, 2011.

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

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

KASIANOWICZ, J.J.; BRANDIN, E.; BRANTON, D.; DEAMER, D.W. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 13770-13773, 1996.

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

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

KIRIUKHIN, M.Y.; COLLINS, K.D. Dynamic hydration numbers for biologically important ions. **Biophysical Chemistry**, v. 99, p.155-168, 2002.

KIRSCH, J.; SILTANEN, C.; ZHOU, Q.; REVZIN, A.; SIMONIAN, A. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 8733-8768, 2013.

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

KRASILNIKOV, O.V., MERZLYAK, P.G., YULDASHEVA, L.N., RODRIGUES, C.G., BHAKDI, S., VALEVA, A. Electrophysiological evidence for heptameric stoichiometry of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in planar lipid bilayers. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1372-1378, 2000.

KOYUN, A.; AHLATCIOĞLU, E.; İPEK, Y.K. Biosensors and their principles. *In: A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones*. InTech, 2012.

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

KUNZ, W. Specific ion effects in colloidal and biological systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, p. 34-39, 2010.

KUNZ, W. & NEUEDER, R. An Attempt of a General Overview. *In: Specific Ion Effects*. Werner Kunz (University of Regensburg, Germany) (Org.). 1ed. Regensburg/Germany: World Scientific Publishing Co. 2010.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger: Princípios de Bioquímica. Porto Alegre: Artmed, 2011.

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

LEVY, Y. & ONUCHIC, J.N. Water Mediation in Protein Folding and Molecular Recognition. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 35, p. 389-415, 2006.

LIN, I.C.; SEITSONEN, A.P.; COUTINHO-NETO, M.D.; TAVERNELLI, I.; ROTHLIBERGER, U. Importance of van der Waals interactions in liquid water. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, p. 1127-1131, 2009.

LIU, A.; ZHAO, Q.; GUAN, X. Stochastic nanopore sensors for the detection of terrorist agents: current status and challenges. **Analytica Chimica Acta**, v. 675, p. 106-115, 2010.

LYKLEMA, J. Simple Hofmeister Series. **Chemical Physics Letters**, v. 467, p. 217-222, 2009.

LO NOSTRO, P.; NINHAM, B.W.; MILANI, S.; LO NOSTRO, A.; PESAVENTO, G.; BAGLIONI, P. Hofmeister effects in supramolecular and biological systems. **Biophysical Chemistry**, v. 124, p. 208-213, 2006.

LO NOSTRO, P. & NINHAM, B.W. Hofmeister Phenomena: an update on ion specificity in biology. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 2286-2322, 2012.

LÓPEZ-LEON, T.; JÓDAR-REYES, A.B.; VINUESA, O.; BASTOS-GONZÁLEZ. Hofmeister effects on the colloidal stability of an IgG-coated polystyrene látex. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 284, p. 139-148, 2005.

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

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

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

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

NORDLUND, T.M. Quantitative understanding of biosystems: an introduction to biophysics. CRC Press, 2011.

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

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

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

POOLE, P.H.; SCIORTINO, F.; GRANDE, T.; STANLEY, H.E.; ANGELL, C.A. Effect of hydrogen bonds on the thermodynamic behavior of liquid water. **Physical Review Letters**, v. 73, p. 1632-1635, 1994.

REICHARDT, C. & WELTON, T. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry. WILEY-VCH Verlag& Co. Weinheim, Germany, 2011.

RHEE, M. & BURNS, M.A. Nanopore sequencing technology: nanopore preparations. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 174-181, 2007.

RICCARDI, C.S.; COSTA, P.I.; YAMANAKA, H. Amperometric immunosensor. **Química Nova**, v. 25, p. 316-3250, 2002.

ROBERTSON, J.W.; RODRIGUES, C.G.; STANFORD, V.M.; RUBINSON, K.A.; KRASILNIKOV, O.V.; KASIANOWICZ, J.J. Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 20, p. 8207-8211, 2007.

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

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

RODWELL, V.W. & KENNELLY, P.J. Water & pH. In: *Harper's Illustrated Biochemistry*. Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. (org.). McGraw-Hill Companies. p. 5-13, 2003.

ROSEN, C.B.; RODRIGUEZ-LARREA, D.; BAYLEY, H. Single-molecule site-specific detection of protein phosphorylation with a nanopore. **Nature Biotechnology**, 2014.

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

SHELLER, F.W.; WOLLENBERGER, U.; WARSINKE, A.; LISDAT, F. Research and Development in Biosensors. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 35-40, 2001.

SCHNEIDER, G.F.; DEKKER, C. DNA sequencing with nanopores. **Nature Biotechnology**, v. 30, p. 326-328, 2012.

SETHI, R.S. Transducer aspects of biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 9, p. 243-264, 1994.

SHAMAIAH, M. Algorithms and analysis for next generation biosensing and sequencing systems. Tese de Doutorado, University of Texas at Austin, 2012.

STANFORD, V.M.; KASIANOWICZ, J.J.; ROBERTSON, J.W.F.; RODRIGUES, C.G.; KRASILNIKOV, O.V. Single molecule mass or size spectrometry in solution using a solitary nanopore. US 2010/0122907 A1, 2010.

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

TADEO, X.; PONS, M.; MILLET, O. Influence of the Hofmeister Anions on Protein Stability As Studied by Thermal Denaturation and Chemical Shift Perturbation. **Biochemistry**, v.46, p. 917-923, 2007.

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

THÉVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R.A.; WILSON, G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 121-131, 2001.

VLACHY, N.; JAGODA-CWIKLIK, B.; VÁCHA, R.; TOURAND, D.; JUNGWIRTH, P.; KUNZ, W. Hofmeister series and specific interactions of charged headgroups with aqueous ions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 146, p. 42-47, 2009.

VELUSAMY, V.; ARSHAK, K.; KOROSTYNSKA, O.; OLIWA, K.; ADLEY, C. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 232-254, 2010.

VENKATESAN, B.M.; BASHIR, R. Nanopore sensors for nucleic acid analysis. **Nature Nanotechnology**, v. 6, p. 615-624, 2011.

WANG, D.; ZHAO, Q.; DE ZOYSA, R.S.S.; GUAN, X. Detection of nerve agent hydrolytes in an engineered nanopore. **Sensors and Actuators B**, v. 139, p. 440-446, 2009.

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

WANG, J.; ROMÁN-PÉREZ, G.; SOLER, J.M.; ARTACHO, E.; FERNÁNDEZ-SERRA, M.V. Density, structure, and dynamics of water: The effect of van der Waals interactions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 134, p. 024516, 2011.

WANUNU, M. Nanopores: A journey towards DNA sequencing. **Physics of Life Reviews**, v. 9, p. 125-158, 2012.

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

XIE, W.J.; LIU, C.W.; YANG, L.J.; GAO, Y.Q. On the molecular mechanism of ion specific Hofmeister series. **Science China Chemistry**, v. 57, p.36-47, 2014.

YANG, Z. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 144, p. 12–22, 2009.

ZHANG, Y. & CREMER, P.S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister Series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.10, p. 658-663, 2006.

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

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos específicos dos íons da Série de Hofmeister na interação do polímero monodisperso polietilenoglicol de peso molecular 1294 (PEG 1294) com nanoporos protéicos unitários da alfa-hemolisina visando o entendimento dos mecanismos moleculares do processo.

3.1 Objetivos específicos

1. Investigar a influência dos ânions da família VIIA (F^- , Cl^- , Br^- , I^-), formando sais com o K^+ , na interação do PEG com o nanoporo protéico unitário;
2. Investigar a influência dos ânions da família VIIA (F^- , Cl^- , Br^- , I^-) na identificação do PEG e sensibilidade do sensor estocástico baseado no nanoporo unitário;
3. Obter os parâmetros cinéticos de interação do complexo PEG-nanoporo quando banhado por um dos ânions da série de Hofmeister;
4. Determinar a solubilidade do PEG na presença de ânions da série de Hofmeister em meio aquoso;
5. Investigar a influência dos cátions da família IA (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+) e do NH_4^+ , formando sais com o Cl^- , na interação do PEG com o nanoporo protéico unitário;
6. Investigar a influência dos cátions da família IA (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+) e do NH_4^+ na identificação do PEG e sensibilidade do sensor estocástico baseado no nanoporo unitário;
7. Obter os parâmetros cinéticos de interação do complexo PEG-nanoporo quando banhado por um dos cátions da série de Hofmeister;
8. Determinar a solubilidade do PEG na presença de cátions da série de Hofmeister em meio aquoso;
9. Avaliar o grau de organização da água na interação dos ânions de Hofmeister com o PEG usando simulação de dinâmica molecular.

CAPÍTULO 1

Hofmeister Effect in Confined Spaces: Halogen Ions and Single Molecule Detection

Artigo publicado no periódico *Biophysical Journal*.

Fator de impacto: **3.668**

Qualis na área de Ciências Biológicas II: **A2**

Hofmeister Effect in Confined Spaces: Halogen Ions and Single Molecule Detection

Claudio G. Rodrigues, Dijana C. Machado, Annielle M. B. da Silva, Janilson J. S. Júnior, and Oleg V. Krasilnikov*

Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

ABSTRACT Despite extensive research in the nanopore-sensing field, there is a paucity of experimental studies that investigate specific ion effects in confined spaces, such as in nanopores. Here, the effect of halogen anions on a simple bimolecular complexation reaction between monodisperse poly(ethylene glycol) (PEG) and α -hemolysin nanoscale pores have been investigated at the single-molecule level. The anions track the Hofmeister ranking according to their influence upon the on-rate constant. An inverse relationship was demonstrated for the off-rate and the solubility of PEG. The difference among anions spans several hundredfold. Halogen anions play a very significant role in the interaction of PEG with nanopores although, unlike K^+ , they do not bind to PEG. The specific effect appears dominated by a hydration-dehydration process where ions and PEG compete for water. Our findings provide what we believe to be novel insights into physicochemical mechanisms involved in single-molecule interactions with nanopores and are clearly relevant to more complicated chemical and biological processes involving a transient association of two or more molecules (e.g., reception, signal transduction, enzyme catalysis). It is anticipated that these findings will advance the development of devices with nanopore-based sensors for chemical and biological applications.

INTRODUCTION

Because ion-channel proteins are so finely tuned to respond to specific molecules, they serve as models for developing nanopore devices for biomolecular sensing. A single nanometer-scale pore formed by *Staphylococcus aureus* α -hemolysin (α HL) is one of the most promising biological structures for creating a single molecule detector and analyzer. However, further development of these strategies is impeded by several technological and scientific problems, including difficulties in stabilizing a nanopore-membrane complex over a period of time and insufficient understanding of physics that regulate the rate at which molecules enter into nanocavities and the energy of their interactions.

The salting-out effect is a very general phenomenon, in which the solubility of a solute in water is decreased when electrolyte is added. It occurs in cultured microorganisms, in aqueous dispersions of macromolecules and amino acids, in self-assembled amphiphilic structures, in the surface tension of water, and even simple gas molecules (1–8). Cations and anions affect salting-out processes with widely varied effectiveness. The ordering of ions in terms of their effectiveness is known as the Hofmeister series (9–11). In recent years, there has been an explosion in research articles tied to the Hofmeister series (11–14); however, despite this increase in attention, a molecular-level understanding of the Hofmeister series is still lacking. Moreover, to the best of our knowledge there are only four isolated publications related to nanopores: the influence of Hofmeister anion series on α HL channel formation in lipid bilayers (15); the anion-dependent gating of roflamycoin ion channels

(16); and the specific guest-host complexation of the cyclic carbohydrate, γ -cyclodextrin, with adamantane carboxylate inside the pore of α HL channels (17); and the influence of alkali chlorides on α HL channel conductance (18).

Our recent studies with poly(ethylene glycol) (PEG) as an analyte (19,20) demonstrated that an increase in KCl concentration from 1 M to 4 M, leads to high-resolution recording of PEG/ α HL nanopore interactions. The effect of salt concentration is linked with an $\sim$ 100-fold increase in the on- and off-rate constants of the process (21–24). It was suggested that salting-out was responsible for the change in the on-rate constant (22), and consequently for changes in the transition rate and the detection limit.

The goal of this study was:

1. To investigate the influence of halides on a simple bimolecular complexation reaction between monodisperse poly(ethylene glycol) and α -hemolysin nanoscale pores;
2. To reveal whether halogen anions have a specific effect on complex formation; and
3. To disclose the possible mechanism of action.

To achieve this and to improve the sensitivity of nanopore sensors, we performed systematic studies of the kinetics of PEG/ α HL channel interactions to examine the effect of halogen anions. The key finding is that the type of halogen anion strongly influenced PEG/ α HL nanopore interactions. Remarkably, both on-rates and off-rates were affected. The anions track the direct and inverse Hofmeister series for the on-rate, and the off-rate and the solubility of PEG, respectively. The difference among anions spans several hundredfold. The specific effect appears dominated by hydration-dehydration processes where anions and PEG compete for water.

Submitted February 15, 2011, and accepted for publication May 4, 2011.

*Correspondence: kras@ufpe.br

Editor: Hagan Bayley.

© 2011 by the Biophysical Society
0006-3495/11/06/2929/7 \$2.00

doi: 10.1016/j.bpj.2011.05.003

MATERIALS AND METHODS

Wild-type *S. aureus* α -hemolysin (α HL) was purchased from Calbiochem (Madison, WI). 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). High quality (>99.99%) halides (KCl, KF, KBr, and KI) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Monodisperse poly(ethylene glycol), (molecular mass = 1294 g/mol; PEG), was purchased from Polypure (Oslo, Norway). The 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (TRIS) and citric acid were from Schwarz/Mann Biotech (Cleveland, OH) and Fluka (Buchs, Switzerland), respectively.

Solvent-free planar bilayer lipid membranes, with a capacitance of 40 pF, were formed by the lipid monolayer apposition technique, using DPhPC in hexane (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Because it was recently shown that the elevated KCl concentrations considerably improve single molecule identification by unitary protein nanopores (19,20,22), in this study membrane-bathing solutions contained 4 M halide in 5 mM TRIS adjusted to pH 7.5 with citric acid.

PEG1294 was used as a representative analyte and added to the *trans* compartment of the experimental chamber. α HL was added from the *cis* side of the membrane in a concentration sufficient to form unitary protein nanopores in planar lipid membrane. If not mentioned otherwise, the applied potential was 40 mV. A positive current is defined by cation flow from *trans* to *cis*. Single α HL nanopore incorporation and measurement of molecular signature parameters (mean duration and amplitude of the blockage), transition rate, and kinetic constants of the PEG-nanopore interactions were done essentially as described by Rodrigues et al. (22). In short, the on-rate constant, k_{on} , was defined as $1/(C_{PEG} \times \tau_{on})$. The characteristic time, τ_{on} , was obtained from the collected time intervals between the end of one blockade event and the onset of the next. The off-rate constant, k_{off} , was defined as $1/\tau_{off}$ where τ_{off} is the characteristic time of PEG staying in the pore. The constant of PEG- α HL pore complex formation, K_f , was calculated by using the association (on-) k_{on} and dissociation (off-) k_{off} rate constants as k_{on}/k_{off} .

Experiments were done using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) in voltage-clamp mode. Membrane potential was maintained using Ag/AgCl electrodes in 3 M KCl 2% agarose bridges assembled within standard 200- μL pipette tips. Currents were filtered by a low-pass eight-pole Bessel filter (Model 9002; Frequency Devices, Haverhill, MA) at 15 kHz and directly saved into computer memory with a sampling frequency of 50–250 kHz. Experiments employed dilute polymer solutions. The greatest PEG concentration used in bilayer experiments was well below the overlap concentration (~13%) (25) and solubility for this PEG (see Results and Discussion). The limit of PEG solubility was estimated by the modified cloud-point method as described by Rodrigues et al. (22). Inaccuracy was <1%.

RESULTS AND DISCUSSION

Conductance

First, we examined the conductance of single α HL channels surrounded by 4 M solutions of different halides. At the chosen pH (7.5), the channel was in a high conductance state at all transmembrane potentials from -200 mV to $+200$ mV in all solutions. Conductance-voltage curves of α HL channels in KF, KBr, and KI solutions were found to be slightly asymmetric (data not shown), similar to that in KCl (26). Such behavior probably results from the asymmetry in charge distribution between the channel openings and in the channel structure itself. The channel conductance was considerably higher in solutions of KCl, KBr, and KI compared with KF solution (more than one-and-a-half times) (Fig. 1). This finding appears to be in accordance with ionic conductivities

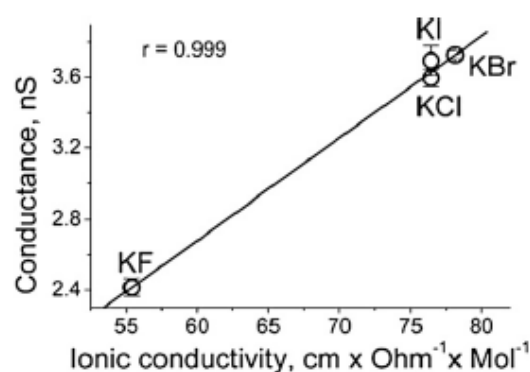


FIGURE 1 The correlation between the ionic conductivity of halogens and the α HL channel conductance (extrapolated to zero voltage) in 4 M halide solutions. Values of α HL channel conductance at zero voltage were obtained by fitting the experimental data points of G/V curves (obtained in the range of ± 200 mV) with second-order polynomial function. (Data points) Means from at least three separate experiments $\pm$ SD. (Line) First-order regression fit of the data. The correlation coefficient is shown in the figure.

of halides (27) because a strong correlation between ionic conductivity of halogen anions and ion channel conductance was established (Fig. 1).

This result is consistent with earlier data for the channel obtained at low salt concentrations (28). In addition, we found that the ability of α HL to form ion channels was influenced considerably by the halogen ion species. It was highest in KCl (~10 pM of α HL is sufficient to form a single channel in the planar lipid bilayer) and smallest in KF solution (where up to 1 nM of α HL must be added). In KBr- and KI-solutions, the channel-forming activity was of intermediate magnitude. The result with KCl, KBr, and KI is consistent with earlier observations that the rate of α HL channel formation is inversely proportional to the size of the anions (15). However, the small channel-forming activity in the presence of KF in the bathing solution was unexpected. This influence of F^- needs further study.

Integral effect

Stable conductance of single α HL channels in all 4 M halide solutions was a prerequisite to using the channel as a sensor element. Using PEG1294 as an analyte, we found that the PEG effect is strongly influenced by anion type, and is voltage- and dose-dependent (Fig. 2). The maximal blocking effect was observed at 40 ± 10 mV. Such behavior is consistent with the findings of Rodrigues et al. (22) and indicates that molecules of nonionic PEG possess an acquired positive charge due to complex formation with K^+ in all halide solutions.

Single molecule events

As expected, high-resolution recordings of PEG/ α HL interactions in the presence of different halides revealed a huge

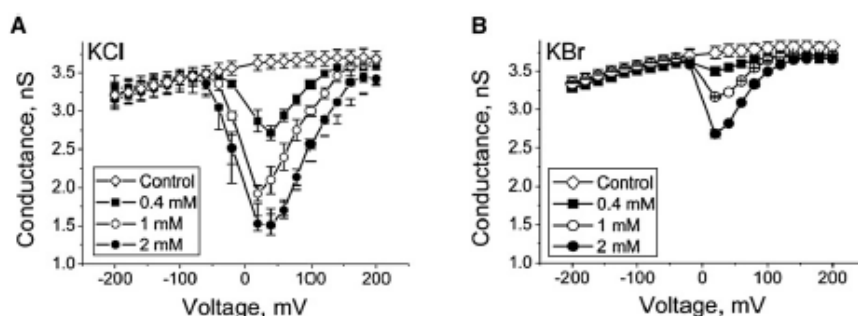


FIGURE 2 Effect of *trans*-side addition of PEG1294 to membrane-bathing solutions on channel conductance. (A) 4 M KCl; (B) 4 M KBr. The result of at least three independent experiments (mean $\pm$ SE) is presented in each case.

difference in the frequency and duration of well-defined current blockades (Fig. 3). Results obtained in KCl, KBr, and KI solutions indicate that the frequency of events is high in the presence of KCl, lower in the presence of KBr, and lowest in 4 M KI. The apparently lower frequency of PEG blockages in KF solution than in KI is delusive because there is a 40,000-fold difference in PEG concentration. It was not possible to use the same PEG concentration with KF-solutions due to much larger on-rate and much lower off-rate constants of the PEG/ α HL interaction (see below). Interpolation of the KF results obtained at low PEG concentration (Fig. 3 D, 10 nM) to larger PEG concentrations projects much higher frequency values than seen in the presence of any other halides.

Rate constants of PEG/ α HL channel interaction

To determine the reason for this anion-specific effect, we analyzed the rate constants of the process by essentially the same method as described recently by Rodrigues et al.

(22). We have demonstrated that the on-rate constant (measured at an optimal 40 mV) is strikingly dependent on type of halogen (Fig. 4 A, *solid line*). The largest on-rate constant was observed with KF in the bath and the smallest in the presence of KI. The difference among on-rate values exceeded two orders of magnitude. The effect of anions follows the Hofmeister series: $F^- > Cl^- > Br^- > I^-$. The influence of anions on the off-rate constant follows the reverse Hofmeister series (Fig. 4 A, *dashed line*). The difference among off-rate values exceeded 20-fold, but was smaller than the difference among on-rate constant values. As a result, the formation constant of the PEG/ α HL channel interaction follows the Hofmeister series (Fig. 4 B). Voltage dependencies of the kinetic constants in KF^- , KBr^- , and KI^- solution resemble those in KCl that we published recently (22). The off- and on-rate constants show turnover behavior with differences up to four orders of magnitude (data not shown). Detailed analysis of the effects of transmembrane voltage on dynamics of PEG- α HL channel interactions deserves careful study. These results will be included in a future work.

