



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

POLIANA MENEZES VELOSO

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO DA SAXITOXINA E
CIGUATOXINA COM O NANOPORO PROTEICO DA ALFA-
HEMOLISINA**

Recife
2023

POLIANA MENEZES VELOSO

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO DA SAXITOXINA E
CIGUATOXINA COM O NANOPORO PROTEICO DA ALFA-
HEMOLISINA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Cláudio Gabriel Rodrigues
Coorientadora: Dijanah Cota Machado

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Veloso, Poliana Menezes.

Análise da interação da saxitoxina e ciguatoxina com o nanoporo proteico da alfa-hemolisina / Poliana Menezes Veloso. - Recife, 2023.

34 p. : il., tab.

Orientador(a): Cláudio Gabriel Rodrigues

Cooorientador(a): Dijanah Cota Machado

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

1. Alfa-hemolisina. 2. Biossensor estocástico. 3. Nanoporo proteico. 4. Toxinas aquáticas. 5. Docking molecular. I. Rodrigues, Cláudio Gabriel. (Orientação). II. Machado, Dijanah Cota. (Coorientação). III. Título.

500 CDD (22.ed.)

POLIANA MENEZES VELOSO

ANÁLISE DA INTERAÇÃO DA SAXITOXINA E CIGUATOXINA COM O NANOPORO PROTEICO DA ALFA-HEMOLISINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Biomedicina da
Universidade Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de Bacharel
em Biomedicina.

Aprovada em: 28/04/2023

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente
DIJANAH COTA MACHADO
Data: 09/06/2023 15:11:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Dijanah Cota Machado
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Iranildo José da Cruz Filho
Universidade Federal de Pernambuco



Documento assinado digitalmente
JANILSON JOSE DA SILVA JUNIOR
Data: 09/06/2023 13:52:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Janilson José da Silva Júnior
Centro Universitário Maurício de Nassau

Dedico este trabalho à minha mãe Ana Paula (*in memoriam*). Mulher forte e gentil que, por toda a vida, me ensinou a importância de persistir nos meus sonhos e trilhar meu próprio caminho. Me formar biomédica é mais um dos nossos sonhos sendo realizado, amo você para sempre, obrigada por acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, o professor Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues, e coorientadora, a professora Dr^a. Dijanah Cota Machado. Tenho muita gratidão por todos os ensinamentos, disponibilidade e contribuição na minha formação acadêmica.

Também quero agradecer aos membros do Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-tronco - Dr. Oleg Krasilnikov (LBM-CT).

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo apoio financeiro e concessão da bolsa.

A todas as mulheres da minha família pelo incentivo, apoio e carinho nos momentos difíceis, em especial, minhas tias Ana Elizabeth Menezes e Ângela Pereira, minhas primas Juliana e Danielle Menezes, minhas sobrinhas Ana Júlia e Ana Luíza e minha cunhada Mônica Menezes.

Ao meu irmão Rafael Davi e meu pai Dario Veloso.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, participaram desta importante conquista.

Muito obrigada!

VELOSO, Poliana Menezes. **Análise da interação da saxitoxina e ciguatoxina com o nanoporo proteico da alfa-hemolisina.** 2023. 34 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

Atualmente, uma das causas significativas de morbimortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento é a intoxicação alimentar aguda. A saxitoxina e ciguatoxina são biotoxinas causadoras desse tipo de enfermidade, são produzidas por espécies de dinoflagelados como *Alexandrium catanella* e *Gambierdiscus toxicus*, respectivamente. Essas toxinas chegam ao ser humano por meio da cadeia trófica quando são consumidas por outros animais aquáticos. A saxitoxina é responsável por causar a Síndrome do Envenenamento Paralisante pelo consumo de Moluscos (*Paralytic Shellfish Poisoning*), devido ao seu mecanismo de ação que bloqueia a corrente de excitação das células nervosas e musculares, resultando em paralisia do intoxicado e, em casos extremos, morte por asfixia. Já a ciguatoxina é uma biotoxina agonista do canal de sódio e é responsável pela doença ciguatera, que produz sintomas gastrointestinais, neurológicos e, em menor grau, cardiovasculares. As técnicas atualmente empregadas para detecção destas e outras biotoxinas causadoras de intoxicações alimentares agudas associadas ao consumo de pescados são onerosas e demoradas. O emprego de um dispositivo sensor, como o baseado no nanoporo proteico da alfa-hemolisina (NPA), poderá ser usado futuramente como método alternativo e mais eficaz. Para a etapa inicial do desenvolvimento deste dispositivo será utilizado o princípio do biossensoriamento estocástico. O biossensoriamento estocástico é uma abordagem recente onde é possível a observação de eventos de interação entre as moléculas individuais de analitos e um único nanoporo. Visando compreender o mecanismo de interação das biotoxinas com o nanoporo proteico escolhido, utilizamos o método de docking molecular, uma abordagem *in silico* que simula as interações intermoleculares envolvidas entre um ligante e um receptor. A estrutura cristalográfica do NPA foi obtida no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*) com o código 7AHL e as estruturas das biotoxinas foram obtidas na plataforma *PubChem*. Posteriormente, tais estruturas tiveram suas energias minimizadas no programa Avogadro, utilizando o campo de força MMFF94s. O docking molecular foi realizado na plataforma *DockThor* e no programa *GOLD*, onde foram obtidos os valores de energia de interação entre o NPA e as biotoxinas. Os modos de ligação entre o receptor e ligantes foram avaliados por meio do programa *Discovery Studio Visualizer*. Os dois ligantes foram submetidos ao docking molecular três vezes em cada software. No DockThor, a saxitoxina apresentou nas três submissões a melhor rodada de número 8, com energia de afinidade igual a - 6,312 kcal/mol e energia total - 94,565 kcal/mol. Já a ciguatoxina apresentou três melhores rodadas diferentes de acordo com cada submissão, sendo elas as rodadas de número 11, 22 e 11. A média e o desvio padrão obtidos dos valores de energia de afinidade e energia total dessas três rodadas foram - 8,304 ± 0,3985; 185,875 ± 2,1146 (kcal/mol), respectivamente. No GOLD, a saxitoxina apresentou os seguintes valores de *fitness* 41,3821 ± 0,6103. Avaliando os valores de energia de afinidade, energia total e o número de ligações de hidrogênio apresentados, espera-se que, em termos experimentais, a interação NPA-saxitoxina seja mais forte que a interação NPA-ciguatoxina.

Palavras-chave: Alfa-hemolisina. Biossensor estocástico. Nanoporo proteico. Toxinas aquáticas. Docking molecular.

VELOSO, Poliana Menezes. **Analysis of the interaction of saxitoxin and ciguatoxin with the alpha-hemolysin protein nanopore**. 2023. 34 pages. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Currently, one of the significant causes of morbidity and mortality in developed and developing countries is acute food poisoning. Saxitoxin and ciguatoxin are biotoxins that cause this type of disease, they are produced by species of dinoflagellates such as *Alexandrium catanella* and *Gambierdiscus toxicus*, respectively. These toxins reach humans through the trophic chain when they are consumed by other aquatic animals. Saxitoxin is responsible for causing the Paralytic Shellfish Poisoning Syndrome (*Paralytic Shellfish Poisoning*), due to its mechanism of action that blocks the excitation current of nerve and muscle cells, resulting in paralysis of the intoxicated and, in extreme cases, death by asphyxiation. Ciguatoxin, on the other hand, is a sodium channel agonist biotoxin and is responsible for ciguatera disease, which produces gastrointestinal, neurological and, to a lesser extent, cardiovascular symptoms. The techniques currently used to detect these and other biotoxins that cause acute food poisoning associated with fish consumption are costly and time-consuming. The use of a sensor device, such as the one based on the alpha-hemolysin protein nanopore (APN), could be used in the future as an alternative and more effective method. For the initial stage of the development of this device, the principle of stochastic biosensing will be used. Stochastic biosensing is a recent approach where it is possible to observe interaction events between individual analyte molecules and a single nanopore. In order to understand the mechanism of interaction of biotoxins with the chosen protein nanopore, we used the molecular docking method, an *in silico* approach that simulates the intermolecular interactions involved between a ligand and a receptor. The crystallographic structure of APN was obtained from the PDB database (Protein Data Bank) with the code 7AHL and the structures of the biotoxins were obtained from the PubChem platform. Subsequently, such structures had their energies minimized in the Avogadro program, using the MMFF94s force field. Molecular docking was performed on the DockThor platform and in the GOLD program, where the interaction energy values between APN and biotoxins were obtained. Binding modes between the receptor and ligands were evaluated using the Discovery Studio Visualizer program. The two ligands were subjected to molecular docking three times in each software. In DockThor, saxitoxin presented in the three submissions the best round number 8, with affinity energy equal to - 6.312 kcal/mol and total energy - 94.565 kcal/mol. Ciguatoxin, on the other hand, presented three different best rounds according to each submission, which are rounds numbered 11, 22 and 11. The mean and standard deviation obtained from the values of affinity energy and total energy of these three rounds were - 8.304 ± 0.3985; 185.875 ± 2.1146 (kcal/mol), respectively. In GOLD, saxitoxin presented the following fitness values 41.3821 ± 0.6103. Evaluating the values of affinity energy, total energy and the number of hydrogen bonds presented, it is expected that, in experimental terms, the APN-saxitoxin interaction is stronger than the APN-ciguatoxin interaction.

Keywords: Alpha-hemolysin. Stochastic biosensor. Protein nanopore. Aquatic toxins. Molecular docking.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	BIOTOXINAS AQUÁTICAS	10
2.1.1	Intoxicações Alimentares Causadas pelo Consumo de Pescados	10
2.2	SAXITOXINA	12
2.3	CIGUATOXINA	13
2.4	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETECÇÃO DE BIOTOXINAS AQUÁTICAS	14
2.4.1	Métodos Biológicos	14
2.4.2	Métodos Químicos	14
2.4.2.1	Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC	14
2.4.2.2	Imunoensaios enzimáticos - ELISA	15
2.5	NANOPORO PROTEICO	16
2.6	DOCKING MOLECULAR	17
3	OBJETIVOS	20
3.1	OBJETIVO GERAL	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4	METODOLOGIA	21
4.1	OBTENÇÃO E MINIMIZAÇÃO DA ENERGIA DAS MOLÉCULAS	21
4.2	OBTENÇÃO E DESIDRATAÇÃO DA PROTEÍNA ALFA-HEMOLISINA	21
4.3	CÁLCULO DE CENTRO DE GRID	21
4.4	DOCKING MOLECULAR	22
4.4.1	Docking Molecular com o Software DockThor	22
4.4.2	Docking Molecular com o Software GOLD	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	ANÁLISE DO DOCKING MOLECULAR COM O SOFTWARE DOCKTHOR	24
5.1.1	Saxitoxina	24
5.1.2	Ciguatoxina	25
5.2	ANÁLISE DO DOCKING MOLECULAR COM O SOFTWARE GOLD	26
5.2.1	Saxitoxina	27
5.2.2	Ciguatoxina	27
6	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

Uma das causas significativas de morbimortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento é a intoxicação alimentar aguda (NELSON, 2016). Diversos tipos de alimentos estão relacionados à intoxicação alimentar, porém o pescado, embora seja considerado um alimento de alta digestibilidade e procura pelo valor nutricional agregado, é também um dos mais perecíveis, necessitando de atenção quanto à manipulação, desde a captura até o consumo ou industrialização (NEVES, 2015).