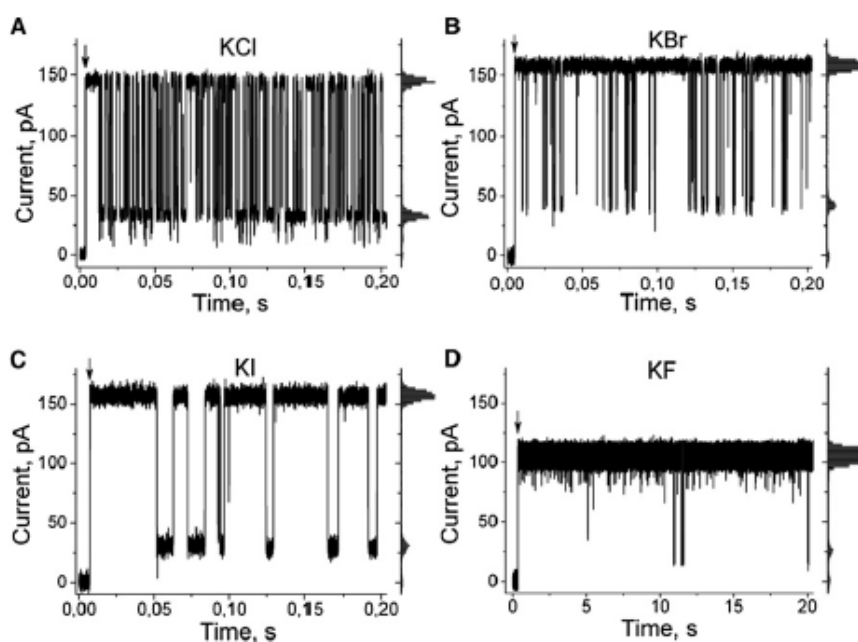


FIGURE 3 Typical traces of the ion current through single α HL channels in the presence of PEG1294 in the bath solution at a time resolution of 0.1 ms. (Arrows) Voltage shift from zero to 40 mV. Halide concentration was 4 M. Concentration of PEG was 400 μ M (for A–C) and 10 nM (for panel D). Note the change in the timescale and PEG concentration from panels A–D. The respective all-point histograms are shown at the right of each record and used to give the mean value of blockade amplitudes. The effectiveness of such inhibition was very similar for all halides and comprised 73–80% of the maximal current.

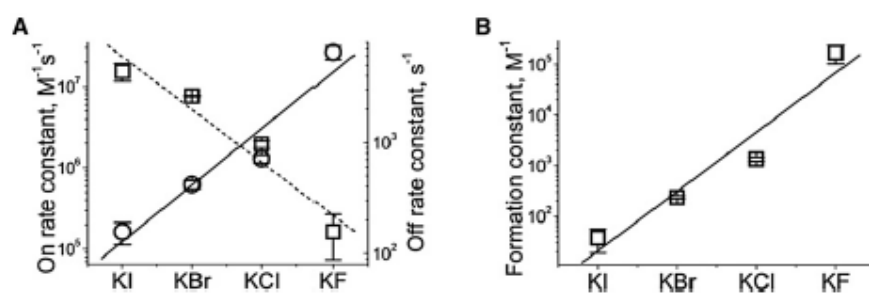


FIGURE 4 Specific ionic effect on the PEG1294/ α HL pore interaction. The average on-rate ($\circ$, solid line), off-rate ($\square$, dashed line) (A), and PEG/ α HL pore complex formation constant (B) in 4 M solutions of different halides. (Data points) Means ($\pm$ SD) of at least three single protein nanopores reconstituted in separate experiments with >5000 events as in Fig. 3. (Lines) Guide for the eye. The data presented in panel A were used to build the dependence shown in panel B.

PEG solubility in halide solutions

Salting-out was shown recently to affect the dependence of the on-rate upon KCl concentration (22). Therefore, we decided to verify whether salting-out is also responsible for the specific anion effects demonstrated above. The solubility of PEG in halide solutions was examined. The type of anion was found to exert a strong influence on PEG solubility. PEG solubility in 4 M KF ($19 \pm 2 \mu\text{M}$) was more than two-orders-of-magnitude smaller than in 4 M KCl ($3840 \pm 390 \mu\text{M}$). On the contrary, PEG solubility in 4 M KBr or 4 M KI was so large that it was not possible to determine precisely. To overcome this difficulty and obtain numerical values for all anions, we carried out experiments with mixed (KF/KCl, KBr/KCl, and KI/KCl) solutions, keeping the total concentration at 4 M (Fig. 5).

Increasing the molar fraction of KF decreases PEG solubility, whereas increasing KBr monotonously increases it. PEG solubility as a function of KI concentration showed an anomalous molar fraction effect. KI decreased the solubility of PEG at small molar fractions, and started to increase only at a KI molar fraction larger than 0.15 (Fig. 5 A, inset). The reason for this effect has yet to be discovered.

Because PEG solubility in 4 M KBr and 4 M KI was practically impossible to determine, the values obtained at 1:1 molar ratios KX/KCl were used to compare with the kinetic constants of PEG/ α HL pore interactions. A strong negative correlation exists between the on-rate constant and solubility, indicating the direct involvement of salting-out in

this effect of halogen ions (Fig. 6 A). A positive correlation was established between the off-rate constant and PEG solubility (Fig. 6 B), reinforcing our conclusion that PEG salting-out dominates the specific effects of halogen ions on the on- and off-rates of PEG/ α HL channel interactions.

Transition rate and detection limit

The PEG effect on α HL channel conductance is dose-dependent (Fig. 2). Recent studies (22–24,29) demonstrated that the event frequency (transition rate, $1/\tau_{on}$) is linearly related to the concentration of molecules of PEGs, cyclodextrin derivatives, and amino acids in KCl and NaCl solutions, thus providing a basis for quantifying these molecules. Here we have demonstrated that it is true for PEG in all halide solutions. In all cases the transition rate was directly proportional to analyte concentration (PEG in this case) with a slope of ~ 1 (0.97 ± 0.06) (Fig. 7). This finding suggests that the partitioning of analyte into the α HL pore can be described by a first-order reaction. Assigning reasonably the detection limit as a background equivalent PEG concentration at 1-Hz event frequency, we have established that it equals 8.0, 2.0, 0.5, and $0.05 \mu\text{M}$ (PEG1294) at 4 M of KI, KBr, KCl, and KF, respectively (Fig. 7). It is evident that the sensitivity of α HL pores to PEG depends crucially on anion type and is more than two-orders-of-magnitude higher in KF than in KI solutions.

It is known that experimental parameters, including pH, temperature, ionic strength, and applied potential have considerable influence on the resolution and sensitivity of stochastic

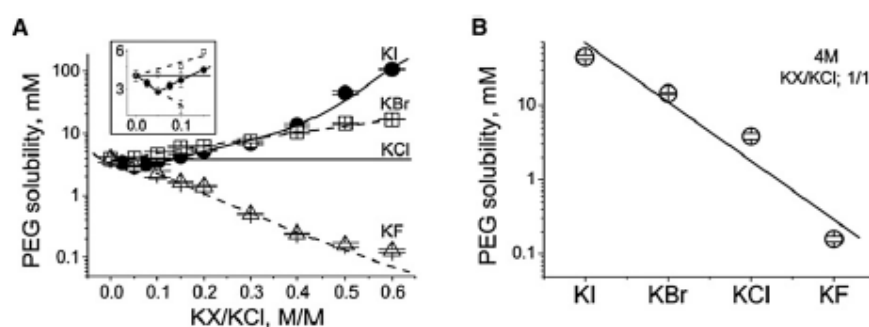


FIGURE 5 Solubility of PEG in 4 M halide solutions. (A) PEG solubility as a function of different molar fractions of KF, KBr, and KI in KCl solution. (Inset) The zone of the anomalous molar fraction effect for KI/KCl mixtures visualized at higher resolution. (B) Solubility of PEG at 1:1 (M/M) KX/KCl ratio, where X represents F^- , Br^- , or I^- . (Lines) Guide for the eye. Total salt concentration was 4 M. (Data points) Means of 5–8 separate experiments $\pm$ SD.

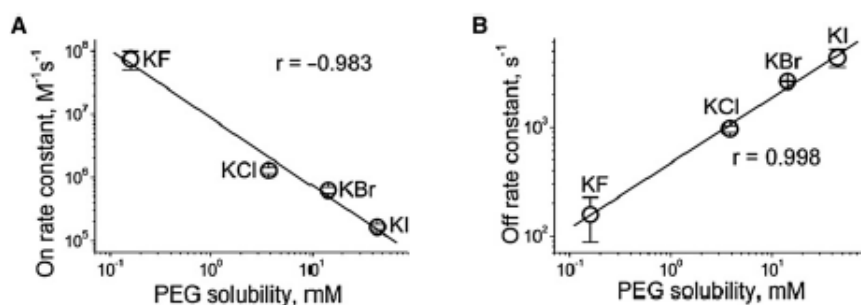


FIGURE 6 The on-rate (A) and off-rate (B) constants of PEG/ α HL channel interaction as a function of PEG solubility. (Data points) Means of 5–8 separate experiments $\pm$ SD for solubility and at least three separate experiments for the rate constants. (Lines) First-order regression fits of the data. The correlation coefficient is shown in the figure.

detection. We have shown here that it could be significantly improved by simply using an appropriate type of electrolyte.

The role of hydration

In this study, halides were used at the same high (4 M) concentration where the difference in electrostatic interactions between analyte molecules and nanopore channels is significantly limited. However, a huge difference in kinetic constants of PEG/ α HL channel interactions was established, indicating the specific ion effect (Hofmeister) in confined spaces such as those of protein nanopores. The competition between ions and analyte for water is frequently noted as one possible reason for Hofmeister effects. To verify that this competition is responsible for the observed effect of halides on PEG/ α HL channel interactions, a correlation analysis between the rate-constants and anion hydration enthalpy of anions were demonstrated (Fig. 8). Higher hydration of the anion resulted in a higher probability of the interaction and the stronger stability of the complex.

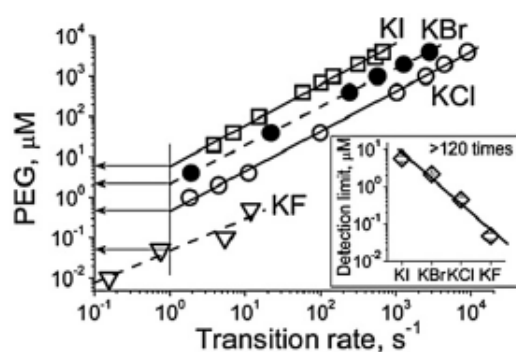


FIGURE 7 Transition rate and PEG concentration. The concentration of PEG1294 as a function of the transition rate in different halide solutions. (Lines) First-order regression fits of the data with a slope of 0.97 ± 0.06 . (Data points) Means of at least three separate experiments. Standard deviations were omitted for clarity. (Horizontal arrows) Background equivalent PEG concentration at an event frequency of 1 Hz. (Inset) The background equivalent PEG concentration at different halide solutions. The number shown in the figure is the difference in values obtained in KI and KF solutions.

Higher hydration means that a large number of water molecules are bound to ions so that fewer of them are available to interact with cosolute (PEG, in this case). Because of this competition between ions and cosolute for water, it appears that ions exclude cosolutes from the bath to the protein nanopores which serve as harbors. Hence, the confined space presents more favorable conditions for PEG to compete with ions for water, indicating that the confined water is more accessible to PEG (and, probably, for other analytes (cosolute)). The existence of water that is accessible to nonionic analytes (confined water) accords with the presence of a hydration water layer at nanopore surfaces, where the presence of ions is severely restricted (30,31) and with remarkable decreases in the hydration number for ions confined in nanospaces (32).

Electroosmotic flow

All experiments presented in our study were made at high (4 M) salt concentrations. At first glance, a significant electroosmotic flow through α HL channel would not be expected under these conditions because it is known (26) that the cation-anion selectivity of α HL channel at high KCl concentrations is close to zero. This means that the channel is unselective and the transport number of cations and anions is equal to ~ 0.5 . On the other hand, it seems reasonable to assume that for this condition (nonselective channel), the water transported per ion might be equal to that in the primary hydration sphere. Thereby one would expect that despite a similar transport number between cations and anions, the net water transport will not equal zero, because the hydration numbers of the anions (4.97, 2.87, 2.30, and 1.67 (27) for F^- , Cl^- , Br^- , and I^- , respectively) are significantly different from the hydration number for K^+ (3.33).

Moreover, the anions rank in Hofmeister series according to their hydration number. If this parameter dominated the kinetics of PEG/ α HL channel interactions, the on-rate constant might be largest in KI and the lowest in KF solution, that is, exactly the opposite to the established dependence (Fig. 4 A). Ionic mobility is another important characteristic of ions that could influence the results. However, their ionic mobilities do not correspond to their

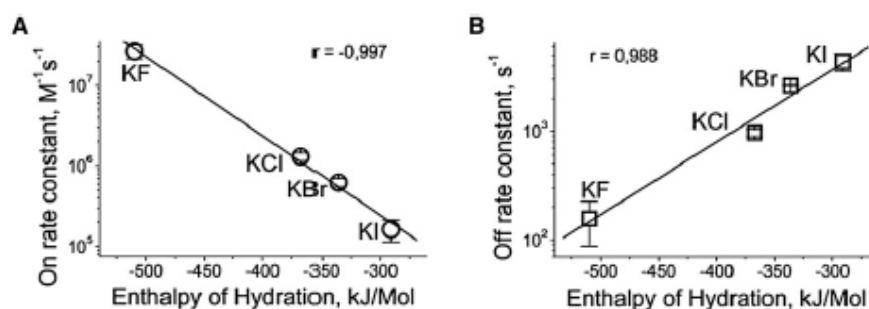


FIGURE 8 Rate constants of PEG/ α HL channel interactions in halide solutions as function of hydration enthalpy of anions. Enthalpy values were taken from Marcus (27). The correlation coefficient is shown in the figure.

rank in the Hofmeister series: F^- has the lowest mobility ($55.4 \text{ cm}^2 \text{ Ohm}^{-1} \text{ Mol}^{-1}$), whereas the mobilities of other three anions are close to each other ($76.4\text{--}78.1 \text{ cm}^2 \text{ Ohm}^{-1} \text{ Mol}^{-1}$) (27). The foregoing reasons permit us to conclude that in 4 M potassium halide solutions, electroosmotic flow does not significantly affect the observed dynamics, if at all.

CONCLUDING REMARKS

In this work, we systematically investigated the interaction of the nonionic polymer, PEG, with a protein pore formed by α HL in planar lipid bilayers in solutions of different halides. We found that the type of anion has very strong influence on the rate constants of the process (the difference reaches several hundredfold). As a consequence, the transition rate and the detection limit of the nanopore-based sensor were correspondingly changed. All probed anions follow the Hofmeister ranking according to their influence on the on-rate constant ($F^- > Cl^- > Br^- > I^-$). An inverse relationship was demonstrated for the off-rate and the solubility of the analyte ($F^- < Cl^- < Br^- < I^-$). Therefore, a salting-out phenomenon is responsible for the anion-induced effect on single molecule detection with solitary protein nanopores. The specific effect appears dominated by hydration-dehydration (chemical) processes where ions and cosolutes compete for water.

We have shown that halogen ions play a very significant role in creating conditions for polymers to interact with the nanopores although K^+ (not anions) binds with PEG (22,33,34). Anion influence may provide an explanation for why the residence time for PEG in KCl solution is ~ 100 -fold longer than expected from a theoretical model based on an electrostatic (Poisson-Nernst-Planck) approach (35). Hereby our findings provide what we believe to be previously undescribed insights into physicochemical mechanisms involved in single-molecule interactions with nanopores. The results will advance the development of devices with nanopore-based sensors for chemical and biological applications. Moreover, though our study deals with a simple first-order kinetic complexation reaction, our results are clearly relevant for more complicated chemical and biological processes, which involve a transient association

of two or more molecules (e.g., reception, signal transduction, enzyme catalysis) where the hydration-dehydration reactions occur.

The authors thank Dr. Steven D. Aird (University of Maryland, University College Asia) for editing that improved the clarity of the manuscript.

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, a Rede de Nanotecnologia Molecular e de Interfaces, and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Nanotecnologia Para Marcadores Integrados, Brazil.

REFERENCES

- Lo Nostro, P., B. W. Ninham, ..., P. Baglioni. 2006. Hofmeister effects in supramolecular and biological systems. *Biophys. Chem.* 124: 208–213.
- Koynova, R., J. Brankov, and B. Tenchov. 1997. Modulation of lipid phase behavior by kosmotropic and chaotropic solutes: Experiment and thermodynamic theory. *Eur. Biophys. J.* 25:261–274.
- Collins, K. D., and M. W. Washabaugh. 1985. The Hofmeister effect and the behavior of water at interfaces. *Q. Rev. Biophys.* 18:323–422.
- Lo Nostro, P., B. W. Ninham, ..., P. Baglioni. 2005. Specific ion effects on the growth rates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Phys. Biol.* 2:1–7.
- Lopez-Leon, T., M. J. Santander-Ortega, ..., D. Bastos-Gonzalez. 2008. Hofmeister effects in colloidal systems: influence of the surface nature. *J. Phys. Chem. C* 112:16060–16069.
- Zhou, H. X. 2005. Interactions of macromolecules with salt ions: an electrostatic theory for the Hofmeister effect. *Proteins* 61:69–78.
- Zhang, Y. J., and P. S. Cremer. 2006. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10: 658–663.
- Jungwirth, P., and D. J. Tobias. 2006. Specific ion effects at the air/water interface. *Chem. Rev.* 106:1259–1281.
- Hofmeister, F. 1888. Doctrine of the effect of the salts. Second communication [Zur lehre von der wirkung der salze. Zweite mittheilung]. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 24:247–260.
- Kunz, W., P. Lo Nostro, and B. W. Ninham. 2004. The present state of affairs with Hofmeister effects. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 9: 1–18.
- Zhang, Y., and P. S. Cremer. 2010. Chemistry of Hofmeister anions and osmolytes. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 61:63–83.
- Jungwirth, P. 2009. Spiers Memorial Lecture. Ions at aqueous interfaces. *Faraday Discuss.* 141:9–30, discussion 81–98.
- Freire, M. G., C. M. S. S. Neves, ..., J. A. Coutinho. 2010. ^1H NMR and molecular dynamics evidence for an unexpected interaction on the origin of salting-in/salting-out phenomena. *J. Phys. Chem. B* 114:2004–2014.
- Zhang, Y. J., and P. S. Cremer. 2009. The inverse and direct Hofmeister series for lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:15249–15253.

15. Krasilnikov, O. V., R. Z. Sabirov, and B. A. Tashmukhamedov. 1986. The influence of ionic composition of the medium on the dynamics of staphylo toxin channel formation in BLM. *Biologicheskie Membrany*. 3:1057–1061.
16. Grigorjev, P. A., and S. M. Bezrukov. 1994. Hofmeister effect in ion transport: reversible binding of halide anions to the roflamycoin channel. *Biophys. J.* 67:2265–2271.
17. Gumev, P. A., D. Harries, ..., S. M. Bezrukov. 2009. The dynamic side of the Hofmeister effect: a single-molecule nanopore study of specific complex formation. *ChemPhysChem*. 10:1445–1449.
18. Bhattacharya, S., J. Muzard, ..., V. Viasnoff. 2011. Rectification of the current in α -hemolysin pore depends on the cation type: the alkali series probed by molecular dynamics simulations and experiments. *J. Phys. Chem. C*. 115:4255–4264.
19. Krasilnikov, O. V., C. G. Rodrigues, and S. M. Bezrukov. 2006. Single polymer molecules in a protein nanopore in the limit of a strong polymer-pore attraction. *Phys. Rev. Lett.* 97:018301.
20. Robertson, J. W., C. G. Rodrigues, ..., J. J. Kasianowicz. 2007. Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:8207–8211.
21. Orlik, F., B. Schiffer, and R. Benz. 2005. Anthrax toxin protective antigen: inhibition of channel function by chloroquine and related compounds and study of binding kinetics using the current noise analysis. *Biophys. J.* 88:1715–1724.
22. Rodrigues, C. G., D. C. Machado, ..., O. V. Krasilnikov. 2008. Mechanism of KCl enhancement in detection of nonionic polymers by nanopore sensors. *Biophys. J.* 95:5186–5192.
23. Zhao, Q., D. A. Jayawardhana, and X. Guan. 2008. Stochastic study of the effect of ionic strength on noncovalent interactions in protein pores. *Biophys. J.* 94:1267–1275.
24. Nestorovich, E. M., V. A. Karginov, ..., S. M. Bezrukov. 2010. Blockage of anthrax PA63 pore by a multicharged high-affinity toxin inhibitor. *Biophys. J.* 99:134–143.
25. Zitsman, V. Y., A. M. Berezhkovskii, ..., S. M. Bezrukov. 2005. Non-ideality of polymer solutions in the pore and concentration-dependent partitioning. *J. Chem. Phys.* 123:146101.
26. Krasilnikov, O. V., P. G. Merzlyak, ..., M. F. Capistrano. 2005. Protein electrostriction: a possibility of elastic deformation of the α -hemolysin channel by the applied field. *Eur. Biophys. J.* 34:997–1006.
27. Marcus, Y. 1997. *Ion Properties*. Marcel Dekker, New York.
28. Krasilnikov, O. V., and R. Z. Sabirov. 1989. Ion transport through channels formed in lipid bilayers by *Staphylococcus aureus* α -toxin. *Gen. Physiol. Biophys.* 8:213–222.
29. Movileanu, L., S. Cheley, and H. Bayley. 2003. Partitioning of individual flexible polymers into a nanoscopic protein pore. *Biophys. J.* 85:897–910.
30. Bek, S., and E. Jakobsson. 1994. Brownian dynamics study of a multiply-occupied cation channel: application to understanding permeation in potassium channels. *Biophys. J.* 66:1028–1038.
31. Li, S. C., M. Hoyle, ..., S. H. Chung. 1998. Brownian dynamics study of ion transport in the vestibule of membrane channels. *Biophys. J.* 74:37–47.
32. Kaneko, K., T. Ohba, ..., S. Iijima. 2005. Nanospace molecular science and adsorption. *Adsorption*. 11:21–28.
33. Okada, T. 1991. Thermodynamic origin of selectivity in polyoxyethylene complexes with alkali cations. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 17:1209–1210.
34. Harris, J. M. 1992. Introduction of biotechnical and biomedical applications of poly(ethylene glycol). In *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*. J. Milton Harris, editor. Springer, New York. 1–14.
35. Reiner, J. E., J. J. Kasianowicz, ..., J. W. Robertson. 2010. Theory for polymer analysis using nanopore-based single-molecule mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107:12080–12085.

CAPÍTULO 2

Effects of alkali and ammonium ions in the detection of
poly(ethyleneglycol) by alpha-hemolysin nanopore sensor

Artigo publicado no periódico *RSC Advances: An international journal to further the chemical sciences*.

Fator de impacto: **3.289**

Qualis na área de Ciências Biológicas II: **A2**

PAPER

Cite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 56647

Effects of alkali and ammonium ions in the detection of poly(ethyleneglycol) by alpha-hemolysin nanopore sensor†

Dijana C. Machado, Janilson J. S. Júnior, Maria C. A. Melo, Annielle M. B. Silva, Adriana Fontes and Claudio G. Rodrigues*

Nanopores have emerged as molecule detectors and more studies are necessary to clarify the analyte–nanopore interaction. Here, we report the influence of cations of the Hofmeister series on a simple bimolecular complexation reaction between poly(ethyleneglycol) (PEG) and α -hemolysin (α HL) nanopore at the single-molecule level. The kinetic constants (on-rate and off-rate) of interaction of PEG molecules with α HL nanopore depend strongly on the type of cation. In the case of on-rate constant, the difference reaches several dozen times. As a consequence of this, both transition rate and detection limit of the nanopore-based sensor were changed. An inverse relationship was demonstrated for the off-rate constant and the solubility of PEG. Except lithium, the other alkali metal cations significantly affect the interaction of PEG with the nanopore and, similarly to potassium, they also bind to this polymer. Thus, the PEG/ α HL nanopore interaction can be strongly influenced by the type of cation. The cation-induced specific effect on polymer detection with a single α HL nanopore appears to occur by competition of the cation and PEG by water. Finally, our results represent a guide to select the appropriate physicochemical conditions that enhance the analyte–nanopore interaction, thereby improving the sensitivity of nanopore-based sensors.

Received 10th April 2016

Accepted 7th June 2016

DOI: 10.1039/c6ra09234a

www.rsc.org/advances

Introduction

In the late 19th century, Franz Hofmeister began systematic studies into specific ion effects.¹ In these studies, employing salts with a common anion or cation, it was observed that some salts have a particular ability to precipitate proteins in aqueous solution.^{2,3} Such findings originated the Hofmeister series which is a ranking of the physical properties of ions in aqueous solutions.⁴ In this series ions can be classified into two groups: kosmotropes (structure makers) and chaotropes (structure breakers), according to their strength of hydration.^{5,6} The typical order of the ions from the Hofmeister series is generally for anions: $\text{SO}_4^{2-} > \text{OH}^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{SCN}^- > \text{ClO}_4^-$, and for cations: $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$.⁷ Interestingly, there is not a constant sequence of ions. The experimental type and conditions, electrostatic and non-electrostatic interactions can alter the Hofmeister sequence.⁸ For example, the effectiveness of anions to induce protein crystallization depends on the net charge of the protein;

acidic proteins obey the Hofmeister series and the anion order to basic proteins is reversed.⁹ Additionally, the Hofmeister ions effects depend on salt concentration,¹⁰ the cloud-point temperature of the positively charged macromolecules exhibits a direct Hofmeister series at high salt concentration and an inverse Hofmeister series at low salt concentration.^{10,11}

Since its initial discovery involving the study of protein precipitation about over century ago,^{1,2} the Hofmeister series has been shown to be observed in a wide range of phenomena not only related to protein chemistry but also to colloids, surfaces, membranes, and polymer chemistry.^{12–14} What, at a molecular level, causes the Hofmeister series? Numerous reports have been published to address this question. However, a molecular-level comprehension of the Hofmeister series is still lacking. The hypothesis proposed so far seem to fall into the following two categories. The first one relates the specific ion effect with the different influences of ions on water structure.^{14,15} However, there is growing the number of observations that bulk water structure is not responsible for phenomena related to the Hofmeister series.^{16–18} The second hypothesis suggests that the Hofmeister effects are the result of the preferential interactions ion-solute.^{3,19,20} Despite of that the salting-out effect has been found to be a very general phenomenon there are few systematic studies about the specific ion effects on the molecule interaction in confined spaces as protein nanopores.^{21–24} One of the first studies about the influence of ions on

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

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

protein nanopore was performed by Grigorjev and Bezrukov in 1994.²¹ They investigated the halide anions (F^- , Cl^- , Br^- , I^-) effects on biophysics properties of the roflamycoin ion channels and established both conductance and ionic selectivity depend of halide type used in the bath solution. Protein nanopores have played an important role in the stochastic sensing technology.^{25,26} Stochastic sensing is an approach that relies on the observation of individual binding events between analyte molecules and a single receptor.²⁵ An important example is the protein nanopore formed by α -hemolysin of *Staphylococcus aureus* (α HL). The α HL is a pore-forming toxin, its monomers assemble in a lipid membrane forming a heptameric nanopore.²⁵ The α HL nanopore provides a highly confined space which it allows the detection of divalent ions,^{27,28} enantiomers,^{29,30} various types of organic molecules,^{31–35} peptides,^{36–38} proteins^{39–41} and DNA.^{42–45}

In our previous studies,^{24,46,47} we have used a simple system composed of α HL nanopore in a planar lipid bilayer and poly(ethyleneglycol) (PEG) as a molecular probe. Initially, we investigated how the KCl salt concentration could affect the nanopore sensitivity.⁴⁶ We demonstrated that the increase in KCl salt concentration from 1 M to 4 M improves the nanopore sensitivity and consequently refines analyte identification. Posteriorly, we performed studies about the effects of halogen anions on the kinetics of PEG/ α HL nanopore interaction.^{24,47} We established that the type of anion strongly influences all kinetics constants of PEG/ α HL interactions. This system proves to be helpful and allowed us to elucidate details about the ion effects in confined systems as the α HL nanopore.^{24,47} Thus, in the present study, we investigated the effects of alkali and ammonium ions in the PEG/ α HL nanopore interaction.

Experimental

Materials and methods

The wild type of *S. aureus* α -hemolysin was purchased from Calbiochem (Madison, WI). 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). The high quality (>99.99%) of salts (LiCl, NaCl, KCl, RbCl, CsCl, and NH_4Cl) was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Monodisperse poly(ethylene glycol), PEG1294, was purchased from Polypure (Oslo, Norway). 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (TRIS) and citric acid was from Schwarz/Mann Biotech (Cleveland, OH) and Fluka (Buchs, Switzerland), respectively. All chemicals and solvents were of analytical-grade and used as received, without further purification. High-purity water was obtained after a Milli-Q plus (Billerica, USA) treatment. Solvent-free planar bilayer lipid membranes, with capacitance of 40 pF, were formed by the lipid monolayer apposition technique,⁴⁸ using DPhPC in hexane (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) at 25 ± 1 °C. As elevated KCl concentrations considerably improve single molecule identifications by unitary protein nanopores⁴⁶ in the experiment presented herein the membrane-bathing aqueous solutions contained 4 M of alkali- or ammonium-chloride, 5 mM TRIS–citric acid, pH 7.5. Single α HL nanopore incorporation and the measurements of parameters related to the molecular signature (mean

duration and amplitude of the blockage), transition rate and kinetic constants of the PEG–nanopore interaction were done essentially as described elsewhere.²⁴ α HL is the protein most frequently used to create nanopore for the development of stochastic biosensing elements. In our study α HL was added from the “cis” side of the membrane in concentration sufficient to form a unitary protein nanopore in planar lipid bilayer. We have used monodisperse PEG1294 as a representative of analyte and it was added to the “trans” compartment of the experimental chamber. Experiments were done using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) in voltage clamp mode. Membrane potential was maintained using Ag/AgCl electrodes in 3 M KCl 2% agarose bridges assembled within standard 200 μ L pipette tips. Currents were filtered by a low-pass eight-pole Bessel filter (Model 9002, Frequency Devices, Haverhill, MA) at 15 kHz and directly saved into the computer memory with a sampling frequency of 100–250 kHz. The limit of PEG solubility was estimated by the modified cloud-point method as described before.⁴⁶ The inaccuracy was less than 1%.

Results and discussion

α HL nanopore conductance in 4 M chloride solutions

The use of any experimental system demands knowledge of its basic properties. Thus, we started our study investigating the conductance/voltage dependence of α HL nanopore in the presence of 4 M solutions of different alkali chlorides and ammonium chloride. The voltage dependence of the nanopore conductance and of the current rectification was characterized for each salt type. Results are shown in Fig. 1a. All the curves are asymmetric with respect to the applied voltage, and the conductances are in the range 1.5–4 nS. The conductance of α HL nanopore is voltage dependent and increases continuously from –200 to 200 mV. Such behaviour results from the asymmetry in charge distribution between the channel openings and in the channel structure itself, which leads to different contributions of cation and anion to the current at positive and negative voltages.^{49,50} The conductance of α HL nanopore was the lowest in the presence of LiCl. Using KCl, RbCl, CsCl and NH_4Cl we observed very similar large values of conductance for the channel, and in solution of NaCl the conductance presented intermediate values. However, the detailed analysis showed that the nanopore conductance ($NH_4^+ > K^+ > Cs^+ \geq Rb^+ > Na^+ > Li^+$) does not rank with the lyotropic ($Li^+ > Na^+ > K^+ > NH_4^+ > Rb^+ > Cs^+$) order.⁵¹ The different sequences observed above may occur, probably, due to the different types of intermolecular interactions involving the system cation/solvent/cosolute.⁵²

An intrinsic feature of majority protein ion channels is their ability to rectify the ionic current and the α HL nanopore is one of its. The rectification ability of this nanopore has been the subject of extensive experimental and theoretical studies.^{49,50,59,60} Following these studies, we defined the current asymmetry as (I_+/I_-) , where I_+ and I_- are the absolute values of the current at positive and negative voltages, respectively. Fig. 1b shows that the asymmetry is largest at large voltages and decreases to 1 in the limit $V \sim 0$. For the LiCl electrolyte, the

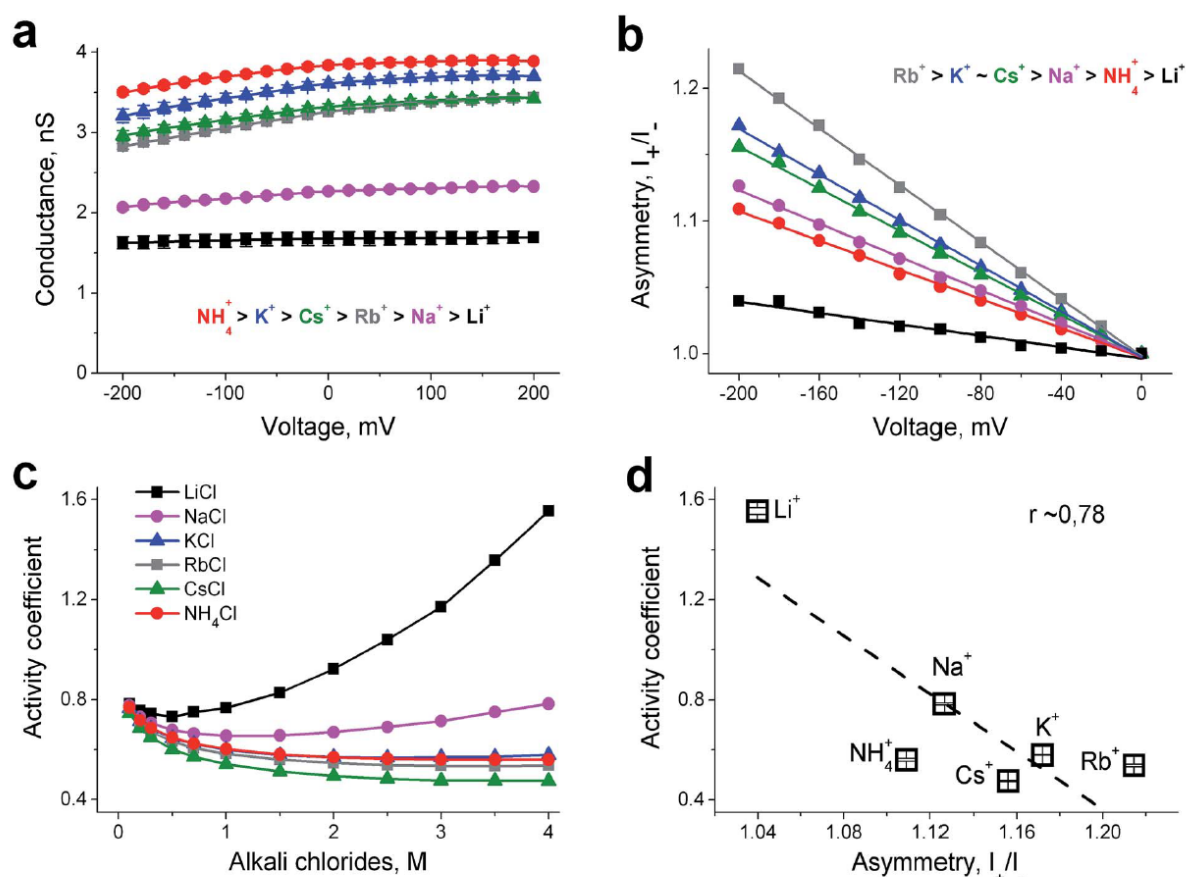


Fig. 1 Voltage-dependent conductance (G – V curve) of α HL nanopore (a) and the asymmetry factor (I_+/I_-) (b) measured using 4 M solution of Li^+ (black squares), Na^+ (pink circles), K^+ (blue triangles), Rb^+ (gray squares), Cs^+ (green triangles) and NH_4^+ (red circles) chloride. Activity coefficient of alkali- and ammonium chlorides as a function of its concentration (c) and asymmetry of G – V curves (d). Values of the activity coefficients were taken from the literature.^{53–58} Dashed line is a first-order regression for the data. Correlation coefficient is shown in figure. Lines were drawn to guide the eye. First-order regression was used to fit the data and the standard deviations were omitted for clarity.

asymmetry factor is below 1.04 (at 200 mV), whereas it can rise to 1.2 for the RbCl electrolyte. Hence, the current rectification does not follow the lyotropic order also. Therefore, the rectifying property of the channel is modified in a nontrivial way when the type of cations is changed. We found that the asymmetry ranks as: $\text{Rb}^+ > \text{K}^+ \sim \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Li}^+$. As it was shown elsewhere^{49,50,61} the asymmetry is decreased according to KCl concentration (and conductivity of the solution) due charge screening in the nanopore wall. Thus, how the solution with lowest conductivity (LiCl) is managed to screen the charge more effectively than the solutions of other electrolytes with larger conductivities? Trying to solve the puzzle we have inspected how the properties of the alkali chloride solution change with concentration. Activity coefficient attracts our attention because it changes considerably with the ionic concentration in a nonlinear way (Fig. 1c). As a result, we have found that the activity coefficient for LiCl was several times larger than all other salts used at high 4 M concentration. It means that ions in 4 M LiCl are much more independent (uncombined) and available to screen charge at the nanopore wall than others. It created expectation to explain our asymmetry data *via* activity of

electrolytes. The direct confronts these data with our asymmetry results is shown in Fig. 1d. Actually, the reasonably good correlation between these two parameters was found that confirming the expectation. Additionally, Bhattacharya and collaborators⁴⁹ also observed that the current rectification of α HL nanopore depends on the type of cation and it was weakest in the presence of Li^+ . By molecular dynamics (MD) simulations, they found that there is a differential interaction of cations to the charged residues of α HL nanopore, which modulates the current properties. In the case of LiCl, Li^+ ions bind to negatively charged groups localized inside of “trans” side of nanopore, shielding electrically this region.

Integral effect of PEG at α HL nanopore conductance: voltage dependence

Fig. 2 demonstrates the influence of several concentrations of PEG at the nanopore conductance in alkali- and ammonium chloride solutions. The maximal suppression of PEG-induced on the α HL nanopore conductance was always observed at 40 ± 10 mV (except for LiCl and NH_4Cl). It could be seen that the α HL nanopore conductance suppression is dose-dependent of

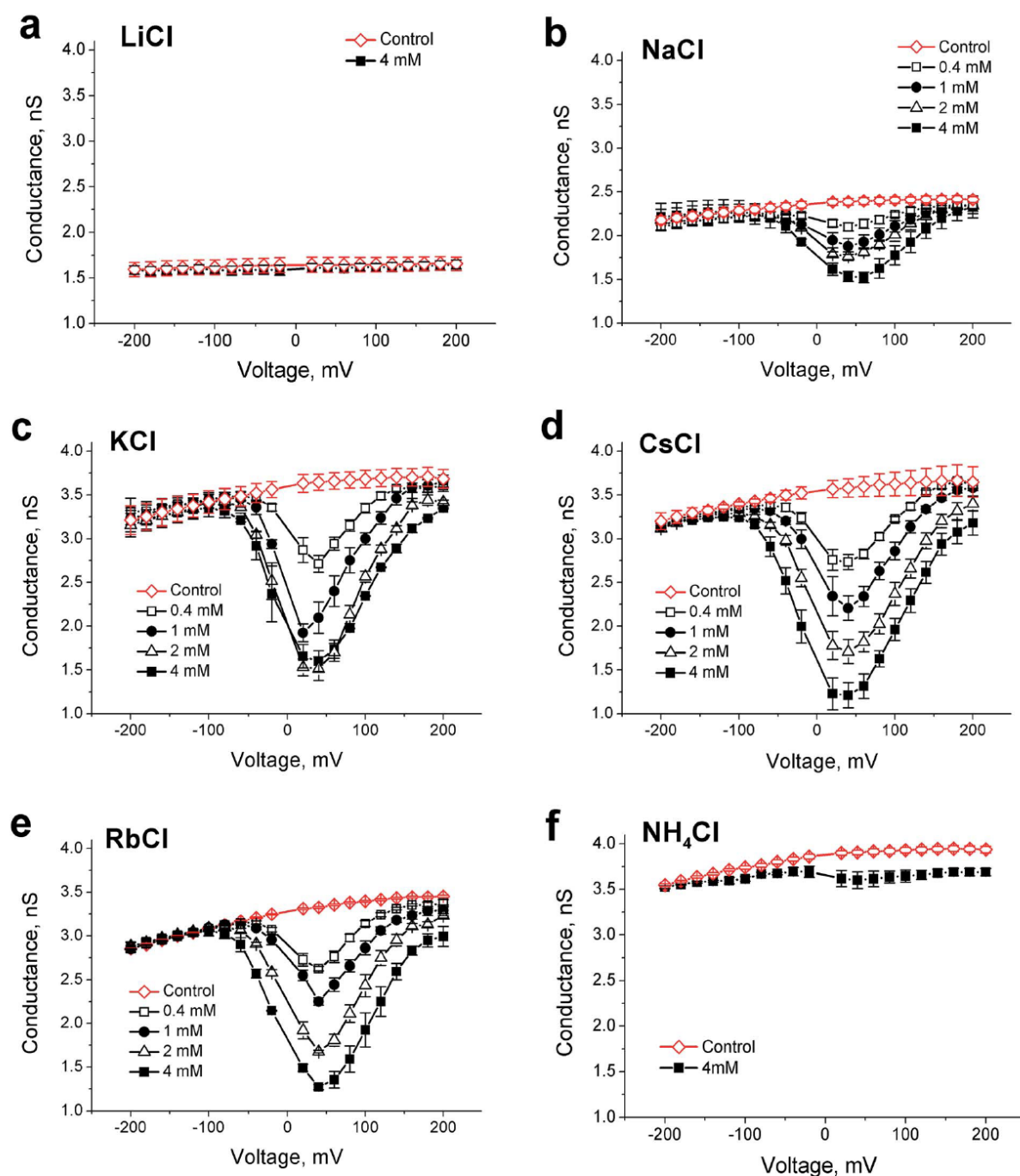


Fig. 2 Effect of *trans*-side addition of PEG1294 to membrane-bathing solutions on nanopore conductance. PEG concentrations and type of salt are shown in figure. The result of at least three independent experiments (mean $\pm$ SE) is presented in each case.

PEG concentration and that the type of cation performs considerable influence on it. Very small effect was observed when the bath solution was composed from LiCl or NH₄Cl. The induced PEG conductance suppression was not very large in the presence of NaCl. On the other hand, the strong decrease in the nanopore conductance was established for KCl, RbCl and CsCl (Fig. 2). Thus the effect of monovalent ions is not only voltage- and dose-dependent, but strongly depends on type of cation.

The results extend our knowledge about the specific ion influence in confined spaces indicating that not only anions,^{22,24} but cations possess ability to modify interaction of polymer with protein nanopores considerably.