No Brasil, a produção de pescado rendeu mais de 570 milhões de toneladas em 2018 (EMBRAPA, 2021). Dentre os pescados, o peixe e seus produtos derivados representam os alimentos de origem animal mais comercializados em todo o mundo. Apesar disso, estudos apontam os riscos de intoxicação alimentar associada ao consumo de peixes, principalmente relacionada à contaminação por biotoxinas produzidas ou adquiridas pelo próprio animal. Este é o caso de biotoxinas produzidas por microalgas, que contaminam os peixes herbívoros (NEVES, 2015). Por sua vez, eles contaminam predadores, na maioria das vezes o homem.

A saxitoxina e ciguatoxina são biotoxinas produzidas por espécies de dinoflagelados como *Alexandrium catanella* e *Gambierdiscus toxicus*, respectivamente. Essas toxinas chegam ao ser humano por meio da cadeia trófica quando são consumidas por outros animais aquáticos. A saxitoxina é responsável por causar a Síndrome do Envenenamento Paralisante pelo consumo de Moluscos (*Paralytic Shellfish Poisoning* – PSP), devido ao seu mecanismo de ação que bloqueia a corrente de excitação das células nervosas e musculares, resultando em paralisia do intoxicado e, em casos extremos, morte por asfixia (PINTO, 2022). Já a ciguatoxina é uma biotoxina agonista do canal de sódio e é responsável pela doença ciguatera, que produz sintomas gastrointestinais, neurológicos e, em menor grau, cardiovasculares (COSTA, 2017).

Tendo em vista os danos financeiros que podem ser gerados na indústria de pescados e derivados, bem como os riscos à saúde humana, torna-se relevante o monitoramento e detecção dessas substâncias, em ambientes aquáticos ou amostras de pescados contaminados.

Os métodos utilizados convencionalmente para a identificação e quantificação desses agentes em alimentos ou ambientes aquáticos, como a cromatografia

acoplada à espectrometria de massas, imunoenaios e ensaios baseados em células são técnicas que apresentam vantagens inegáveis (SUZUKI et al., 2013; REVERTÉ et al., 2014). No entanto, estes ensaios apresentam desvantagens como tempo de análise, custos elevados e baixa sensibilidade de alguns deles. Nesse sentido, estudos impulsionam o desenvolvimento de métodos analíticos com alta sensibilidade, rapidez e precisão e que sejam menos onerosos (REVERTÉ et al., 2014).

O biossensoriamento estocástico é uma abordagem que se baseia na observação de eventos de interação entre as moléculas individuais de analitos e um único nanoporo (AGUIAR et al., 2015). A entrada de uma molécula no lume aquoso do nanoporo provoca um decréscimo parcial discretizado na corrente iônica que flui através do nanoporo (RODRIGUES et al., 2011); a partir de então, denomina-se este decréscimo de “bloqueio de corrente”. Cada bloqueio de corrente é caracterizado por uma amplitude e um intervalo de tempo. O conjunto de sucessivos bloqueios constitui uma série temporal (“impressão digital”) correlacionada com a massa e configuração espacial da molécula do analito (RODRIGUES et al., 2011). O nanoporo proteico da alfa-hemolisina apresenta dimensões, estabilidade e arquitetura molecular bem elucidada, favorecendo sua aplicabilidade no biossensoriamento estocástico.

A simulação de docking molecular é uma das abordagens *in silico* mais utilizadas devido, principalmente, ao baixo custo computacional e à ampla faixa de aplicações em eventos de reconhecimento molecular. O processo de docking molecular pode ser dividido em duas partes: primeiramente determinar qual a conformação do ligante no sítio de interação da macromolécula alvo, e secundariamente avaliar entre todas as conformações possíveis qual a melhor ranqueada, baseado na afinidade de ligação do complexo ligante-macromolécula (REIS, 2008).

Visto que o biossensoriamento estocástico baseado em nanoporo é promissor no desenvolvimento de dispositivos analíticos (AGUIAR, 2015) e que os métodos atualmente empregados para detecção da saxitoxina e ciguatoxina são onerosos e demorados (REVERTÉ et al., 2014), torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento e implementação de programas e dispositivos eficientes na monitorização e gestão dos impactos destas toxinas. Desta forma, este trabalho propõe avaliar a interação de biotoxinas marinhas com o nanoporo proteico formado pela alfa-hemolisina utilizando ferramentas *in silico*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOTOXINAS AQUÁTICAS

As biotoxinas aquáticas são substâncias tóxicas produzidas, em situações de estresse, por organismos como dinoflagelados e bactérias, que podem contaminar peixes e moluscos. Essas toxinas podem ser nocivas à saúde humana se consumidas através da ingestão de alimentos contaminados (VALE, 2004). Quando consumidos, esses organismos podem causar intoxicações alimentares que variam de leves a graves, produzindo uma variedade de sintomas como náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, entre outros, e em casos extremos podem levar até mesmo à morte (BARBIERI, 2009).

2.1.1 Intoxicações Alimentares Causadas pelo Consumo de Pescados

As intoxicações alimentares (Tabela 1) causadas pelo consumo de biotoxinas aquáticas através da ingestão de pescados contaminados são classificadas em cinco tipos: envenenamento paralisante (*Paralytic Shellfish Poisoning*), envenenamento neurotóxico (*Neurotoxic Shellfish Poisoning*), envenenamento diarreico (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*), envenenamento amnésico (*Amnesic Shellfish Poisoning*) e envenenamento por ciguatera (*Ciguatera Fish Poisoning*) (MOURA, 2011).