Single molecule events: appearance and frequency

Typical high resolution recordings in the presence of PEG are shown in Fig. 3. A large ionic current flows through a single α HL

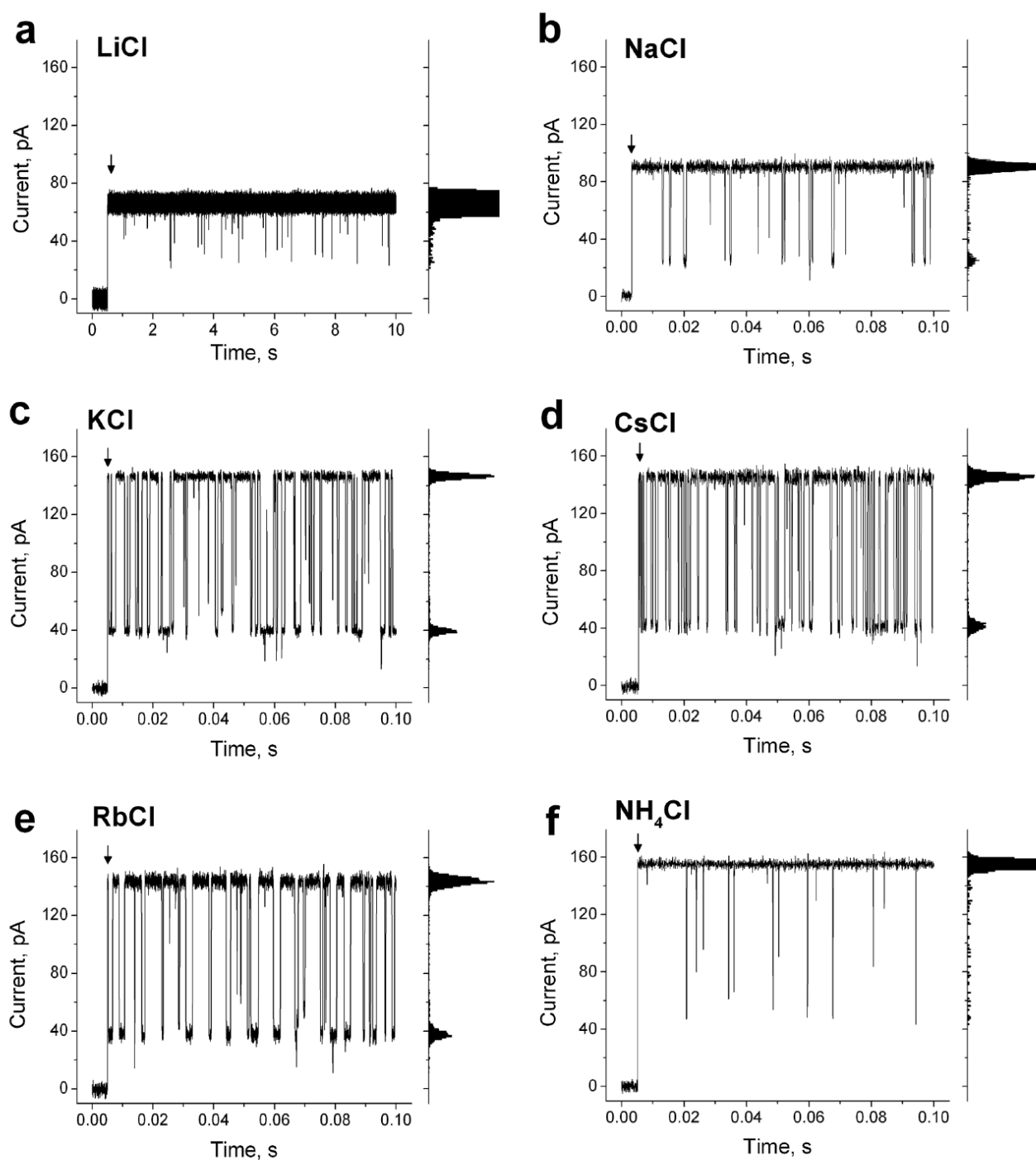


Fig. 3 Typical traces of the ion current through single α HL nanopore in the presence of PEG1294 in the bath solution at a time resolution of 0.1 ms. (Arrows) Voltage shift from zero to 40 mV. Alkali- or ammonium chloride concentration was 4 M. Type of the electrolyte is shown in figure. The concentration of PEG was 400 μ M. It can be seen that only in panel (a) the timescale changes in relation to the panels (b)–(f). The respective all-point histograms are shown at the right of each record and were used to give the mean value of blockage amplitudes.

nanopore when its aqueous lumen is free of PEG. In the presence of PEG, the ion current through the single α HL nanopore exhibits stepwise transitions between completely open and partially blocked states. Each decrease and subsequent increase in the ionic current corresponds to a single PEG molecule

entering and exiting the pore, respectively. The amplitude, frequency, and duration of these transient steps depend on the electrolyte type. The all-points histograms of the ionic current (Fig. 3 right) demonstrate that level of PEG induced current blockage is practically the same ($72 \pm 3\%$) for NaCl, KCl, CsCl

and RbCl while it is considerably smaller in the presence of NH_4Cl and LiCl ($\sim 66 \pm 2\%$ and $\sim 58 \pm 3\%$, respectively). Other considerable difference in respect to the PEG influence on the current passing through αHL nanopore is the frequency of the events. Looking at the records, (Fig. 3) it could be easily perceived that the frequency is very small when the bath solution consisted of LiCl, larger in NH_4Cl solution, increased further in NaCl and is highest in the presence of KCl, CsCl or RbCl. The frequency ranks at 40 mV as: $\text{Cs}^+ > \text{K}^+ \sim \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Li}^+$ with the difference in more than two orders of magnitude.

The rate constants of PEG/ αHL nanopore interaction in the presence of different alkali and ammonium chlorides

Rate constant for the association (k_{on}) is intimately linked with the frequency of blocking events appearance. It was determined from the long record like those shown in Fig. 3. k_{on} was calculated by assuming a simple bimolecular interaction such that

$k_{\text{on}} = 1/(\tau_{\text{on}} \times [\text{PEG}])$, where $[\text{PEG}]$ is the PEG concentration and τ_{on} is the characteristic time between successive blockages.^{31,46} The rate constant for the dissociation (k_{off}) of PEG was determined as $1/\tau_{\text{off}}$, where τ_{off} is the residence time of PEG into the pore-duration of the blockages, which was established from measuring more than 10^5 events as those shown in Fig. 3. Results are shown in Fig. 4, where clear dependence of on-rate (Fig. 4a) and off-rate (Fig. 4b) constants on the electrolyte type could be seen. In all cases, the rate constants were voltage dependent and rank as $\text{Cs}^+ > \text{K}^+ \geq \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Li}^+$ (for on-rate) and $\text{K}^+ < \text{Rb}^+ < \text{Na}^+ \leq \text{Cs}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{Li}^+$ (for off-rate). The formation constant (K_F), which is a derivate of association and dissociation constant, ($K_F = k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$), follows the same example (Fig. 4c).

We also observed that in all cases (excepted for LiCl) there is a great dependence of the rate constants on the transmembrane voltage and this dependence demonstrates that nonionic PEG molecules bind with cations and becoming stable charged molecules in these solutions.^{24,46,62} The theoretical model

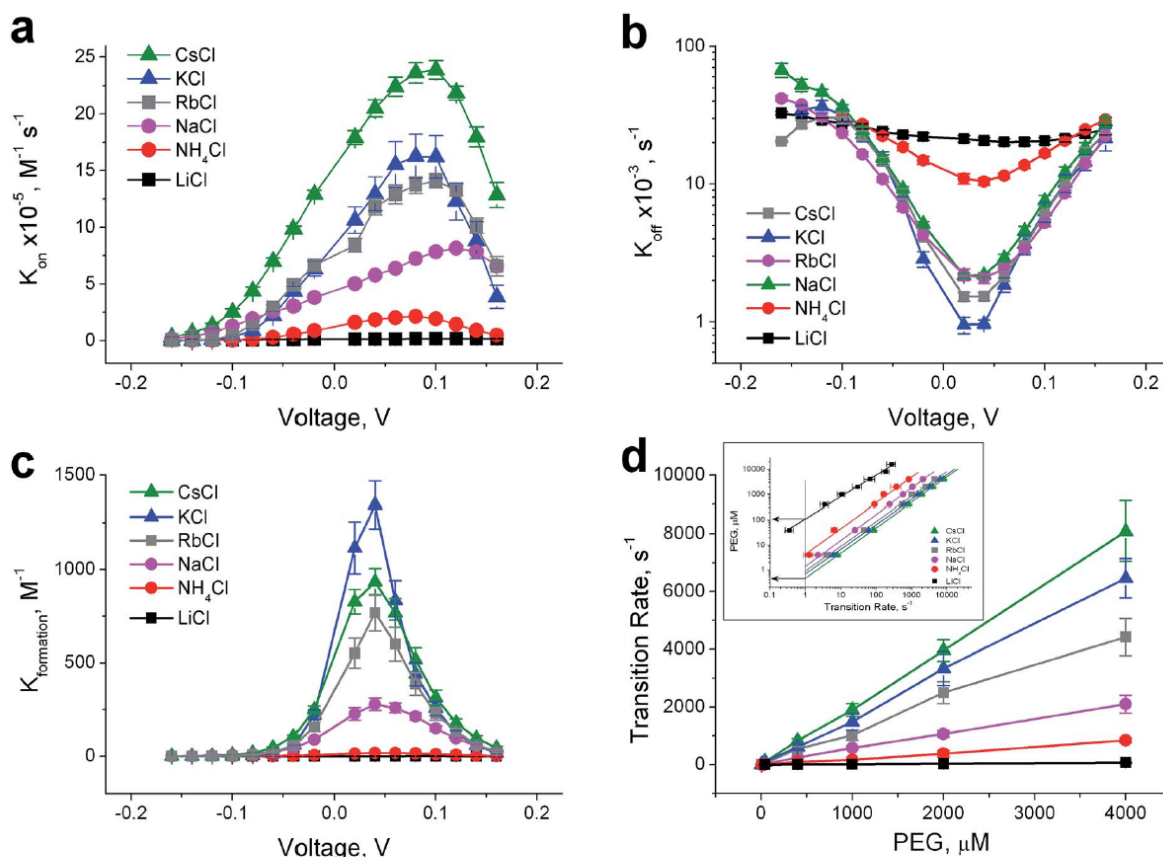


Fig. 4 Voltage dependence and specific ion effect of alkali- and ammonium chlorides on PEG/ αHL nanopore interaction. The average on-rate (a), off-rate (b), and PEG/ αHL nanopore complex formation constant (c) are shown as a function of transmembrane voltage at different alkali- and ammonium chloride. The minimal values of k_{off} are at 40 ± 10 mV. The data presented in (a) and (b) were used to build the dependence presented in (c). Transition rate and PEG concentration (d), the slope of the transition rate/PEG increases linearly and depends strongly on the salt type. Sensitiveness of αHL nanopore is dependent significantly on the cation type, the slope values are: 0.02 ± 0.01 (LiCl); 0.21 ± 0.01 (NH_4Cl); 0.52 ± 0.01 (NaCl); 1.12 ± 0.04 (RbCl); 1.62 ± 0.02 (KCl); 2.02 ± 0.02 (CsCl). (Inset in d) Detection limit of PEG with αHL nanopore is dependent significantly on the cation type. The arrows indicate the lowest (CsCl: $0.52 \pm 0.12 \mu\text{M}$) and the highest ($110.2 \pm 5.2 \mu\text{M}$) background equivalent PEG concentration at an event frequency of 1 Hz. The highest sensitivity was established for CsCl solution and the lowest for LiCl. First-order regression fitted well for the data with a slope of 1.01 ± 0.08 and the correlation coefficient is 0.99 ± 0.01 . Li^+ (black square), Na^+ (pink circles), K^+ (blue triangles), Rb^+ (gray squares), Cs^+ (green triangles) and NH_4^+ (red circles) chloride.

developed by Kasianowicz's research group,⁶³ and after supported by molecular dynamics simulations,⁶⁴ indicates that the potassium binds to PEG molecule and this PEG–cation charged complex within nanopore exhibits electroosmotic flow dependent on transmembrane voltage.^{63,64} In the case of LiCl, it has not been observed dependence of the rate constants on the applied voltage, indicating that the PEG molecules do not form stable complexes with Li^+ .⁶² The established specific ion effects of examined salts on the association rate constant allowed comparison of the efficiency of a single αHL nanopore as a stochastic biosensor in solutions of different salts.

Stochastic αHL nanopore sensor provides beneficial features to the molecule sensing. This sensor has wide dynamic range, high sensitivity and low detection limit.^{65–67} The dynamic range can be defined as the range between the highest and the lowest analyte concentration which can be discriminated.⁶⁸ In our case, the dynamic range was estimated at approximately 0.40 to 4000.00 μM (Fig. 4d). The sensitivity of the sensor is the slope of its calibration curve.⁶⁹ In this study, from the transition rate as function of PEG concentration, it was calculated each slope to obtain the αHL nanopore sensitivity in the presence of alkali and ammonium chloride (Fig. 4d). The nanopore sensitivity values ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) are: 0.02 ± 0.01 (LiCl); 0.21 ± 0.01 (NH_4Cl); 0.52 ± 0.01 (NaCl); 1.12 ± 0.04 (RbCl); 1.62 ± 0.02 (KCl); 2.02 ± 0.02 (CsCl).

In any case, values of the transition rate increase linearly with PEG concentration (Fig. 4d). It permits to use the nanopore to measure the PEG concentration in solution. As demonstrated above, the sensitiveness of such sensor is considerably high in solution of 4 M CsCl than 4 M LiCl. To demonstrate this difference quantitatively, we decided to calculate the detection limit from the dependence of PEG concentration as a function of the transition rate (Fig. 4d inset). To facilitate the understanding, may be considered the lowest analyte concentration detectable by αHL nanopore sensor when the current blocking events occur at frequency of 1 Hz.²⁴ The Fig. 4d (inset) demonstrates that the difference in the nanopore ability to detect the presence of PEG in solution (measured at practical 1 Hz of events) may achieve hundreds times: from 0.5 μM (CsCl) to >100 μM (LiCl).

Solubility of PEG

In order to find a reason for the established huge difference in the rate constants of PEG/ αHL nanopore interaction and the

sensitivity of this nanopore-based sensor to PEG, the solubility of PEG in 4 M of alkali chlorides was investigated. We have found that the PEG solubility in 4 M solutions of LiCl and NH_4Cl was very high and difficult to achieve experimentally. The PEG solubility in solutions of NaCl, KCl, RbCl and CsCl was not very different each other: 5.1 ± 0.5 mM; 3.9 ± 0.2 mM; 3.3 ± 0.4 mM and 4.0 ± 0.2 mM, respectively. To include other two salts (LiCl and NH_4Cl) in the analysis, the study of PEG solubility in 1/1 XCl/KCl mixtures was performed (where X represents Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , Cs^+ or Rb^+). The data (Fig. 5a) showed that the solubility is considerably influenced by cation type. The difference reaches several dozen times. However, the general ranking of ions, in order of effectiveness to salting-out of PEG ($\text{Rb}^+ \geq \text{Cs}^+ \geq \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Li}^+$), is not exactly the typical Hofmeister series $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$.⁵⁴ The established values of the solubilities showed a significant negative correlation with the association rate constant and significant positive correlation with the dissociation rate constant (Fig. 5b and c). In accordance with the effect of halide anions,²⁴ the alkali and ammonium cations perform their influence at both rate constants for PEG/ αHL nanopore interaction through of the same salting-out phenomenon. This specific effect appears dominated by hydration–dehydration processes where cations and PEG compete for water.

The absolute heat of hydration is important in the sensitivity of the nanopore to detect polymers?

The competition between ions and analyte for water is frequently noted as one of possible reasons of Hofmeister effects. However, there is not a report related to the importance of this for confined spaces as protein nanopores. We studied it and found that, except ammonium chloride, all alkali chlorides affected the associated rate constant uniformly: the larger the difference between the absolute energy of hydration Cl^- and Me^+ (where $\text{Me}^+ = \text{Li}^+$, Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , NH_4^+), smaller the association constant (Fig. 6). The behaviour of the dissociation constant is more complex. The dependence is biphasic with minimum at approximately to zero difference. Thus, one could choose the type of the electrolyte depending on your needs. If the goal is to increase the frequency of events (increase the sensitivity of the nanopore-based sensor), a salt with a lowest value of the difference in absolute energy of hydration should be

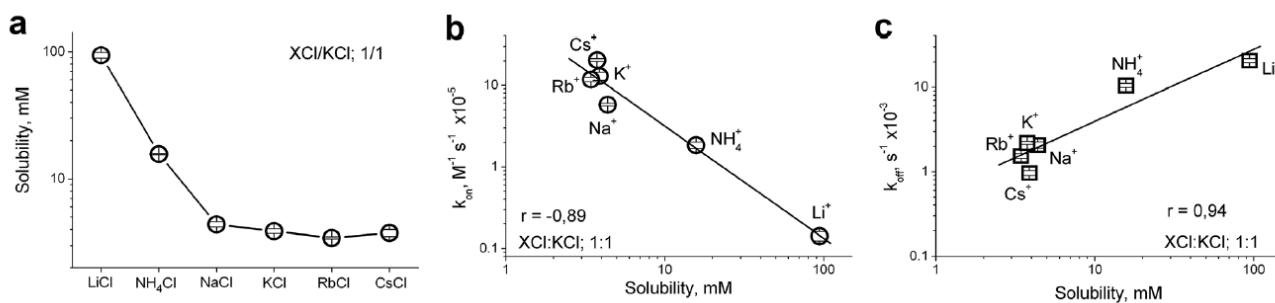


Fig. 5 Solubility of PEG at 1 : 1 (M/M) XCl/KCl ratio, where X represents Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , Cs^+ or Rb^+ (a) dependence of the on-rate (b) and off-rate (c) constants of PEG/ αHL nanopore interaction on solubility of PEG. The rate constant values were obtained at 40 mV of transmembrane potential. Total salt concentration was 4 M. (Data points) Means of 6–11 separate experiments $\pm$ SD. Correlation coefficient is shown in figure.

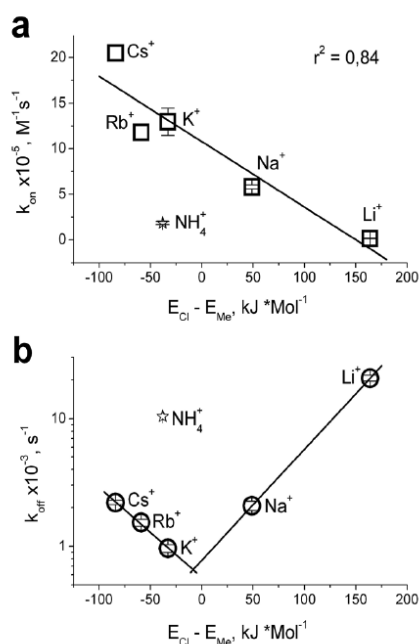


Fig. 6 Dependence of associated (a) and dissociated (b) rate constants at the difference between the absolute heats of hydration anion and cation ($E_{Cl} - E_{Me^+}$). Values of the absolute energy of hydration were obtained from literature.⁷⁰

used. In the contrast, if the aim is to increase the residence time of analyte (PEG) in the nanopore, a salt with zero difference should be utilized.

Conclusions

We demonstrated that the type of ion has strong influence on all the kinetics parameters of the α HL nanopore. The alkali and ammonium cations perform their influence at both rate constants for PEG/ α HL nanopore interaction through of the salting-out phenomenon. The on-rate and off-rate constants were changed and consequently the sensor sensitivity changed according to the type of salt. Furthermore, we observed that the rate constants have, in all cases (except LiCl), a great dependence on the transmembrane voltage. In the case of LiCl, it has not been observed dependence of the rate constants on the applied voltage, indicating that the PEG molecules do not form stable complexes with Li^+ . On the other hand, the others alkali metal cations significantly affect the interaction of PEG with nanopore and, similarly to the potassium, they also bind to this polymer. This finding indicates that neutral PEG molecules bind to the cations and becoming stable charged molecules in alkali and ammonium chloride solutions. Finally, the alkali and ammonium ions cause specific effects in confined spaces and these effects appear dominated by hydration-dehydration processes where cations and PEG compete for water. The results found in this study can help the understanding of the physicochemical conditions of molecular interactions in confined spaces. We hope that our results will advance the development of devices with sensor elements based on a single nanopore.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Rede de Nanotecnologia Molecular e de Interfaces (RENAMI), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Nanotecnologia Para Marcadores Integrados (INAMI), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica (INCT INFO), Brazil.

Notes and references

- 1 F. Hofmeister, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 1888, **24**, 247–260.
- 2 W. Kunz, J. Henle and B. W. Ninham, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2004, **9**, 19–37.
- 3 Y. Zhang, S. Furry, D. E. Bergbreiter and P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 14505–14510.
- 4 Y. J. Zhang and P. S. Cremer, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2010, **61**, 63–83.
- 5 T. Lopez-Leon, M. J. Santander-Ortega, J. L. Ortega-Vinuesa and D. Bastos-Gonzalez, *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**, 16060–16069.
- 6 P. Jungwirth and P. S. Cremer, *Nat. Chem.*, 2014, **6**, 261–263.
- 7 D. F. Parsons, M. Bostrom, P. Lo Nostro and B. W. Ninham, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 12352–12367.
- 8 J. Lyklema, *Chem. Phys. Lett.*, 2009, **467**, 217–222.
- 9 M. G. Cacace, E. M. Landau and J. J. Ramsden, *Q. Rev. Biophys.*, 1997, **30**, 241–277.
- 10 Y. J. Zhang and P. S. Cremer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**, 15249–15253.
- 11 M. Boström, D. F. Parsons, A. Salis, B. W. Ninham and M. Monduzzi, *Langmuir*, 2011, **27**, 9504–9511.
- 12 P. Jungwirth, *Faraday Discuss.*, 2009, **141**, 9–30.
- 13 W. Kunz, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2010, **15**, 34–39.
- 14 Y. Zhang and P. S. Cremer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, **10**, 658–663.
- 15 R. Leberman and A. K. Soper, *Nature*, 1995, **378**, 364–366.
- 16 J. D. Batchelor, A. Olteanu, A. Tripathy and G. J. Pielak, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 1958–1961.
- 17 A. W. Omta, M. F. Kropman, S. Woutersen and H. J. Bakker, *Science*, 2003, **301**, 347–349.
- 18 J. D. Smith, R. J. Saykally and P. L. Geissler, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 13847–13856.
- 19 L. M. Pegram and M. T. Record, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 9428–9436.
- 20 S. N. Timasheff, *Adv. Protein Chem.*, 1998, **51**, 355–432.
- 21 P. A. Grigorjev and S. M. Bezrukov, *Biophys. J.*, 1994, **67**, 2265–2271.
- 22 P. A. Guneev, D. Harries, V. A. Parsegian and S. M. Bezrukov, *ChemPhysChem*, 2009, **10**, 1445–1449.
- 23 O. V. Krasilnikov, R. Z. Sabirov and B. A. Tashmukhamedov, *Biol. Membr.*, 1986, **3**, 1057–1061.
- 24 C. G. Rodrigues, D. C. Machado, A. M. da Silva, J. J. Junior and O. V. Krasilnikov, *Biophys. J.*, 2011, **100**, 2929–2935.

- 25 J. P. Aguiar, J. J. S. Junior, D. C. Machado, M. C. A. Melo and C. G. Rodrigues, *Quim. Nova*, 2015, **38**, 817–827.
- 26 H. Bayley, *Clin. Chem.*, 2015, **61**, 25–31.
- 27 O. Braha, L. Q. Gu, L. Zhou, X. F. Lu, S. Cheley and H. Bayley, *Nat. Biotechnol.*, 2000, **18**, 1005–1007.
- 28 C. Yang, L. Liu, T. Zeng, D. W. Yang, Z. Y. Yao, Y. L. Zhao and H. C. Wu, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 7302–7307.
- 29 X. F. Kang, S. Cheley, X. Y. Guan and H. Bayley, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 10684–10685.
- 30 A. J. Boersma and H. Bayley, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 9606–9609.
- 31 O. V. Krasilnikov, C. G. Rodrigues and S. M. Bezrukov, *Phys. Rev. Lett.*, 2006, 97.
- 32 J. W. F. Robertson, C. G. Rodrigues, V. M. Stanford, K. A. Robinson, O. V. Krasilnikov and J. J. Kasianowicz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 8207–8211.
- 33 H. C. Wu and H. Bayley, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 6813–6819.
- 34 D. Wang, Q. Zhao, R. S. S. de Zoysa and X. Guan, *Sens. Actuators, B*, 2009, **139**, 440–446.
- 35 A. J. Boersma, K. L. Brain and H. Bayley, *ACS Nano*, 2012, **6**, 5304–5308.
- 36 T. C. Sutherland, Y. T. Long, R. I. Stefureac, I. Bediako-Amoa, H. B. Kraatz and J. S. Lee, *Nano Lett.*, 2004, **4**, 1273–1277.
- 37 L. Movileanu, J. P. Schmittschmitt, J. M. Scholtz and H. Bayley, *Biophys. J.*, 2005, **89**, 1030–1045.
- 38 R. Stefureac, Y. T. Long, H. B. Kraatz, P. Howard and J. S. Lee, *Biochemistry*, 2006, **45**, 9172–9179.
- 39 L. Movileanu, *Trends Biotechnol.*, 2009, **27**, 333–341.
- 40 D. Rotem, L. Jayasinghe, M. Salichou and H. Bayley, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 2781–2787.
- 41 J. Nivala, D. B. Marks and M. Akeson, *Nat. Biotechnol.*, 2013, **31**, 247–250.
- 42 S. Howorka, S. Cheley and H. Bayley, *Nat. Biotechnol.*, 2001, **19**, 636–639.
- 43 D. Branton, D. W. Deamer, A. Marziali, H. Bayley, S. A. Benner, T. Butler, M. Di Ventra, S. Garaj, A. Hibbs, X. H. Huang, S. B. Jovanovich, P. S. Krstic, S. Lindsay, X. S. S. Ling, C. H. Mastrangelo, A. Meller, J. S. Oliver, Y. V. Pershin, J. M. Ramsey, R. Riehn, G. V. Soni, V. Tabard-Cossa, M. Wanunu, M. Wiggin and J. A. Schloss, *Nat. Biotechnol.*, 2008, **26**, 1146–1153.
- 44 J. Clarke, H. C. Wu, L. Jayasinghe, A. Patel, S. Reid and H. Bayley, *Nat. Nanotechnol.*, 2009, **4**, 265–270.
- 45 D. Stoddart, L. Franceschini, A. Heron, H. Bayley and G. Maglia, *Nanotechnology*, 2015, 26.
- 46 C. G. Rodrigues, D. C. Machado, S. F. Chevtchenko and O. V. Krasilnikov, *Biophys. J.*, 2008, **95**, 5186–5192.
- 47 D. C. Machado, C. G. Rodrigues, A. M. B. da Silva, J. J. S. Junior and O. Krasilnikov, *Biophys. J.*, 2010, **98**, 332A.
- 48 M. Montal and P. Mueller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1972, **69**, 3561–3566.
- 49 S. Bhattacharya, L. Muzard, L. Payet, J. Mathe, U. Bockelmann, A. Aksimentiev and V. Viasnoff, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 4255–4264.
- 50 P. G. Merzlyak, M. F. P. Capistrano, A. Valeva, J. J. Kasianowicz and O. V. Krasilnikov, *Biophys. J.*, 2005, **89**, 3059–3070.
- 51 J. M. Broering and A. S. Bommarius, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 20612–20619.
- 52 P. Lo Nostro and B. W. Ninham, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 2286–2322.
- 53 J. I. Partanen, *J. Chem. Eng. Data*, 2009, **54**, 882–889.
- 54 J. I. Partanen, *J. Chem. Eng. Data*, 2010, **55**, 249–257.
- 55 J. I. Partanen and A. K. Covington, *J. Chem. Eng. Data*, 2009, **54**, 208–219.
- 56 R. A. Robinson, *Trans. Faraday Soc.*, 1939, **35**, 1217–1220.
- 57 R. A. Robinson and D. A. Sinclair, *J. Am. Chem. Soc.*, 1934, **56**, 1830–1835.
- 58 B. F. Wishaw and R. H. Stokes, *Trans. Faraday Soc.*, 1952, **49**, 27–31.
- 59 O. V. Krasilnikov, M. F. P. Capistrano, L. N. Yuldasheva and R. A. Nogueira, *J. Membr. Biol.*, 1997, **156**, 157–172.
- 60 O. V. Krasilnikov and R. Z. Sabirov, *Gen. Physiol. Biophys.*, 1989, **8**, 213–222.
- 61 O. V. Krasilnikov, P. G. Merzlyak, L. N. Yuldasheva and M. F. Capistrano, *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.*, 2005, **34**, 997–1006.
- 62 M. F. Breton, F. Discala, L. Bacri, D. Foster, J. Pelta and A. Oulchaed, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2013, **4**, 2202–2208.
- 63 J. E. Reiner, J. J. Kasianowicz, B. J. Nablo and J. W. F. Robertson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 12080–12085.
- 64 A. Balijepalli, J. W. F. Robertson, J. E. Reiner, J. J. Kasianowicz and R. W. Pastor, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 7064–7072.
- 65 H. Bayley, O. Braha and L. Q. Gu, *Adv. Mater.*, 2000, **12**, 139–142.
- 66 H. Bayley and P. S. Cremer, *Nature*, 2001, **413**, 226–230.
- 67 G. H. Wang, L. Wang, Y. J. Han, S. Zhou and X. Y. Guan, *Acc. Chem. Res.*, 2013, **46**, 2867–2877.
- 68 E. W. Visser, L. J. van IJendoorn and M. W. Prins, *ACS Nano*, 2016, **10**, 3093–3101.
- 69 D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst and G. S. Wilson, *Biosens. Bioelectron.*, 2001, **16**, 121–131.
- 70 Y. Marcus, *Ion properties*, Marcel Dekker, New York, 1997.

CAPÍTULO 3

**Cloud point measurements and molecular dynamics simulations:
influence of the halogen ions on the poly(ethyleneglycol) solubility**

Manuscrito, com resultados preliminares, em fase de preparação para posterior
submissão ao periódico *Chemical Physics Letters*. Fator de impacto: 2.145

Cloud point measurements and molecular dynamics simulations: influence of the halogen ions on the poly(ethyleneglycol) solubility

Dijanah C. Machado^a, Laércio Pol-Fachin^b, Roberto D. Lins, Janilson J. S. Júnior^a,

Maria C. A. Melo^a, Adriana Fontes^a, Claudio G. Rodrigues^{a}*

^a Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, 50670-901, Recife, PE, Brasil

^b Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Jornalista Aníbal Fernandes, s/n, Campus Universitário, 50740-560, Recife, PE, Brasil

Abstract

The study of the interactions of salts and osmolytes with polymers in aqueous solution is great relevance, once these solutes are known to display recurring behavior for myriad biological, chemical and technological processes. Such behavior depends both of the nature and concentration of the species in solution. Despite the generality of these effects, the knowledge at molecular-level details of ion specificity effects (Hofmeister effects) is still quite limited. Here, we combined cloud point methods with molecular dynamics (MD) simulations to elucidate the mechanism by which halogen ions influence the solubility of poly(ethylene glycol) (PEG) in aqueous systems. The PEG solubility was strongly influenced by type of halogen ions. The PEG solubility increased by two orders of magnitude in proportion to the ionic radius and lyotropic number. The surface accessibility of the PEG to water and its energy of interaction absolute increased proportionally with the size of the anion. The density of the structured water (shell solvation) around the PEG decrease with the density of charge and size of the anion. Finally, our preliminary results indicate that the mechanism of influence of the halogen ion in PEG solubility is dominated by coulombic force inducing change in the structure and quantity of the water around solute.

Keywords

Salting-out; Salting-in; Hofmeister series; molecular dynamic

Introduction

The biphasic systems are usually formed by mixing of two incompatible polymers in water solution or an aqueous solution of one polymer in concentrated salt solution. One of the major polymers used in biphasic systems is the poly(ethylene glycol) (PEG) (Hatti-Kaul, 2001; Mohsen-Nia et al, 2006; Jimenez et al., 2011). The PEG is a polymer nontoxic, soluble in water and most organic solvents. It possesses a variety of important biomedical and biotechnological applications (Harris, 1992; Merzlyak et al., 1999; Hoffman, 2012). The PEG has the property to possess a lower critical solution temperature of approximately 100 °C in water, above this temperature, it will result in insolubility and formation of two phases (Harris, 1992). The cloud point is the temperature at which phase-separation begins. At this temperature, the solution becomes turbid due to the formation of droplets of polymer emulsion (Johansson et al., 1999). There are several methods to measure the cloud point: light scattering (Jørgensen et al., 1997); neutron scattering (Chinchalikar et al., 2012); viscometry (Nozary et al., 2003); visual observation (Sahandzhieva et al., 2006; Geppert-Rybczyńska et al., 2012), refractometry (Mohsen-Nia et al, 2006), turbidimetry (Jimenez et al., 2011). Cloud-point measurements have been used to investigate the phase behavior of aqueous PEG solutions. It has been reported, that the addition of salt and other additives affects the thermodynamic properties of aqueous PEG solutions (Nozary et al., 2003; Freire et al., 2012; Pereira et al., 2013). Both presence and type of the salt can alter the solubility and behavior of other molecules in solution (Grossfield et al., 2003).

The specific effects induced by ions are known as the Hofmeister effects. More than a century ago, Franz Hofmeister discovered that neutral salts could influence on the solubility of proteins in aqueous solutions (Hofmeister, 1888). Thus, one group of salts was ranked according to its efficiency at precipitating proteins (salting-out) and a second group of salts was ranked according to its efficiency at solubilizing proteins (salting-in) (Collins, 2006). The changes in behavior of the cloud point are a sensitive indicator for salting-in and salting-out effects. The cloud point is raised by salting-in and lowered by salting-out salts (Schott et al., 1984). Here, we intended to assess the influence of the halogen ions on the PEG solubility in aqueous environment. Additionally, we performed molecular dynamics (MD) simulations to explain the interaction between the ions from Hofmeister series and PEG molecules.

The goal this study was:

1. To investigate by cloud point, the salts of Hofmeister series involved in the increase solubility (salting-in) and in the decrease solubility (salting-out) of the PEG;
2. To correlate the solubility of the PEG with the ionic radius and lyotropic numbers parameters of ions of the Hofmeister series;
3. To establish by molecular dynamic simulations the mechanisms involved in the ion-PEG interaction.

Materials and methods

All chemicals and solvents were of analytical-grade and used as received, without further purification. High quality (>99.99%) halides (KCl, KF, KBr, and KI) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Polydisperse poly(ethylene glycol) (MW ~ 1500, PEG 1500) was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The salts solutions were prepared in 4 M concentration and high-purity water was obtained after a Milli-Q plus (Billerica, USA) treatment. The limit of PEG solubility was estimated by the modified cloud-point method (Sahandzhieva et al., 2006). Briefly, small amounts of PEG 1500 (usually between 2 and 40 mg) were added to 10 mL glass vials. Then, small volumes (300–500 μ L) of 4 M solutions of KF, KCl, KBr or KI were added stepwise at room temperature (25 ± 1 °C). After each addition, vials were closed using screw caps with Teflon seals, carefully shaken to achieve full PEG solubility, and placed in a boiling water bath (~100 °C) for 10 to 30 min. Cloud formation was determined visually. Polymer molarities were calculated on a mass percent basis. The mean value of the PEG concentration between two neighboring solutions (one of which still showed - and the other of which no longer showed - a phase split) in each experiment, represented the PEG solubility under those conditions. The difference in concentration between those neighboring solutions determined the inaccuracy of the experimental results. To determine the cloud point more accurately, the experiment was repeated several times with a mixture already close to the phase boundary. Smaller increments of halogens solution were then added to narrow the inaccuracy to < 1%.

To perform molecular dynamics (MD) simulations, initially, elongated PEG structure containing 456 Da (ten $-\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ repeating units, plus two terminal $\text{CH}_2\text{-OH}$ groups) was obtained with Avogadro (Hanwell et al. 2012), being subsequently described under OPLS force field parameters. Such system was solvated in a dodecahedron box using periodic boundary conditions and TIP4P water model (Jorgensen et al. 1983), employing a 1.5 nm distance from the outside of each structure

and the box edge. Based on this structure, four systems were constructed by adding different ions to the simulation box, that is, varying the anion (F^- and I^-), but using the same cation (K^+), always employing an ionic concentration of 4M. The Lincs method (Hess et al. 1997) was applied to constrain covalent bond lengths, allowing an integration step of 2 fs after an initial energy minimization using Steepest Descents algorithm. A 1.2 nm cutoff was used for the short-range electrostatics and van der Waals interactions, while long-range electrostatic interactions were treated by the reaction field method (Tironi et al. 1995) with $\epsilon = 66$. The temperature was maintained at 298 K with Nosé-Hoover thermostats (Nosé, 1984; Hoover, 1985) and a relaxation time of 0.1 ps. Pressure was kept at 1 bar using a Parrinello-Rahman barostat (Parrinello and Rahman, 1981; Nosé and Klein, 1983) through isotropic coordinate scaling, a coupling constant of 1.0 ps and a compressibility of $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$. A 1 ns MD simulation was performed as an equilibration period, with position restraints on PEG structure, which was not taken into account to calculate the average ensemble properties. After this equilibration, triplicate 50 ns MD simulations were performed using GROMACS simulation suite, version 4.5.4 (Hess et al. 2009), and OPLS-AA force field (Jorgensen et al. 1996; Kaminski et al 2001). Finally, all interaction energy, solvent accessible surface area (SASA) and radial distribution function (RDF) analyses were performed with GROMACS *g_energy*, *g_sas* and *g_rdf* tools, respectively.

Results and Discussion

Recently, we demonstrated the influence of halogen anions on the rate constants (on-rate, off-rate and formation constant) of the PEG interaction with the nanopore protein unitary formed by *Staphylococcus aureus* α -hemolysin (Rodrigues et al., 2011). In addition, we also saw a strong influence of the type of anion on PEG solubility. By measurements of cloud point (Figure 1), we found that PEG solubility in 4 M KF ($19 \pm 2 \mu\text{M}$) was smaller than in 4 M KCl ($3840 \pm 390 \mu\text{M}$).

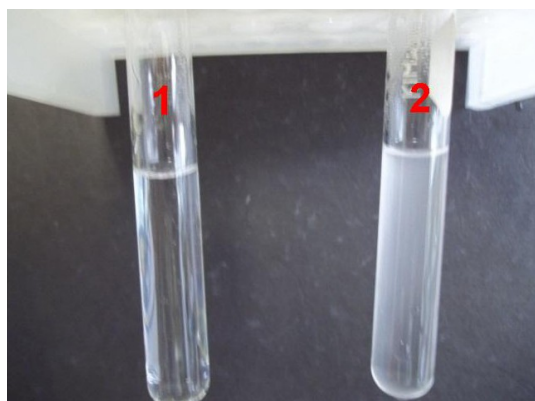


Figure 1. Photography of the cloud point technique. The cloud point formation of PEG 1500 in 4 M KCl solution. In tube 1, the solution is translucent (there is not cloud point). In tube 2, it is occurring cloud point. We can observe turbidity in the solution, which it is indicated of droplets of polymer emulsions.

The PEG solubility in 4 M solutions of KBr and KI was so large and difficult to achieve experimentally. To include these salts (KBr and KI) in the analysis, the study of PEG solubility was carried out with 1:1 mixed solutions (KF/KCl, KBr/KCl and KI/KCl), keeping the total concentration at 4M. We established that the sequence of halogen anions, in order of effectiveness in the decrease the PEG solubility (salting-out) was: $F^- > Cl^- > Br^- > I^-$. This sequence follows the typical Hofmeister series (Broering & Bommarius, 2005) (Figure 2).

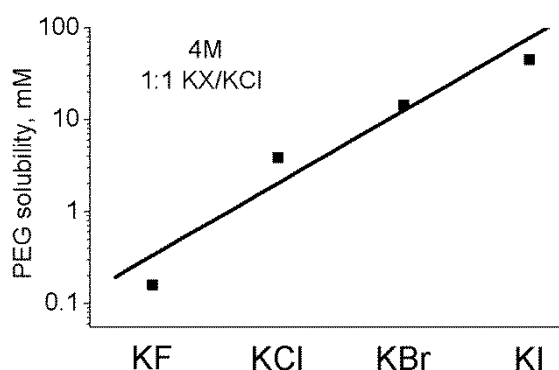


Figure 2. PEG solubility at 1:1 (M/M) KX/KCl ratio, where X represents F^- , Br^- or I^- 4 M halide solutions. Total salt concentration was 4 M. Means of 5-8 separate experiments $\pm$ SD. Lines were drawn to guide the eye.

The presence of ions in the solution influences the macromolecule-solvent interactions and consequently the solubility (cloud-point) behavior. The ions induce effects on water structure through alteration on the hydrogen-bonding. Thus, the water molecules are ordered differently around each ion. Kosmotropic (small ions of high charge density) ions bind water molecules strongly, whereas chaotropic (low charge density) ions bind water molecules weakly relative to the strength of water-water in bulk solution (Collins, 1997). The ability of the fluoride to perform salting-out more efficiently than other anions is justified by its water affinity (Collins, 2006). The fluoride is a kosmotropic ion, and it competes strongly with PEG for water. This competition is favorable to fluoride, which it keeps the water molecules tightly bound around itself, causing the dehydration of PEG and consequently its solubility is decreased (salting-out). At the other extreme, the PEG solubility was greatly increased in the presence of the iodide. The iodide is a chaotropic ion, it doesn't compete with PEG for water, and so, the PEG molecules remain more hydrated, increasing their solubility (salting-in).

The salting-out of polymers in water solution is an important behavior in chemistry. The salting-out strength of the salt is related to its ability to lower the cloud point (solubility) of the PEG in solution and can be evaluated by its lyotropic number and ionic radius (Willauer et al., 2002; Naskar et al., 2010). Lyotropic number is an empirical quantitative parameter introduced by Voet (1937) that it permits to evaluate the effects

of different salts in salting-out experiments (Lo nostro et al., 2002). In Figure 3, we attempted the correlation between PEG solubility and ionic radius (Figure 3A) and lyotropic number parameters (Figure 3 B).

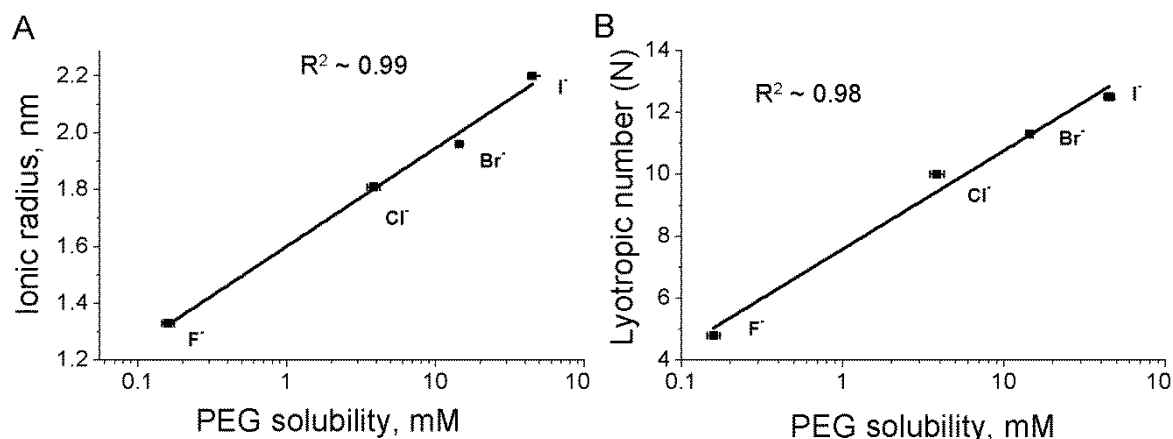


Figure 3. (A) Dependence of PEG solubility on the ionic radius. (B) Dependence of PEG solubility on the lyotropic number. Values of the ionic radius and lyotropic number were taken from Marcus (1997) and Kunz et al. (2004), respectively.

We observed that both lyotropic number and ionic radius parameters have a good positive correlation with the PEG solubility. Pastoor and Rice (2012) investigated the halogen anions effects on solubility of the poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) hydrogels and they also found a correlation between ionic radius and salting-out phenomenon. The salting-out effect decrease with increase of ionic radius of the anions. Several studies have also established good correlation with lyotropic number and salting-out phenomenon (Ananthapadmanabhan & Goddard, 1987; Rogers et al., 1996; Naskar et al., 2010; Ulloa et al., 2012). A change in the lyotropic number of the anions has a larger effect on the solubility of the polymers (Ananthapadmanabhan & Goddard, 1987; Naskar et al., 2010; Garrec & Norton, 2012). Small anions with low lyotropic number, as the fluoride, are strongly hydrated (kosmotropic) and they are more effective in salting-out neutral molecules. On the other hand, large anions (chaotropic) have high lyotropic number, as in the case of iodide, and they are more effective in salting-in (Schick, 1962). Thus, lyotropic number can be used as a predictive tool for solubility (Ananthapadmanabhan & Goddard, 1987).