Tabela 1. Envenenamento pelo consumo de moluscos e peixes.

Síndrome Intoxicante	Sigla	Toxinas Envolvidas	Ação Tóxica	Vetores
Intoxicação Paralisante	PSP - <i>Paralytic Shellfish Poisoning</i>	Saxitoxina	Paralisia muscular	Mexilhões
Intoxicação Neurológica	NSP - <i>Neurologic Shellfish Poisoning</i>	Brevetoxinas e tetrodotoxina	Problemas neurológicos	Mexilhões, peixes
Intoxicação Diarreica	DSP - <i>Diarrhetic Shellfish Poisoning</i>	Spirolides, ácido ocadáico	Problemas gastrintestinais	Mexilhões
Intoxicação Amnésica	ASP - <i>Amnesic Shellfish Poisoning</i>	Ácido domóico	Problemas cerebrais (amnésia)	Mexilhões, Polvos
Intoxicação por Ciguatera	CFP - <i>Ciguatera Fish Poisoning</i>	Ciguatoxina	Problemas gastrintestinal e neurológico	Peixes

Fonte: adaptado de BATISTA; NEVES (2009) e CARVALHO (2021).

Paralytic Shellfish Poisoning (PSP): envenenamento causado por biotoxinas do grupo das saxitoxinas, produzidas por algumas espécies de Dinoflagelados marinhos, pertencentes principalmente aos gêneros *Alexandrium spp.*, *Gymnodinium spp.* e *Pyrodinium spp.*; e pela cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*, que compõe a biota da Lagoa Peri, localizada no sul de Florianópolis (MIOTTO, 2017). Os sintomas produzidos por estas biotoxinas incluem sensações de formigamento, dormência, queimação e paralisia respiratória. Esta toxina atua bloqueando as funções nervosas através da obstrução da passagem do íon sódio pela membrana celular, podendo levar à morte por asfixia nas primeiras 24 horas (BATISTA; NEVES, 2009; CARVALHO, 2021).

Amnesic Shellfish Poisoning (ASP): envenenamento causado pelo ácido domóico, uma biotoxina produzida pela Diatomácea marinha (*Pseudo-nitzschia spp.*), com sintomas que incluem vômitos, diarreia, dor abdominal, tremores, dor de cabeça, por problemas neurológicos de perda de memória e desorientação, e possivelmente o coma. O ácido domóico atua nas sinapses entre os neurônios, seu mecanismo de ação é causar um descontrole no transporte de íons Cálcio e Sódio através de canais iônicos, causando danos e morte do neurônio (apoptose) (BATISTA; NEVES, 2009; CARVALHO, 2021).

Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP): envenenamento causado pelo ácido ocadáico e spirolides, uma classe de substâncias bioativas produzida pelo gênero *Alexandrium sp.*, por meio do consumo de mexilhões contaminados. Os principais sintomas produzidos por estas biotoxinas são gastrintestinais como náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal, acompanhada de calafrios, dor de cabeça e febre (BATISTA; NEVES, 2009; CARVALHO, 2021).

Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP): envenenamento causado pela biotoxina brevetoxina, produzida pelo dinoflagelado *Gymnodinium breve*. Os sintomas causados são gastrointestinais e neurológicos e incluem formigamento e paralisação dos lábios, língua e garganta, dores musculares, vertigem, reversão da sensação de calor e frio, diarreia e vômitos. A recuperação ocorre em dois a três dias e a morte não ocorre frequentemente (BATISTA; NEVES, 2009; CARVALHO, 2021).

Ciguatera Fish Poisoning (CFP): envenenamento causado pelas ciguatoxinas, produzidas pelo dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus*, associado com outros dinoflagelados como *Ostreopsis*, *Coolia* e *Amphidinium*. Os sintomas são caracterizados por diarreia, vômitos, formigamentos, coceiras, entre outros (BATISTA;

NEVES, 2009; CARVALHO, 2021).

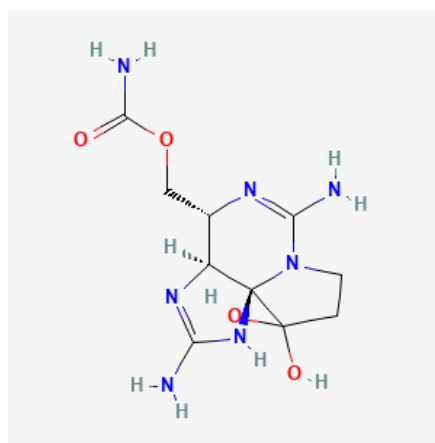
As toxinas mais comuns em frutos do mar são a saxitoxina, que causa a intoxicação paralisante, e a ciguatoxina, responsável pela intoxicação ciguatera (BARBIERI, 2009).

2.2 SAXITOXINA

As saxitoxinas (Figura 1) são um grupo de neurotoxinas produzidas por algumas espécies de dinoflagelados como *Pyrodinium Bahamense*, *Alexandrium spp.* e *Gymnodinium catenatum* (METCALF, 2009; MURK, 2019; CHRISTENSEN, 2020) e pela cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (MIOTTO, 2017). Intoxicam seres humanos através da ingestão de mexilhões contaminados (CARVALHO, 2021). Esta toxina está entre as neurotoxinas naturais conhecidas mais potentes (CHRISTENSEN, 2020) e age no organismo por meio da sua interação com os canais de sódio nas células nervosas. Ela bloqueia a passagem dos íons sódio através desses canais, afetando a transmissão dos impulsos nervosos (MURRAY, 2011; CHRISTENSEN, 2020).