As seen above, the relative abilities of the anions in PEG solubility are dependents of their ionic radius and lyotropic characteristics. This appears to occur by specific interactions between the salt and PEG molecules. To understand better the mechanisms involved in the anion-PEG interaction, we performed molecular dynamic simulations.

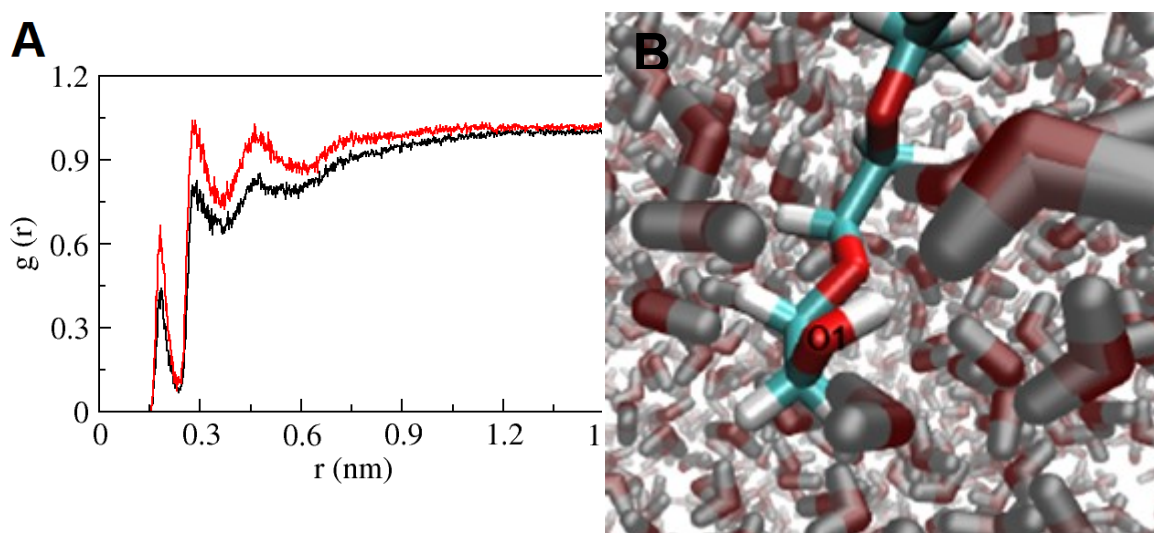


Figure 4. (A) Radial distribution function $g(r)$ of the water molecules in the shells solvation centered on oxygen of the hydroxyl terminal of the PEG (atom O1) in presence of iodide (red profile) and fluoride (black profile). (B) Frame of the PEG oxygen terminal (O1) and water molecules. Simulations were performed in triplicate.

Initially, we analyzed the PEG solvation in presence of 4M KF or KI through of the radial distribution function calculation between the terminal oxygen of the PEG and water molecules. The Figure 4A exhibits the typical profile of radial distribution function of the shell solvation centered on atom O1 (oxygen of the hydroxyl terminal of the PEG which it is represented in Figure 4B). We can observe for both, KF (black) and KI (red), the presence of three peaks well defined. From left to right, each peak corresponds to first, second and third hydration shells of the oxygen terminal of the PEG, respectively. Although the number of hydration shells is the same, comparing the ions (fluoride and iodide), the distribution of water in the oxygen terminal of the PEG is greater in the presence of iodide. This result indicates that PEG is less and more hydrated in presence of the fluoride and iodide respectively. The trends are consistent with the lyotropic behavior of the ion.

Additionally, the parameters energy of interaction water-PEG; surface area solvent accessible of PEG; and radius of gyration of PEG were evaluated (Table 1). As seen in Table 1, absolute values of energy of interaction water-PEG indicate that the PEG interacts more with water molecules in the presence of KI than KF. These results imply that there is a larger surface accessibility to water of the PEG in KI solution. Moreover, analyzing the radius of gyration of PEG in presence of KF (0.444 nm) and KI (0.465 nm), it was observed that the anion fluoride induces a compaction of PEG. This

indicates that the polymer PEG can be salted-out more efficiently in presence of anion fluoride in water solution and corroborates the experimental solubility data.

PARAMETERS	KI	KF
Energy of interaction WATER-PEG (Kcal/mol)	-307 ± 2	-263 ± 11
Surface area solvent accessible ($\text{\AA}^2$)	1127.006	1028.299
Radius of gyration (nm)	0.465 ± 0.002	0.444 ± 0.008

Table 1. Parameters: Energy of interaction WATER-PEG, surface area solvent accessible and radius of gyrations of PEG. The surface area solvent accessible was calculated with the popular molecular graphics program PyMOL, using the most stable conformations of PEG after 50ns simulation for each system. Simulations were performed in triplicate.

Conclusions

Preliminarily, we suggest that the mechanism involved in the influence of halogen ions on the solubility of polyethylene glycol is dominated by coulombic forces induced by ions, providing changes in the amount and structure of water around the polymeric solute.

References

- ANANTHAPADMANABHAN, K.P.; GODDARD, E.D. Aqueous Biphasic Formation in Polyethylene Oxide-Inorganic Salt Systems. *Langmuir*, **1987**, 3, 25-31.
- BROERING, J.M.; BOMMARIUS, A.S. Evaluation of Hofmeister effects on the kinetic stability of proteins. *Journal of Physical Chemistry B*, **2005**, 109, 20612-20619.
- CHINCHALIKAR, A.J.; ASWAL, V.K.; KOHLBRECHER, J.; WAGH, A.G. Small-angle neutron scattering study of temperature vs. salt dependence of clouding in charged micellar system. *The European Physical Journal E*, **2012**, 35, 1-10.
- COLLINS, K.D. Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. *Biophysical Journal*, **1997**, 72, 65-76

COLLINS, K.D. Ion hydration: Implications for cellular function, polyelectrolytes, and protein crystallization. *Biophysical Chemistry*, **2006**, 119, 271-281.

FREIRE, M.G.; PEREIRA, J.F.B.; FRANCISCO, M.; RODRÍGUEZ, H.; REBELO, L.P.N.; ROGERS, R.D.; COUTINHO, J.A.P. Insight into the Interactions That Control the Phase Behaviour of New Aqueous Biphasic Systems Composed of Polyethylene Glycol Polymers and Ionic Liquids. *Chemistry a European Journal*, **2012**, 18, 1831-1839.

GARREC, D.A.; NORTON, I.T. Boundary lubrication by sodium salts: A Hofmeister series effect. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2012**, 379, 33-40.

GEPPERT-RYBCZYŃSKA, M.; KNORR, A.; LEHMANN, J.K.; HEINTZ, A. Liquid Phase Behavior of 1-Butyl-1-methylpyrrolidinium Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide with 1-Butanol or Hexan-1-ol: Measurements of Coexistence Curves, Density, and Interfacial Tension. *Journal of Chemical & Engineering Data*, **2012**, 57, 1923-1927.

GROSSFIELD, A.; REN, P.; PONDER, J.W. Ion Solvation Thermodynamics from Simulation with a Polarizable Force Field. *Journal of the American Chemical Society*, **2003**, 125, 15671-15682.

HANWELL, M.D.; CURTIS, D.E.; LONIE, D.C.; VANDERMEERSCH, T.; HUTCHISON, G.R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of. Cheminformatics*, **2012**, 4, 17.

HARRIS, J.M. Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications. Plenum Press, New York, **1992**.

HATTI-KAUL, R. Aqueous Two-Phase Systems: A General Overview. *Molecular Biotechnology*, **2001**, 19, 269-277.

HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, **1997**, 18, 1463-1472.

HESS, B.; KUTZNER, C.; VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **2009**, 4, 435-447.

HOFFMAN, A.S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2012**, 64, 18-23.

HOFMEISTER F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Zweite Mittheilung. *Archiv for Experimentelle Pathologie und Pharmacologie*, **1888**, 24, 247-260.

HOOVER, W.G. Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. *Physical Review A*, **1985**, 31, 1695-1697.

JIMENEZ, Y.P.; TABOADA, M.E.; GALLEGUILLOS, H.R. (2011). Cloud-point measurements of the {H₂O + poly(ethylene glycol) + NaNO₃} system. *Journal of Chemical Thermodynamics*, **2011**, 43, 1204-1210.

JOHANSSON, H.O.; PERSSON, J.; TJERNELD, F. Thermoseparating Water/Polymer System: A Novel One-Polymer Aqueous Two-Phase System for Protein Purification. *Biotechnology and Bioengineering*, **1999**, 66, 247-257.

JORGENSEN, W.L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J.D.; IMPEY, R.W.; KLEIN, M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, **1983**, 79, 926-935.

JORGENSEN, W.L.; MAXWELL, D.S.; TIRADO-RIVES, J.: Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, **1996**, 118, 11225-11236.

JØRGENSEN, E.B.; HVIDT, S.; BROWN, W.; SCHILLÉN, K. Effects of Salts on the Micellization and Gelation of a Triblock Copolymer Studied by Rheology and Light Scattering. *Macromolecules*, **1997**, 30, 2355-2364.

KAMINSKI, G.A.; FRIESNER, R.A.; TIRADO-RIVES, J.; JORGENSEN, W.L. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2001**, 105, 6474-6487.

KUNZ, W.; LO NOSTRO, P.; NINHAM, B.W. The present state of affairs with Hofmeister effects. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **2004**, 9, 1-18.

LO NOSTRO, P.; LOPES, J.R.; NINHAM, B.W.; BAGLIONI, P. Effect of Cations and Anions on the Formation of Polypseudorotaxanes. *Journal of Physical Chemistry B*, **2002**, 106, 2166-2174.

MARCUS, Y. Ion Properties; Marcel Dekker: New York, **1997**.

MERZLYAK, P.G.; YULDASHEVA, L.N.; RODRIGUES, C.G.; CARNEIRO, C.M.M.; KRASILNIKOV, O.V.; BEZRUKOV, S. Polymeric Nonelectrolytes to Probe

Pore Geometry: Application to the α -Toxin Transmembrane Channel. *Biophysical Journal*, **1999**, 77, 3023-3033.

MOHSEN-NIA, M.; RASA, H.; MODARRESS, H. Cloud-Point Measurements for (Water + Poly(ethylene glycol) + Salt) Ternary Mixtures by Refractometry Method. *Journal of Chemical and Engineering Data*, **2006**, 51, 1316-1320.

NASKAR, B.; DAN, A.; GHOSH, S.; MOULIK, S.P. Characteristic physicochemical features of the biopolymer inulin in solvent added and depleted states. *Carbohydrate Polymers*, **2010**, 81, 700–706.

NOSÉ, S.; KLEIN, M.L. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. *Molecular Physics*, **1983**, 50, 1055-1076.

NOSÉ, S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular Physics*, **1984**, 52, 255-268.

NOZARY, S., MODARRESS, H., ELIASSI, A. Cloud-Point Measurements for Salt + Poly(ethylene glycol) + Water Systems by Viscometry and Laser Beam Scattering Methods. *Journal of Applied Polymer Science*, **2003**, 89, 1983–1990.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, **1981**, 52, 7182-7190.

PASTOOR, K.J.; RICE, C.V. Anion Effects on the Phase Transition of N-Isopropylacrylamide Hydrogels. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2012**, 50, 1374-1382.

PEREIRA, J.F.B.; VICENTE, F.; SANTOS-EBINUMA, V.C.; ARAÚJO, J.M.; PESSOA, A.; FREIRE, M.G.; COUTINHO, J.A.P. Extraction of tetracycline from fermentation broth using aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and cholinium-based salts. *Process Biochemistry*, **2013**, 48, 716-722.

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

ROGERS, R.D.; BOND, A.H.; BAUER, C.B.; ZHANG, J.; GRIFFIN, S.T. Metal ion separations in polyethylene glycol-based aqueous biphasic systems: correlation of partitioning behavior with available thermodynamic hydration data. *Journal of Chromatography B*, **1996**, 680, 221-229.

SAHANDZHIEVA, K.; TUMA, D.; BREYER, S.; KAMPS, A.P.S.; MAURER, G. Liquid-Liquid Equilibrium in Mixtures of the Ionic Liquid 1-*n*-Butyl-3-methylimidazolium Hexafluorophosphate and an Alkanol. *Journal of Chemical and Engineering Data*, **2006**, 51, 1516-1525.

SCHICK, M.J. Surface Films of Nonionic Detergents-I. Surface Tension Study. *Journal of Colloid Science*, **1962**, 17, 801-813.

SCHOTT, H. Lyotropic Numbers of Anions from Cloud Point changes of Nonionic Surfactants. *Colloids and Surfaces*, **1984**, 11, 51-54.

TIRONI, I.G.; SPERB, R.; SMITH, P.E.; VAN GUNSTEREN, W.F. A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics*, **1995**, 102, 5451-5459.

ULLOA, G.; COUTENS, C.; SÁNCHEZ, M.; SINEIRO, J.; RODRÍGUEZ, A.; DEIVE, F.J.; NÚÑEZ, M.J. Sodium salt effect on aqueous solutions containing Tween 20 and Triton X-102. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, **2012**, 47, 62-67.

VOET, A. Quantitative Lyotropy. *Chemical Reviews*, **1937**, 20, 169-179.

WILLAUER, H.D.; HUDDLESTON, J.G.; ROGERS, R.D. Solute Partitioning in Aqueous Biphasic Systems Composed of Polyethylene Glycol and Salt: The Partitioning of Small Neutral Organic Species. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2002**, 41, 1892-1904.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, investigamos a influência dos ânions (da família VIIA), dos cátions (da família IA) e do íon amônio na interação do polímero monodisperso polietilenoglicol de peso molecular 1294 (PEG 1294) com o nanoporo protéico unitário formado pela alfa-hemolisina e concluímos que:

1. Íons das famílias IA, VIIA e amônio induzem efeitos de Hofmeister em sistema nanoconfinado;
2. Ânions da Família VIIA influenciam as constantes de interação – constante de associação, constante de dissociação e constante de formação – do complexo PEG-nanoporo;
3. A sensibilidade do nanoporo-sensor depende do tipo de sal, aumentando proporcionalmente com o tamanho do ânion halogênio.
4. A influência dos ânions da família VIIA na constante de associação do complexo PEG-nanoporo segue a ordem direta da série de Hofmeister;
5. A influência dos ânions da família VIIA na constante de dissociação do complexo PEG-nanoporo e também na solubilidade do PEG em sistema aquoso segue a ordem inversa da série de Hofmeister.
6. Cátions da Família IA e amônio influenciam na sensibilidade do nanoporo e nas constantes cinéticas de interação do PEG-nanoporo.
7. A influência dos cátions da família IA e amônio nas constantes de interação do PEG-nanoporo não segue a série de Hofmeister.
8. As moléculas do PEG comportam-se como partículas com carga elétrica residual em soluções aquosas de íons das Famílias IA e VIIA, excetuando-se o lítio.
9. Os efeitos específicos induzidos por íons das Famílias IA e VIIA na detecção e interação do PEG com o nanoporo devem-se ao fenômeno salting-out.
10. As forças eletrostáticas são dominantes na influência de ânions da Família VIIA sobre a solubilidade do PEG em água.

ANEXOS

Anexo A: metodologia empregada nos experimentos com nanoporo unitário.

1. METODOLOGIA

1.1 Bicamada Lipídica Plana

Para a formação da bicamada lipídica plana, foi empregada a técnica de Montal & Mueller (1972). A técnica consiste na formação da bicamada pela aposição de duas monocamadas lipídicas em um orifício contido em uma película de Teflon[®] (politetrafluoretileno), denominada “partição”. A partição (25 µm de espessura) possui um orifício central (~100 µm de diâmetro) e divide a câmara experimental, também de Teflon, em duas hemicâmaras (*cis/trans*) que são mantidas unidas através de um suporte metálico.

Com a câmara montada, acrescentou-se 500 µL de solução eletrolítica nos dois lados (ficando o nível da solução abaixo do orifício) e em seguida adicionou-se, também nas duas hemicâmaras, 10 µL da solução de lipídeo (5 mg/ml em hexano). Foi empregado o lipídeo sintético diftanoilglicerofosfocolina (DPhPC). Em seguida, o orifício foi tratado com 1% (v/v) de solução de hexadecano em hexano. Após 10 minutos, tempo necessário para a evaporação do hexano, foi adicionado mais 500 µL de solução banhante no compartimento *trans* para o menisco da solução subir e ficar acima do orifício, formando, assim, a primeira monocamada lipídica, para em seguida elevar o menisco da solução do lado oposto (*cis*) e completar a formação da bicamada no orifício (Figura 1). A formação da membrana foi monitorada com ajuda de uma lupa monocular e pelo aumento da corrente capacitiva basal observada no osciloscópio.

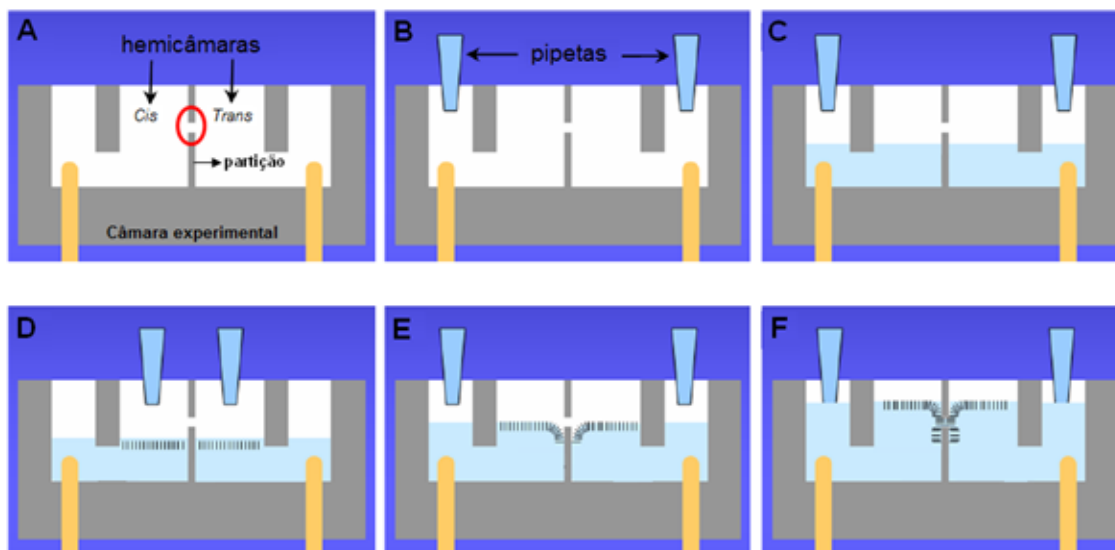


FIGURA 1: Técnica de Montal & Mueller. (A) Câmara experimental dividida em duas hemicâmaras (*cis/trans*) por uma película Teflon® (partição). A partição possui um orifício (círculo vermelho) onde será formada a bicamada lipídica plana. Etapas de formação da bicamada: (B-C) Com o auxílio de pipetas, adiciona-se solução banhante nos lados *cis* e *trans*. (D) Adição do lipídeo nos dois lados da câmara experimental. (E) Para formar a primeira monocamada lipídica, adiciona-se mais solução banhante no lado *cis* até o menisco ficar acima do orifício. A adição de mais solução no lado *trans* forma a segunda monocamada. (F) O encontro das duas monocamadas forma a bicamada lipídica plana. Adaptado de ROSSI et al., 2012.

Com a bicamada lipídica formada, adicionou-se no lado *cis* uma concentração pré-estabelecida da alfa-hemolisina (α -HL, CalbioChem, USA) para a incorporação do nanoporo protéico unitário na membrana. Utilizou-se solução banhante composta por um dos ânions halogênicos (Cl^- , I^- , F^- e Br^-) com o contra-íon K^+ ou composta por um dos cátions da família 1A (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+) ou o NH_4^+ tendo o Cl^- como contra-íon. Todas as soluções eletrolíticas foram preparadas a uma concentração de 4 M do sal, 5 mM Tris e pH 7.5 ajustado com ácido cítrico.

Após a inserção do poro unitário na bicamada, adicionou-se no compartimento *trans* o polímero monodisperso polietilenoglicol de peso molecular 1294 (PEG 1294) a ser identificado e analisado pelo biossensor. Tanto a inserção do nanoporo como os registros dos eventos moleculares oriundos da interação PEG-nanoporo foram realizados em modo de fixação de voltagem. Os processos foram visualizados no osciloscópio e registrados na memória do microcomputador. Todos os experimentos foram executados à temperatura de 25 ± 1 °C. Com a finalidade de minimizar a interferência de perturbações mecânicas e eletromagnéticas, toda a montagem do

sistema experimental foi realizada sobre uma mesa de amortecimento de alta performance (TMC 63-500) e blindada por uma gaiola de Faraday.

1.2 Sistema de aquisição e registro

Em todos os experimentos o sistema utilizado para estimulação, monitoração e aquisição dos registros foi constituído por um gerador de onda triangular, um amplificador de patch clamp Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA), uma placa conversora analógico-digital (PCI 6024E da National Instruments Corporation ou DIGIDATA 1440 da Molecular Devices) acoplada a um microcomputador IBM PC compatível. Os registros da corrente iônica foram filtrados a 15 kHz por um filtro passa-baixa Bessel (Model 902, Frequency Devices, Haverhill, MA) e gravados em uma amostragem de 100-250 kHz. A conexão dos compartimentos da câmara experimental ao sistema de aquisição e registro foi feita através de pontes salinas do tipo Ágar-KCl (3% em peso de Ágar em KCl 3 M) e eletrodos de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl). O potencial entre os eletrodos foi mantido abaixo de 1 mV.

1.3 Análise dos eventos moleculares

Primeiramente, foram construídos histogramas de condutância com a finalidade de determinar o valor médio da condutância do nanoporo de α -HL quando banhado por cada uma das soluções eletrolíticas. Foram utilizados os nanoporos unitários com valor médio de condutância ± 1 desvio padrão.

A condutância de um único nanoporo, determinada em voltagens aplicadas de -200 à +200 mV, foi utilizada para construção do gráfico G-V (condutância-voltagem) nas condições controle e experimental, ou seja, na ausência e presença do PEG 1294, respectivamente. Utilizando os programas Sview4_09 e TauHist (desenvolvido por Dr. M.A. Pustovoit; Petersburg, Nuclear Physics Institute, Gatchina, Rússia), foi realizada a análise cinética dos registros temporais de corrente provenientes dos eventos de interação do PEG-nanoporo, determinando os tempos característicos de permanência do nanoporo nos estados desocupado e ocupado pelas moléculas poliméricas: τ_{on} e τ_{off} , respectivamente. Como descrito por Colquhoun & Sigworth (1995), com os tempos característicos pode-se obter as constantes de associação (k_{on}), dissociação (k_{off}) e de formação ($K_{formação}$) do complexo PEG-nanoporo:

Constante de associação: $k_{on} = 1/(\tau_{on} \times C)$, onde C representa a concentração do PEG.

Constante de dissociação $k_{off} = 1 / \tau_{off}$

Constantes de formação $K_{formação} = k_{on} / k_{off}$

Os parâmetros foram obtidos através da análise da distribuição de aproximadamente 10^6 dos eventos de bloqueio.

1.4 Solubilidade

A solubilidade do PEG foi estimada por adaptação do método de ponto de névoa (*cloud point*) (SAHANDZHIEVA et al., 2006). O valor do ponto de névoa corresponde à concentração do sólido que não consegue se dissolver por completo em um solvente, revelando-se como uma segunda fase que dá ao líquido uma aparência turva.

Para as medidas, primeiramente, adicionou-se pequenas quantidades (2–40 mg) de polietilenoglicol de peso molecular 1500 (PEG 1500) em um tubo de vidro de 10 ml. Em seguida, pequenos volumes (300–500 μL) de solução eletrolítica foram adicionados ao tubo à temperatura ambiente (25°C). A solução era composta por um dos ânions halogênios - Cl^- , I^- , F^- e Br^- - formando sais com o K^+ ou composta por um dos cátions da família 1A - Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ - mais o NH_4^+ formando sais com o Cl^- . Todas as soluções foram preparadas a uma concentração de 4M do sal.

A cada adição de uma alíquota do solvente, o tubo era fechado com tampa de Teflon, agitado e finalmente levado a um banho Maria a 100°C durante 10 - 30 minutos. Pequenas alíquotas do solvente foram adicionadas ao tubo até surgir o ponto de névoa. A formação do ponto de névoa da solução foi determinada visualmente. A concentração da solubilidade do polímero foi determinada como a concentração média entre duas soluções, uma em que não visualizasse a névoa, e a outra de concentração próxima, que gera a névoa, ou seja, ocorra a mudança de fase. Para aumentar a precisão, cada uma das medidas experimentais foi repetida com a mistura na concentração já bem próxima da mudança de fase e em seguida foram adicionados volumes menores de solução eletrolítica até a formação da névoa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COLQUHOUN, D. & SIGWORTH, F.J. Fitting and statistical analysis of single channel records. In Single-channel recording. B. Sakmann, editor. Plenum Press, New York. 483-587. 1995.

ROSSI, M.; THEI, F.; TARTAGNI, M. A parallel sensing technique for automatic bilayer lipid membrane arrays monitoring. **Sensors & Transducers**, v. 14, p. 185-196, 2012.

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

SAHANDZHIEVA, K.; TUMA, D.; BREYER, S.; KAMPS, A.P.S.; MAURER, G. Liquid-liquid equilibrium in mixtures of the ionic liquid 1-n-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and an alkanol. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 51, p. 1516-1525, 2006.

Anexo B: depósito de patente sobre a utilização do nanoporo protéico na detecção, identificação e quantificação em tempo real de microcistinas em meio aquoso.

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

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



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

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

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

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

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

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

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

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

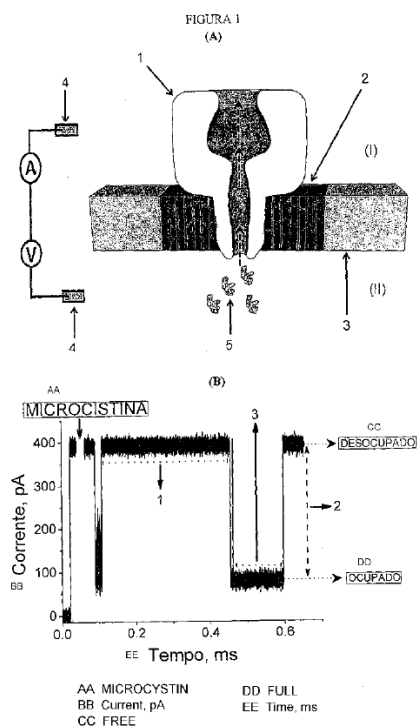
(71) Requerente (para todos os Estados designados, exceto US) : **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE** [BR/BR]; Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP-50670-901 Recife, PE (BR).

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

(Continua na página seguinte)

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

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



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

(57) Resumo :

(Continua na página seguinte)

WO 2013/026123 A1

WO 2013/026123 A1



DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados Designados** (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG,

KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))
- a data de depósito do pedido internacional cai dentro do prazo de dois meses a contar da data de expiração do período de prioridade (Regra 26bis.3)

De acordo com a presente invenção existem diversos processos para detecção de microcistinas, limitados na capacidade de identificação adequada e monitoramento em tempo real de variantes estruturais destas toxinas. No presente processo inventivo e o dispositivo inventivo pode-se realizar a detecção, identificação, quantificação e monitoramento em tempo real de microcistinas em meios aquosos. O processo inventivo é baseado no fato de que a entrada e interação de microcistinas no lume aquoso de um nanoporo protéico formado pela alfatóxina incorporada em um suporte resistivo, provoca eventos discretizados na corrente iônica que flui através do nanoporo. A série temporal destes eventos é representativa e correlacionada com a variante estrutural da microcistina presente na solução contida em um dos reservatórios condutores. A análise estatística segmental da série temporal combinando o método dos mínimos quadrados e algoritmo de otimização genética, permite discriminar em tempo real as variantes de microcistinas. O dispositivo inventivo consiste basicamente em um nanoporo incorporado em uma bicamada lipídica que separa dois reservatórios condutores, onde em um deles se coloca as microcistinas.

“UTILIZAÇÃO DE UM NANOPORO PROTÉICO PARA DETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DE MICROCISTINAS EM SISTEMAS AQUOSOS”.

A presente invenção refere-se a um processo baseado na utilização de um nanoporo protéico para detecção, identificação, quantificação e monitoramento em tempo real de toxinas de baixo peso molecular, especificamente, as microcistinas em meios aquosos, bem como a um dispositivo para realização do processo.

Sabe-se que dois principais processos são atualmente empregados para detecção e identificação de microcistinas e outras cianotoxinas em meios aquosos, baseado principalmente em ensaios biológicos, bioquímicos e em suas propriedades físico-químicas. Estes processos diferem em seus princípios de detecção, identificação, complexidade de execução e custos operacionais. Dentre os processos bioquímicos normalmente realiza-se o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o ensaio de inibição da proteína fosfatase. O ELISA apesar de apresentar sensibilidade adequada, seu principal empecilho de ordem técnica, consiste nas reações cruzadas que podem levar a subestimação da concentração das cianotoxinas analisadas. Outrossim, o ensaio de inibição da proteína fosfatase é bastante sensível, porém, requer proteínas altamente purificadas de difícil disponibilização no mercado e ainda necessitam da utilização de fosfato radioativo, o que onera consideravelmente sua operacionalização, uma vez que exige o cumprimento das normas de segurança para manipulação de material radioativo. Os processos físico-químicos por sua vez são analíticos, e consideram as propriedades físico-químicas das microcistinas, tais como, a presença de grupos cromóforos sensíveis à radiação ultravioleta (UV) presentes na estrutura molecular destas cianotoxinas, cuja reatividade deve-se a grupos funcionais específicos, e também em sua estrutura ou peso molecular. Dentre os processos físico-químicos utilizam-se: cromatografia líquida de alta performance (HPLC), eletroforese capilar (EC), ressonância magnética nuclear (NMR) e a espectroscopia de massa (MS). A principal desvantagem da HPLC consiste na impossibilidade de identificação de variantes estruturais presentes em amostras de microcistinas, além da ausência de padrões específicos que podem inviabilizar sua ampla utilização, uma vez que, a identificação da amostra se dá pelo tempo de retenção. A EC apresenta baixa sensibilidade e também se faz necessário o pré-processamento da amostra no sentido de produzir produtos fluorescentes capazes de serem sensibilizados por um laser de comprimento de onda específico. Por outro lado a espectroscopia de massa e a ressonância magnética nuclear apesar de serem métodos eficientes para a determinação da estrutura molecular são bastante onerosas; e enquanto que o primeiro é destrutivo (impossibilitando o reaproveitamento da amostra analisada, para realização de contraprovas), no segundo é indispensável uma quantidade razoável (normalmente miligramas) de material de elevado grau de pureza.

Todos estes processos físico-químicos requerem pessoal altamente especializado e são muito onerosos para serem empregados de forma rotineira e em grande escala.

Adicionalmente todos os processos supracitados não permitem o monitoramento em tempo real de microcistinas, uma vez que, se faz necessário a coleta da amostra, na maioria das vezes, seu pré-processamento e finalmente a análise propriamente dita.

Nesta invenção utilizasse os conhecimentos da biomimética e se desenvolveu um processo para detecção, identificação, quantificação e monitoramento em tempo real de microcistinas em meio aquoso. O elemento de reconhecimento molecular é uma a nanoestrutura, o nanoporo protéico formado pela alfatoxina nativa, depositada e referenciada no Protein Data Bank sob código - PDB ID 7AHL.

Sabe-se, por exemplo, da patente US2010122907-A1 da utilização do nanoporo da alfatoxina para determinação da massa molecular de polímeros neutros, especificamente o polietilenoglicol, porém, desconhecesse o uso deste nanoporo como elemento de detecção, identificação, quantificação e monitoramento de variantes estruturais de microcistinas.

O nanoporo protéico da alfatoxina (aHL) é uma nanoestrutura formada por sete subunidades monoméricas, que se auto-inserem em uma bicamada lipídica, criando uma via aquosa para a passagem de diferentes partículas, desde, que apresentem diâmetro menor que a região mais estreita do nanoporo. A estrutura cristalina tridimensional e a estequiometria deste nanoporo são conhecidas. A geometria do poro aquoso e seu posicionamento assimétrico em relação ao plano da membrana lipídica, também já foram elucidados em condições dinâmicas empregando substâncias não eletrolíticas. Existem duas regiões do poro, uma com diâmetro de 4,6 nm que fica praticamente fora da membrana, e outra, que fica totalmente inserido na membrana e tem diâmetro de ~2 nm, sendo composto por 14 folhas β -barril. Estes dois domínios estão separados por uma constrição de ~1,4 nm de diâmetro. Adicionalmente o nanoporo formado pela alfatoxina apresenta elevada estabilidade e condutância iônica, facilidade de incorporação em membranas naturais e bicamadas lipídicas planas sintéticas.

Na figura 1, (A), esta representado um esquema do nanoporo protéico (1) inserido na membrana lipídica (2) construída em uma barreira resistiva (3) que separa dois reservatórios condutivos (I e II), e, na (B), o registro da corrente iônica captada por um dos eletrodos (4). O mecanismo de detecção de microcistinas (5) pelo nanoporo da alfatoxina se dá pela alteração transitória discretizada, denominada de agora em diante de evento de bloqueio (figura 1B), na corrente iônica que flui através do lume aquoso do nanoporo, quando da permeação de uma molécula de microcistina por uma das entradas do nanoporo. Na figura 1 B é demonstrado o tempo interbloqueio (1), que corresponde ao nanoporo DESOCUPADO, e, o evento de bloqueio que é caracterizado por amplitude (2) e tempo de duração (3). A amplitude depende do volume relativo ocupado pela microcistina quando presente no nanoporo, e, corresponde a diminuição na condutância do nanoporo, comparativamente a situação em que a microcistina não o ocupa; enquanto que o tempo de duração do evento corresponde ao tempo de residência de uma molécula de microcistina no lume aquoso, ou seja, o tempo em que o nanoporo fica OCUPADO.

A figura 2 representa que a série temporal dos eventos de bloqueios juntamente com os tempos interbloqueios correlacionasse com a variante estrutural da microcistina, portanto, é uma espécie de sua “IMPRESSÃO DIGITAL” (A), e que a análise da série temporal dos eventos de bloqueio relativos a cada valor médio de condutância, é operacionalizada traçando-se um histograma de todos os tempos, gerando uma distribuição de tempos característicos de cada variante da microcistina (B). Igualmente a frequência dos eventos de bloqueio, ou seja, o intervalo de tempo interbloqueios depende da concentração das variantes estruturais da microcistina presente na solução contida no reservatório de onde ela advém.

Na figura 3 representa-se de forma esquemática o diagrama modular do método de análise, e, a diferença entre os valores médios da condutância do nanoporo na ausência e na presença das variantes da microcistina no lume aquoso do nanoporo, de agora em diante denominada, condutância residual, que permite, através de um gráfico bidimensional, a identificação em tempo real das variantes estruturais de microcistinas.

Na figura 4 representasse a análise dos tempos interbloqueios, que representam a ausência de microcistina no interior do nanoporo, denominado de agora em diante, tempo característico de não-ocupação, representado por τ_{on} . A forma inversa, $1/\tau_{on}$, denominado de agora em diante como taxa de transição, é proporcional a concentração da microcistina, o que permite determinar a concentração de microcistina na solução.

A figura 5 ilustra a montagem mecânica do aparato, ou seja, a câmara experimental (1) empregada para realização do processo. Os dois reservatórios (I) e (II) onde se colocam soluções iônicas, são separados por uma barreira resistiva (2) composta por uma película não condutora que apresenta em sua região central, um pequeno orifício circular de 50 μ M de diâmetro. Neste orifício usando lipídeo sintético, constrói-se uma bicamada lipídica (3). Cada um dos reservatórios contendo solução eletrolítica é acoplado eletricamente ao amplificador de alta impedância configurado como conversor corrente-voltagem (não representado na figura), através de eletrodo prata-cloreto de prata (Ag-AgCl) (4) mantidos em pontes salinas do tipo agarose 2% em cloreto de potássio 3M, acomodado em ponteiras plásticas com volume de 200 μ L, não esquematizada na figura. A corrente que flui através do nanoporo é condicionada por meio de filtro passa-baixa do tipo Butterworth, posteriormente digitalizada por um sistema de registro (5) formado por uma placa conversora analógico-digital, e finalmente armazenada diretamente na memória de um microcomputador (não representado na figura).

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para detecção de toxinas de baixo peso molecular, especificamente microcistinas em meio aquoso, caracterizado pelo fato de que a interação de moléculas de microcistinas através do lume aquoso do nanoporo protéico formado pela alfatoxina nativa, gera alterações discretizadas típicas no fluxo da corrente iônica que o permeia e, que estas alterações são dependentes desta classe de toxinas.

2. Processo para identificação de variantes estruturais de microcistinas em meio aquoso, caracterizado pelo fato de que a interação de cada variante estrutural da microcistina através do lume aquoso do nanoporo protéico formado pela alfatoxina nativa, provoca alterações discretizadas específicas no fluxo de corrente iônica que o permeia, e, que estas alterações são dependentes das propriedades estruturais de cada variante da microcistina.

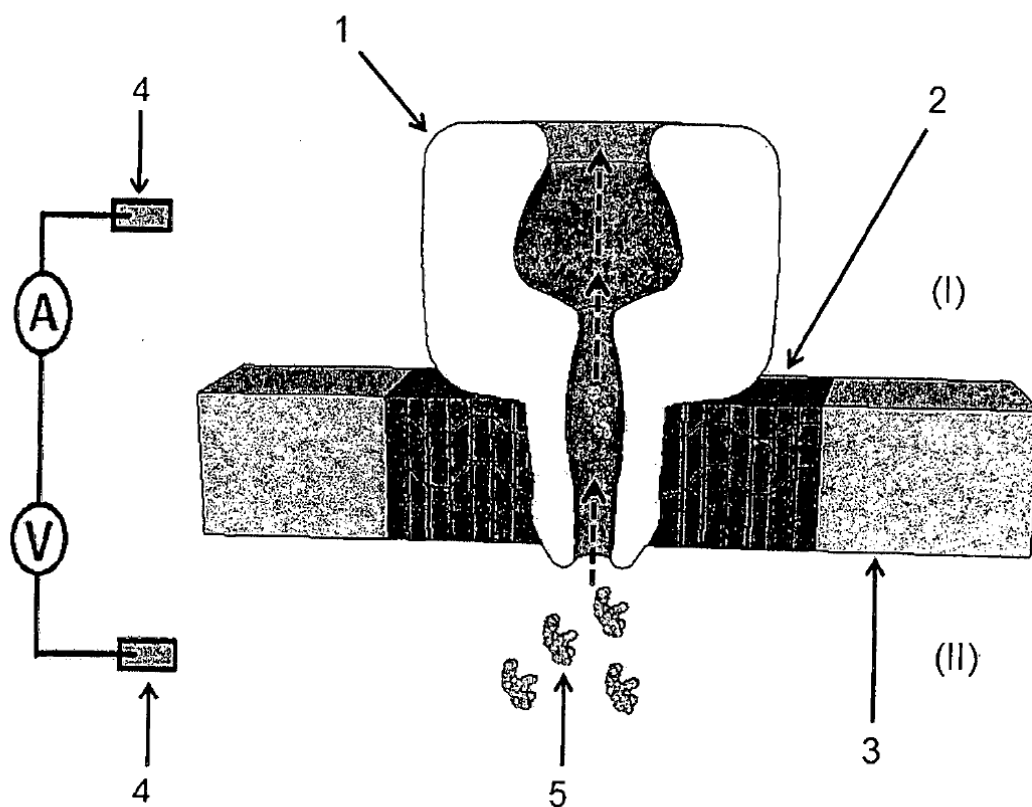
3. Processo para quantificação de microcistinas em meio aquoso, caracterizado pelo fato de que a interação de cada variante estrutural da microcistina através do lume aquoso do nanoporo protéico formado pela alfatoxina nativa, provoca alterações discretizadas específicas no fluxo de corrente iônica que o permeia, e, que a distribuição dos intervalos de tempo entre os eventos sucessivos de bloqueio de corrente iônica provocados por interação de cada variante estrutural da microcistina com o lume aquoso do nanoporo protéico, são dependentes da concentração ou quantidade destas moléculas no reservatório de onde elas advêm.

4. Processo para o monitoramento em tempo real de microcistinas em meio aquoso, caracterizado pelo fato de que a interação de cada variante estrutural da microcistina através do lume aquoso do nanoporo protéico formado pela alfatoxina nativa, provoca alterações discretizadas específicas para cada microcistina e que sua comparação com um banco de dados permite a identificação instantânea de cada molécula de microcistina que interagir com o nanoporo.

5. Dispositivo de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4 caracterizado por uma câmara experimental composta por material isolante e inerte, dividida em dois reservatórios condutores separados por uma barreira resistiva, no qual há uma única via de condução elétrica.