Essa ação inibitória nos canais de sódio resulta na paralisia dos músculos, produzindo sintomas como sensações de formigamento, dormência, queimação e paralisia respiratória, o que pode levar à morte nos casos mais graves de intoxicação (CHRISTENSEN, 2020).

Figura 1. Estrutura da Saxitoxina.



Fonte: PubChem.

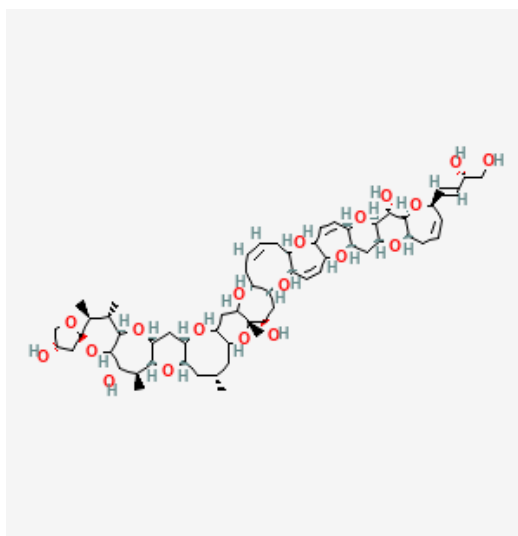
2.3 CIGUATOXINA

As ciguatoxinas (Figura 2) estão entre as toxinas marinhas mais comuns e são produzidas pelo dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus* (BATISTA; NEVES, 2009), são poliéteres cíclicos, lipossolúveis, inertes ao calor (mesmo após o cozimento), permanecem estáveis após o congelamento e exposição em condições ácidas e básicas. Acumula-se no músculo e vísceras de peixes que apresentam aparência normal, até mesmo o gosto e olfato (LEHANE; LEWIS 2000).

Foram identificados três tipos de ciguatoxina: CTX-1, CTX-2 E CTX-3, dentre estes, a CTX-1 é a forma mais potente e a mais encontrada em peixes carnívoros (OLIVEIRA, 2009). Estas toxinas são ingeridas e bioacumuladas nos peixes como barracuda, moreia, mero, peixe-cirurgião, peixe-papagaio, turbo, entre outros (BAGNIS, 1977), e quando consumidas pelo homem acabam causando a ciguatera (SWIFT, 1993).

O quadro clínico desenvolvido por esta doença inclui sintomas gastrointestinais como diarreia, náuseas, vômitos e dor abdominal. Já os neurológicos são inversão de temperatura, dormência/sensibilidade nas mãos, nos pés, na língua e na boca, tremores, prostração e dores musculares e, por fim, os cardíacos que seriam bradicardia e hipotensão (GOUVEIA, 2009). O mecanismo de ação das ciguatoxinas é complexo e ainda não é totalmente compreendido (VEIGA, 2009), porém, de acordo com estudos, alguns de seus análogos agem através do bloqueio de canais de sódio e potássio dependentes de voltagem (LOPEZ, 2011).

Figura 2. Estrutura da Ciguatoxina.



Fonte: PubChem.

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETECÇÃO DE BIOTOXINAS AQUÁTICAS

Para tornar mais seguro o consumo de mexilhões e peixes pelos seres humanos é importante a identificação da presença de biotoxinas como a saxitoxina e a ciguatoxina nestes alimentos. Atualmente, no Brasil, apesar de não existir um programa de monitoramento voltado para a detecção de dinoflagelados toxígenos (OLIVEIRA, 2009), são utilizados alguns métodos analíticos para a detecção destas biotoxinas, estes métodos podem ser divididos em biológicos e químicos. (BARBIERI, 2009).

2.4.1 Métodos Biológicos

São os mais utilizados e reconhecidos universalmente, porém são considerados analíticos, visto que não possuem especificidade e sensibilidade suficiente para diferenciar uma toxina da outra. Este método consiste na relação entre dose e tempo de morte do camundongo. É injetado intraperitonealmente 1 mL do extrato tóxico em um camundongo com peso determinado e observa-se em quanto tempo se iniciam os sintomas ou ocorre a morte (BARBIERI; OLIVEIRA, 2009). Contudo, por uma questão ética, muitas entidades estão incentivando pesquisadores a desenvolverem outros métodos alternativos à experimentação animal (MELEGARI, 2010).

2.4.2 Métodos Químicos

Estudos demonstram que os métodos químicos são simples, sensíveis e específicos. Porém seu principal problema é a reação cruzada com outros compostos e o limitado suprimento de anticorpo (OLIVEIRA, 2009). Os principais métodos desenvolvidos são cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e imunoenaios enzimáticos (ELISA) (VALE, 2004).

2.4.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC

A HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) permite detectar e quantificar com muita sensibilidade a presença de toxinas. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC - MS) é uma modalidade da HPLC onde a detecção é feita espectrofotometricamente, utilizando um comprimento de onda que varia conforme a toxina de interesse presente na amostra. (AMORIM, 1997; LANÇAS, 2004).

A HPLC – MS é considerada a abordagem mais adequada para a detecção de ciguatoxina, não apenas pela capacidade de separação dos diferentes análogos envolvidos na contaminação, mas também pela detecção sensível por meio do monitoramento de sua relação massa-carga (ESTEVEZ, 2020).

Há também a modalidade da HPLC onde a detecção é feita por fluorescência (HPLC - FL). As saxitoxinas não são moléculas naturalmente fluorescentes, mas, para que sejam analisadas por esta técnica, passam por um processo denominado derivatização, onde é introduzida na saxitoxina outra molécula com propriedade fluorescente, tornando possível sua detecção. Diversos estudos têm empregado esta técnica na identificação de saxitoxinas (LAWRENCE et al., 1995; OSHIMA et al., 2003).

2.4.2.2 Imunoensaios enzimáticos – ELISA

Os imunoensaios mais comuns são aqueles realizados no formato ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), no qual a ligação toxina-anticorpo é detectada por uma reação de anticorpo ligado a enzima e um substrato para a enzima que gera um sinal mensurável. Atualmente, existem ELISAs disponíveis para a detecção de quase todos os grupos de toxinas, incluindo ciguatoxina e saxitoxina (PÉREZ RODRÍGUEZ; VALE, 2004). A desvantagem dessa técnica é que muitas vezes a correlação entre o perfil de reatividade cruzada de um anticorpo com os diferentes análogos de um grupo de toxinas e o potencial tóxico destes compostos não é satisfatória (PÉREZ RODRÍGUEZ; VALE, 2004).

Na tabela 2 encontram-se as vantagens e desvantagens das técnicas utilizadas na detecção de biotoxinas.

Tabela 2. Vantagens e desvantagens das técnicas de detecção de biotoxinas.

Técnicas	Vantagens	Desvantagens
Testes com camundongos	Simples avaliação e baixo custo	Resultado não específico e utilização de animais em testes toxicológicos
HPLC	Alta sensibilidade, seletividade e precisão	Necessidade de padrões puros e quantificados para cada toxina, custo elevado
ELISA	Alta sensibilidade e especificidade	Resultados falsos positivos

Fonte: SILVA (2010).

2.5 NANOPORO PROTEICO

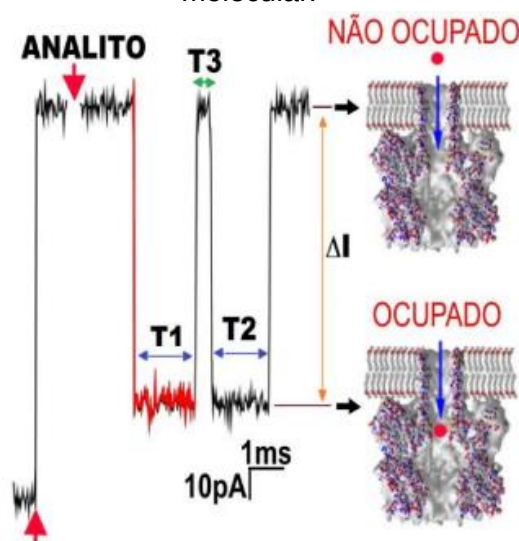
Apesar das técnicas citadas anteriormente oferecerem muitas vantagens, ainda não são ideais para uso em rotina. Sendo assim, estudos estão buscando novas alternativas para superar as deficiências apresentadas por elas e oferecer uma técnica mais eficaz na detecção dessas toxinas em alimentos (JETTANAJIT; NHUJAK, 2016).

Com o avanço da nanobiotecnologia na direção de desenvolvimento de dispositivos capazes de detectar, identificar, caracterizar e quantificar moléculas, estão sendo utilizadas nanoestruturas biológicas que possuem a capacidade de reconhecer moléculas, tornando possível a criação de uma classe inovadora de biossensores. Uma dessas nanoestruturas biológicas é o nanoporo proteico de alfa-hemolisina (AGUIAR et al., 2015).

A alfa-hemolisina é uma proteína formada de poros em membrana, secretada pela bactéria *Staphylococcus aureus*. Forma um poro transmembrana com diâmetros das entradas de 4,6 e 2,0 nm; e constrição de 1,4 nm (AGUIAR et al., 2015). Quando uma molécula passa pelo poro, ela causa uma mudança na corrente elétrica que pode ser detectada. Isso permite que o nanoporo de alfa-hemolisina seja usado para identificação de moléculas com alta precisão e sensibilidade (BAYLEY; CREMER, 2001). Este nanoporo possui estabilidade e arquitetura molecular bem elucidada, favorecendo sua aplicabilidade no biossensoriamento estocástico (AGUIAR et al., 2015).

O biossensoriamento estocástico é uma técnica que tem como base a observação da interação entre as moléculas individuais de analitos e um único nanoporo (AGUIAR et al., 2015). Este biossensoriamento denomina-se estocástico por causa da série temporal aleatória de flutuações discretas registradas, devido à detecção por um único nanoporo, de cada molécula do analito. A entrada de uma molécula no lume aquoso do nanoporo provoca um decréscimo parcial discretizado na corrente iônica que flui através do nanoporo (RODRIGUES et al., 2011); denominando-se este decréscimo de “bloqueio de corrente”. Cada bloqueio de corrente é caracterizado por uma amplitude e um intervalo de tempo (Figura 3). O conjunto de sucessivos bloqueios forma uma série temporal (“impressão digital”) correlacionada com a massa e configuração espacial da molécula do analito (RODRIGUES et al., 2011).

Figura 3. Nanoporo como ferramenta biotecnológica no reconhecimento e quantificação molecular.



Fonte: Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-tronco – Dr. Oleg Krasilnikov (2008). A corrente iônica que passa pelo nanoporo proteico, na ausência de moléculas, é máxima e estável quando um potencial é aplicado. A molécula (bolinha vermelha) chega ao lume do nanoporo por difusão e interage modulando a corrente iônica. A inserção do nanoporo é indicada pela seta (vermelha) para cima e a seta para baixo indica a adição do analito na solução banhante. O sentido do fluxo do analito no lume do nanoporo é indicado pela seta azul. T1 e T2 são os tempos de permanência da primeira e da segunda molécula do analito dentro de nanoporo. T3 é o tempo de ausência da molécula no interior do nanoporo. ΔI é a diferença entre a corrente através do nanoporo na ausência e na presença do analito dentro dele.