FIGURA 1

(A)



(B)

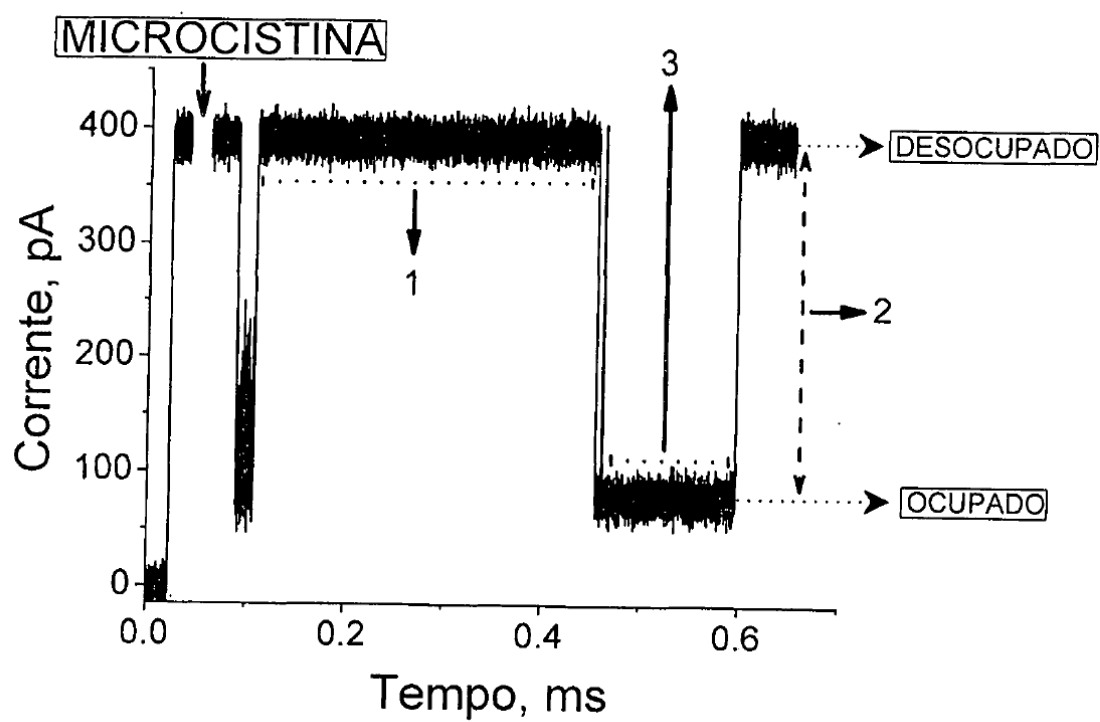
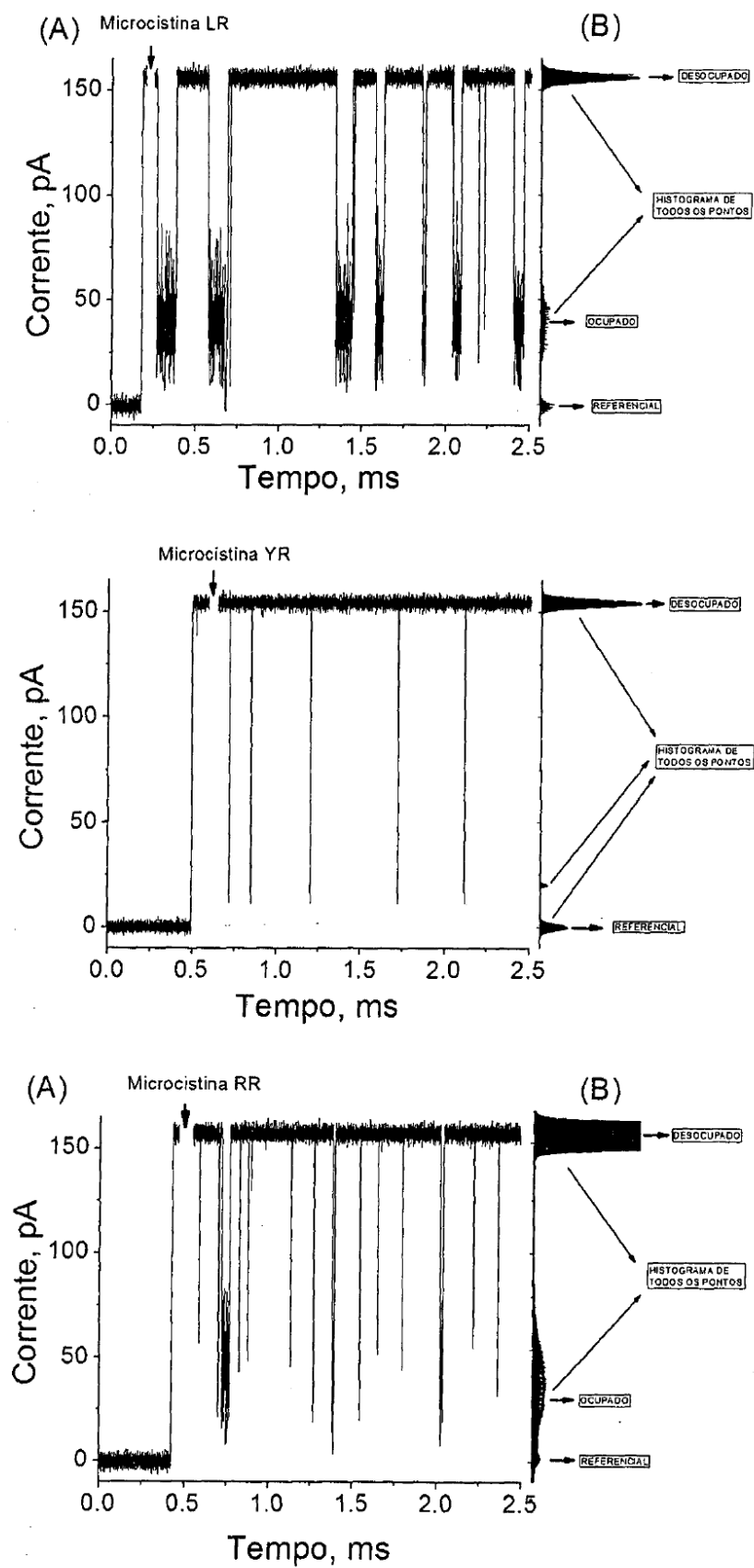


FIGURA 2



3/4

FIGURA 3.

(A)

MÓDULO DE AQUISIÇÃO DOS REGISTROS DE CORRENTE IÔNICA ATRAVÉS DO NANOPORO.

(Os dados são digitalizados e gravados em arquivo de formato proprietário)



MÓDULO DE APRESENTAÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DA SÉRIE TEMPORAL DE EVENTOS DE BLOQUEIO

(Os dados são processados por algoritmo baseado no método dos mínimos quadrados juntamente com algoritmo genético para decodificação do número de Gaussianas)



MÓDULO DE IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DE MICROCISTINAS

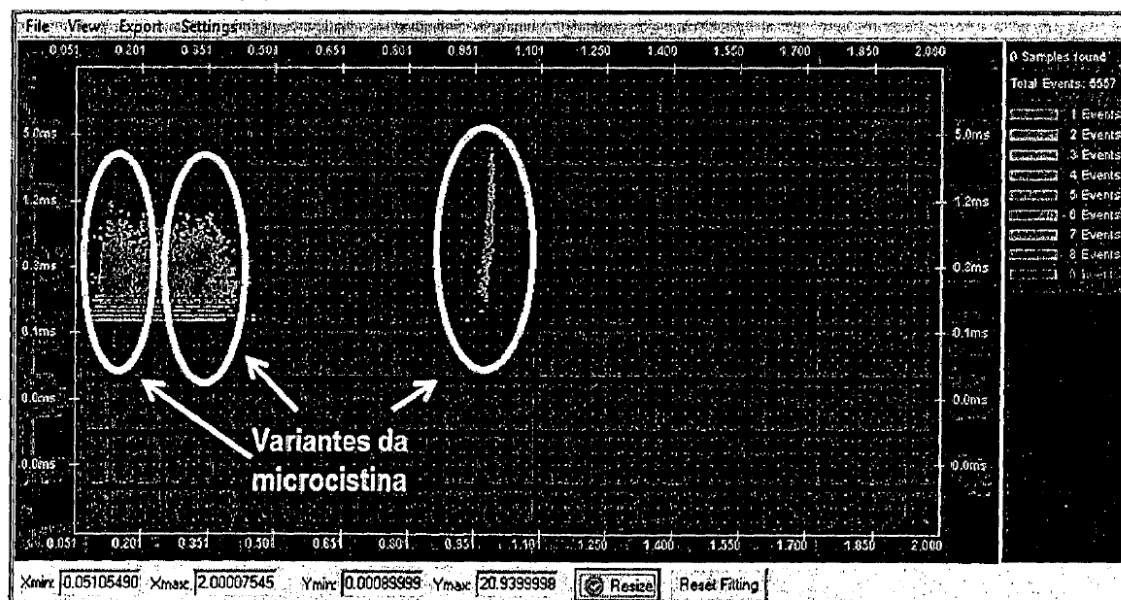
(A distribuição bidimensional de tempo dos eventos de bloqueio e a condutância residual, agrupamentos em "ilhas" correlacionadas a cada variante da microcistina)



MÓDULO DE CONSULTA AO BANCO DE DADOS E IDENTIFICAÇÃO AUTOMÁTICA DAS VARIANTES DE MICROCISTINA

(O padrão de agrupamento das "ilhas" é comparado junto ao banco de dados formado por agrupamentos de variantes de microcistina previamente armazenados)

(B)



4/4

FIGURA 4.

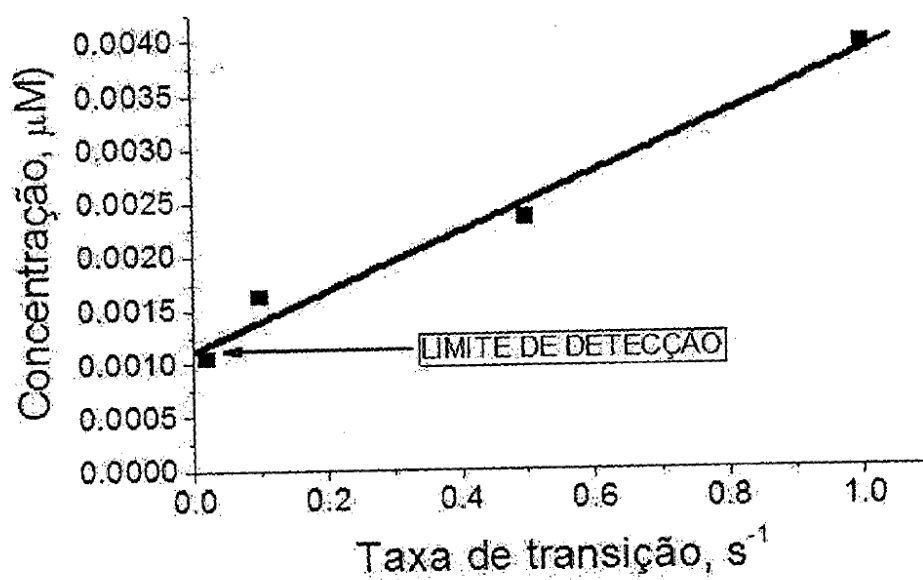
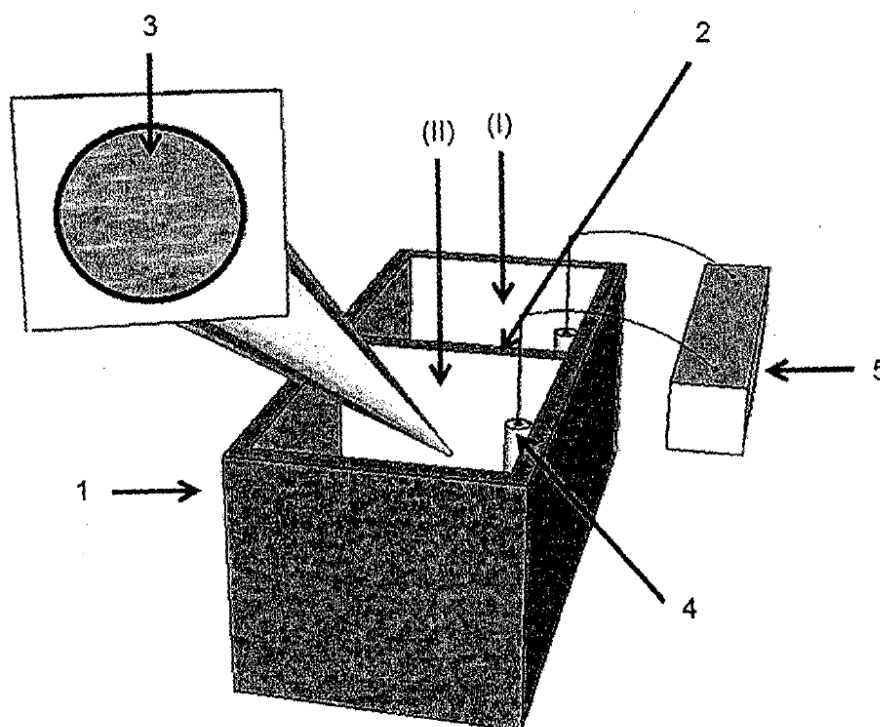


FIGURA 5.



Anexo C: resumos apresentados em congressos nacionais.

1. Resumo apresentado na XXVI Reunião Anual da FESBE (2011).

ResumoID: 181-1

SPECIFIC ANION EFFECT ON DNA TRANSLOCATION THROUGH PROTEIN NANOPORE

BRITO, A.M.S.; MACHADO, D. C. ; RODRIGUES, C. G. ; KRASILNIKOV, O. V.
Departamento de Biofisica e Radiobiologia, UFPE

Keywords: alfa-hemolysin, DNA sequencing, Hofmeister, protein nanopore

Objectives:

In all currently used methodologies nucleic acids need to be marked and/or amplified before sequencing. The use of nanopore technology (that is believed to be a base of a new generation sequencers) does not demand amplification and/or labeling. Unitary α -hemolysin nanopore in planar lipid bilayers is supposed to be a key element of such sequencers where the "reading" of the nucleotide sequence will occur during electrophoretically driving translocation of single-stranded DNA (ssDNA) through the pore (Nanoscale, 2:468-483, 2010). However, the extremely high speed of ssDNA-translocation prevents a secure identification of nucleotides by this type of sequencer. The main objective of this study was to evaluate the influence of different anions on translocation speed of ssDNA molecules.

Methods and Results:

Planar lipid bilayer membranes of 40 pF capacitance were formed by the lipid monolayer apposition technique (Proc Nat Acad Sci USA, 69:3561-3566, 1972), using 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *S. aureus* α -hemolysin was added from the cis side of the membrane in a concentration sufficient to form unitary protein nanopore in planar lipid membranes. The experiments were carried out at voltage clamp at room temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$. The membrane-bathing aqueous solution contained 4 M KCl or KF (both 99.99% purity) in 5 mM Tris-citric acid buffer (pH 7.5). Poly-dA 50b ssDNA was used as a probe added in the cis compartment of the experimental chamber. As expected, the residence time (τ_{off}) of the DNA inside of the pore was found to decrease with voltage. We have established the values of τ_{off} depended strongly on the salt species demonstrating the specific (Hofmeister) effect. τ_{off} was found to be significantly larger (22 ± 2 times) in KF solution in compare with KCl. So a simple change in ion composition leads to considerable, more than one order of magnitude, improving the detection and analysis of nucleic acids.

Conclusions:

Modification of ion composition is the simple maneuvers considerably improves the resolution of kinetic parameters of DNA/ α -hemolysin nanopore interaction and could be helpful for developing of nanopore based new generation DNA sequencers.

Financial Support: CNPq, FACEPE, INAMI

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

INFLUÊNCIA DA VISCOSIDADE E CONDUTIVIDADE DA SOLUÇÃO NA CONDUTÂNCIA DO NANOSENSOR DA ALFAHEMOLISINA

Autores ¹MELO, M. C. D. A. ¹, MACHADO, D. C. ¹, RODRIGUES, C. G. ¹ DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA - UFPE

Apoio Financeiro: CNPq/Capes, INCT-INAMI

Resumo**Introdução**

Os canais iônicos encontrados em membranas biológicas são naturalmente utilizados por diversos tipos de microorganismos e células, como elemento de reconhecimento molecular, possibilitando o emprego destas nanoestruturas proteicas, como elemento sensor e transdutor para o desenvolvimento de uma nova geração de biossensores estocásticos (Anal Chim Acta 675: 106, 2010). O nanoporo formado pela incorporação da alfatoxina em bicamadas lipídicas, é um bom modelo para detecção de analitos em meio aquoso, sendo utilizado até como um espectrômetro de massa, com sensibilidade para diferenciação de até uma única unidade monomérica do polímero neutro (Pat. USA 2010/012290, 2010). Por outro lado para outros polímeros mais complexos (carga residual e maiores grupamentos laterais) incluindo o DNA, ainda é necessário padronizar as condições experimentais favoráveis à detecção adequada.

Objetivos

Analisar a influência da viscosidade e condutividade da solução na condutância do nanoporo da alfatoxina visando estabelecer condições físico-químicas "ideais" para otimização da detecção de polímeros complexos.

Código de Experimentação Animal**Código de Experimentação Humana****Métodos**

A viscosidade das soluções foram determinadas com um Reômetro oscilatório digital (Anton Paar, Physica MCR 301). As medidas foram avaliadas na solução de KCl 4M acrescidas de glicerol em concentrações (5, 10, 15, 16, 17, 18, 19 e 20% p/v). As membranas lipídicas foram confeccionadas de acordo com a técnica de Montal & Mueller (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:3561, 1972). Todos os experimentos com as bicamadas, confeccionadas com o lipídeo DPhPC (Avanti Lipids, USA) sintético, foram realizados em condições de fixação de voltagem usando um amplificador de patch clamp (Axonpatch 200B). O valor da condutância média do nanoporo em 40 mV, foi obtida nas soluções banhantes de KCl 4M, Tris 5 mM, pH 7,5 e glicerol nas concentrações de 5% ou 10% (p/v); pela incorporação de mais de 100 canais. A incorporação dos nanoporos se deu pela adição de alfatoxina (Calbiochem, USA) à solução banhante da membrana. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Na confecção dos histogramas utilizamos o programa Origin 8.0.

Resultados

Os valores de viscosidade da solução de KCl 4M, acrescida de 5% e 10% de glicerol foram: $0,88 \pm 0,1$ (n=3); $0,99 \pm 0,2$ (n=3) e $1,11 \pm 0,2$ (n=3) (mPa.s), respectivamente. A diminuição da condutividade da solução de KCl 4 M ($533,33 \pm 1,2$, n=6) e glicerol 5% ($205,17 \pm 1,1$, n=6) ou 10% ($198,4 \pm 0,8$, n=6) foi mais acentuada que o aumento na viscosidade da solução. Por outro lado a taxa de redução na condutância do nanoporo em KCl 4M ($3,812 \pm 0,02$, n=161), KCl 4M, 5% de glicerol ($3,114 \pm 0,85$, n=350) ou KCL 4M, 10% de glicerol ($2,54 \pm 0,02$; n=190), manteve-se praticamente constante.

Conclusão

A diminuição na condutividade da solução influencia de maneira mais acentuada que o aumento em sua viscosidade, na taxa de redução da condutância do nanoporo formado pela alfatoxina, portanto, as soluções mais viscosas são mais indicadas para melhorias na sensibilidade do sensor formado por este canal.

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

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

Apoio Financeiro: CNPq, INCT-INAMI, UFPE

Resumo

Introdução

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

Objetivos

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

Código de Experimentação Animal

Código de Experimentação Humana

Métodos

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

Resultados

A condutância do nanoporo é um parâmetro importante, pois pode interferir na relação sinal/ruído, na análise da corrente residual (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:20, 2007) e consequentemente na identificação dos nucleotídeos. O valor da condutância do nanoporo da alfatoxina em 40 mV foi de: 3.812 ± 0.02 (n=161); 2.558 ± 0.01 (n=166); 3.845 ± 0.01 (n=104) nS na solução de KCl, KF, ou KBr, respectivamente. O valor do tempo de permanência do ssDNA no nanoporo no potencial de 100 mV, aumentou em aproximadamente 20x na solução de Fluoreto (4.82 ± 0.30 ms, n=3), em relação ao Cloreto (0.212 ± 0.02 ms, n=3) e ao Brometo (0.301 ± 0.23 ms, n=3).

Conclusão

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

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

DETECÇÃO DE POLÍMEROS DE BASE VINÍLICA PELO NANOPORO PROTÉICO DE ALFATOXINA

Autores ¹BARROS, S. M. ¹, MACHADO, D. C. ¹, RODRIGUES, C. G. ¹ Departamento de Biofísica e Radiobiologia - UFPE

Apoio Financeiro: CNPq, inct-INAMI, CAPES

Resumo

Introdução

O nanoporo proteico da alfatoxina tem sido bastante estudado com interesse nanobiotecnológico, principalmente, como elemento de reconhecimento molecular para o desenvolvimento de dispositivos analíticos (Chem. Rev. 112:6431, 2012). Em todas as aplicações o mecanismo molecular fundamental consiste na interação em meio aquoso iônico, entre uma molécula (analito) de interesse com o nanoporo proteico unitário; gerando alteração (bloqueios) no fluxo iônico através do canal e, finalmente resultando em uma série temporal de eventos de bloqueio da corrente iônica que é característica da molécula que entra ou permeia o nanoporo (Phys Rev. Lett. 97:018301, 2006). Neste contexto, recentemente demonstramos que o simples aumento da concentração do KCl (de 1M para 4M) (Biophys. J. 95:5186, 2008) melhora qualitativamente as características do nanoporo da alfatoxina como sensor, permitindo, sua utilização como potencial espectrômetro de massas (Pat. US 2010/0122907, 2010) para o polímero neutro polietilenoglicol (PEG). Apesar de todos os avanços obtidos, muitas dificuldades ainda precisam ser superadas para a disponibilização comercial de dispositivos baseados no nanoporo, principalmente para a detecção de analitos poliméricos de estrutura molecular mais complexa. Deste modo propomos ampliar a caracterização de polímeros sintéticos de estrutura química similar ao PEG, mas com um aumento na complexidade molecular, a fim de demonstrar a eficiência deste dispositivo sensor na caracterização diferenciada de polímeros sintéticos variados.

Objetivos

Utilizar o nanoporo proteico formado pela alfa-toxina de *Staphylococcus aureus*, para a detecção dos polímeros sintéticos Polivinilpirrolidona (PVP) e Polivinil álcool (PVA).

Código de Experimentação Animal

Código de Experimentação Humana

Métodos

As bicamadas lipídicas utilizadas neste trabalho foram confeccionadas de acordo com a técnica de Montal & Mueller (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 3561, 1972), utilizando diftanoilfosfatidilcolina (DPhPC), (Avanti Lipids, USA) e para a formação do poro a proteína alfatoxina (Calbiochem, USA). Todos os experimentos foram executados sob as condições de temperatura ambiente de 25 ± 1 °C; fixação de voltagem, empregando um amplificador de Patch Clamp (Axon Patch 200B) como descrito em (Biophys. J. 100: 2929, 2011), solução banhante da membrana composta por 4M KCl, 5mM Tris e pH 7.5. Os polímeros empregados foram o Polivinilpirrolidona (PVP) de 10KDa e Polivinil álcool (PVA) 50KDa (Aldrich, USA). A condutância de um único canal, determinada em voltagens aplicadas de -200 a +200 mV, foi utilizada para construção do gráfico G-V (condutância-voltagem) dependente nas condições controle e experimental, na ausência e presença dos um dos polímeros adicionados.

Resultados

O efeito dos polímeros na redução da condutância do nanoporo foi dependente do potencial transmembrana, sendo igual a 60 mV para o PVP, e de 160 mV, para o PVA. Adicionalmente os perfis de bloqueio foram característicos de cada polímero analisado (PVP e PVA), bem como a porcentagem (50% e 90%) de redução na condutância do nanoporo, respectivamente.

Conclusão

O nanoporo formado pela alfatoxina interage com a Polivinilpirrolidona e o Polivinil álcool, gerando um perfil de bloqueios característicos de cada um, permitindo sua detecção, e demonstrando que estes polímeros em solução aquosa de KCl 4 M encontram-se eletricamente carregados.

Palavras-chaves: alfatoxina, detecção, nanoporo, Polivinilpirrolidona, Polivinil álcool