2.6 DOCKING MOLECULAR

Das abordagens *in silico* a simulação de docking molecular é uma das mais utilizadas devido principalmente à ampla faixa de aplicações em eventos de reconhecimento molecular, tais como interações intermoleculares, energética de ligação e mudanças conformacionais induzidas e ao baixo custo computacional. De acordo com estudos, esta técnica pode ser utilizada na análise das interações entre duas proteínas e entre uma proteína e um ácido nucleico, porém a sua principal utilização é no estudo das interações entre proteínas e ligantes (ZACHARIAS, 2010).

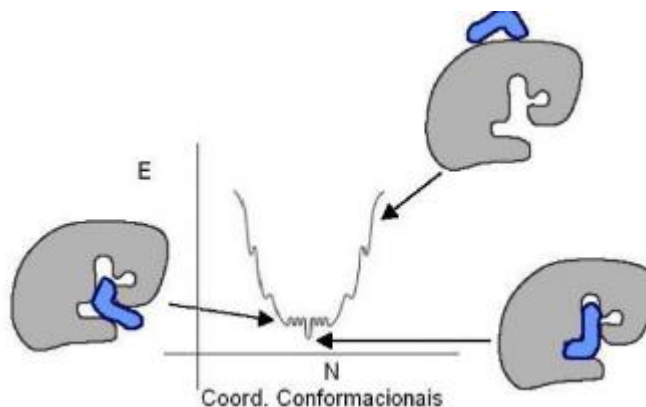
O docking molecular permite a avaliação dos modos de ligação de um ligante em um determinado ponto da macromolécula alvo, assim como também permite as correspondentes interações intermoleculares que estabilizam a formação deste complexo formado pelo ligante e macromolécula (REIS, 2008).

O processo de docking molecular pode ser classificado como um problema de

otimização de ajuste de formas moleculares, podendo ser dividido em duas partes: 1) determinar qual a conformação do ligante no sítio de interação com a macromolécula alvo; e 2) avaliar entre todas as conformações possíveis qual a melhor ranqueada, baseado na afinidade de ligação intermolecular do complexo ligante-macromolécula. Essa última etapa pode ser realizada por meio de cálculos de energia potencial, obtidos através de funções de pontuações, correspondentes às interações intermoleculares (FERREIRA et al., 2015).

Portanto, a técnica oferece as coordenadas do ligante de melhor solução (menor energia livre), como ilustrado na figura 4. O docking molecular pode ser rígido ou flexível. No caso do docking rígido, apenas os movimentos de translação e rotação do ligante são considerados. Já na abordagem flexível, além dos graus de liberdade rotacional e translacional, também são explorados os ângulos diedros do ligante, aumentando significativamente o número de soluções e o tempo computacional para realização do cálculo (FERREIRA et al., 2015).

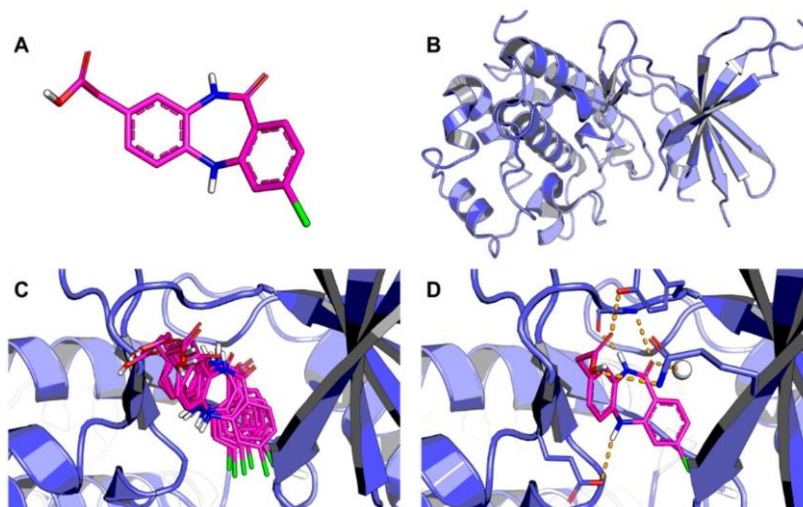
Figura 4. Gráfico da energia em função da conformação. A mínima energia representa o melhor resultado macromolécula-ligante em um caso de docking rígido.



Fonte: retirado de REIS (2008).

O passo a passo do processo de docking molecular consiste em: 1) obtenção e otimização das estruturas tridimensionais da macromolécula e do ligante; 2) submissão do ligante às funções de pontuação de acordo com a variação dos graus de liberdade previamente descritos; e 3) obtenção das melhores soluções, de acordo com o algoritmo utilizado para escolher as soluções (FERREIRA et al., 2015), como representado na figura 5.

Figura 5. Arcabouço do processo de docking.



Fonte: retirado de FERREIRA et al. (2015). (A) Estrutura tridimensional do ligante; (B) Estrutura tridimensional da macromolécula; (C) ligante é ancorado no sítio de ligação da macromolécula e as supostas conformações são exploradas; (D) as soluções de menor energia, bem como as interações intermoleculares correspondentes são identificadas. A espinha dorsal da macromolécula é representada em cartoon. O ligante (rosa) é representado em vareta. Linhas tracejadas indicam ligações de hidrogênio.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a interação de biotoxinas aquáticas com o nanoporo proteico formado pela alfa-hemolisina utilizando ferramentas *in silico*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as energias de interação da saxitoxina e ciguatoxina com o nanoporo da alfa-hemolisina via utilização de docking molecular.
- Determinar os modos de ligação da saxitoxina e ciguatoxina com o nanoporo da alfa-hemolisina via utilização de docking molecular.
- Comparar os valores de energias de interação das biotoxinas com o nanoporo da alfa-hemolisina.
- Determinar as afinidades da saxitoxina e ciguatoxina com o nanoporo da alfa-hemolisina.

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO E MINIMIZAÇÃO DA ENERGIA DAS MOLÉCULAS

As estruturas químicas dos ligantes (saxitoxina e ciguatoxina) foram obtidas através do banco de dados *PubChem*. Em seguida foi utilizado o programa Avogadro para realizar a minimização de energia das moléculas, utilizando-se o campo de força MMFF94s, com o objetivo de otimizá-las. Para isso, com as ferramentas do programa, a molécula foi desenergizada até que $dE=0$.

4.2 OBTENÇÃO E DESIDRATAÇÃO DA PROTEÍNA ALFA-HEMOLISINA

A estrutura cristalográfica do nanoporo proteico da alfa-hemolisina foi obtida no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB), por meio do código 7AHL. E para obter um melhor resultado na simulação e facilitar a análise, a proteína foi desidratada, ou seja, foram retiradas as moléculas de água da alfa-hemolisina manualmente (através do arquivo em texto). Com a proteína sem a camada de água, ela está preparada para ser submetida ao processo de docagem molecular com os analitos em estudo.

4.3 CÁLCULO DO CENTRO DE GRID

A alfa-hemolisina é uma proteína que se oligomeriza em membranas lipídicas, formando um nanoporo proteico composto por sete subunidades. Para obter a posição do centro da caixa (*grid center*), região na qual será realizada a análise de *docking*, são calculadas as médias das coordenadas x, y e z de um aminoácido de referência (Tabela 3).

Tabela 3. Média aritmética das coordenadas atômicas (x, y, z) para o aminoácido LYS-147, aminoácido tomado como referência nesse trabalho para o centro da caixa (*grid center*) na docagem molecular. Esses cálculos baseiam-se na obtenção da média da posição do carbono alfa (CA) do aminoácido de referência a partir da posição do aminoácido em cada uma das 7 subunidades monoméricas que compõem o nanoporo.

Coordenadas Atômicas			
Monômero	X	Y	Z
1	37,636	20,952	33,094
2	31,464	27,114	39,036
3	31,179	37,847	39,287
4	36,945	44,619	33,636
5	44,333	42,483	26,409
6	47,897	33,332	22,716
7	44,862	23,624	25,826
Média	39,188	32,853	31,429

Fonte: autoria própria (2023).

4.4 DOCKING MOLECULAR

4.4.1 Docking Molecular com o Software *DockThor*

Para a primeira rodada de testes de docagem molecular, foi utilizada a plataforma Dockthor segundo o procedimento abaixo:

1. Realizou-se o upload do arquivo da proteína, nesse caso o nanoporo proteico da alfa-hemolisina (NPA) de *Staphylococcus aureus*, e o arquivo foi enviado como solicitado pela plataforma.
2. Como não havia cofator, foi selecionada a opção respectiva.
3. Adicionou-se o arquivo referente ao ligante (saxitoxina ou ciguatoxina), selecionando a opção “adicionar H”, para serem adicionados os átomos de hidrogênio necessários. Em seguida, o arquivo foi enviado como solicitado pela plataforma.
4. Ajustou-se os valores de centro da caixa e suas dimensões.
5. Foi selecionada a opção “Dock” para realizar a simulação.
6. Todo o procedimento citado acima foi realizado três vezes para cada ligante.

4.4.2 Docking Molecular com o Software *GOLD*

Na segunda etapa de testes de docagem molecular, foi utilizada a plataforma *GOLD* (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) segundo o procedimento abaixo:

1. Selecionou-se as opções *Gold* e *Wizard*, em sequência.
2. Realizou-se o *upload* do arquivo da proteína, nesse caso o NPA de *Staphylococcus aureus*.
3. Adicionou-se os hidrogênios necessários na aba “*Protein Setup*”. Na mesma aba, existe a opção de remover água ou algum cofator indesejado (essa opção não foi utilizada já que não houve necessidade).
4. Ajustou-se os valores de centro de caixa e suas dimensões.
5. Adicionou-se o arquivo referente ao ligante (saxitoxina ou ciguatoxina).
6. Definiu-se a função de *score* avaliada na docagem molecular. Nesse cenário, foi escolhida a *GOLDScore*.
7. Foi selecionada a opção “*Run GOLD*” para realizar a simulação.
8. Todo o procedimento citado acima foi realizado três vezes para cada ligante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a análise dos resultados, foi utilizado o *software Discovery Studio Visualizer*, uma ferramenta capaz de avaliar os tipos de ligações envolvidas na interação macromolécula-ligante.

5.1 ANÁLISE DE DOCKING MOLECULAR COM O SOFTWARE DOCKTHOR

O DockThor utiliza de campo de força para simular as conformações possíveis entre a proteína e o ligante estudado. As médias calculadas do centro de caixa servem para indicar à plataforma qual o local exato onde deve haver a análise da interação dos ligantes com a proteína. Este *software* testa diversas conformações diferentes e disponibiliza os resultados em forma de *score*, colocando em ordem as melhores rodadas de acordo com os valores das energias. A energia total (kcal/mol) define o ranking, ou seja, quanto maior a energia total do sistema, menor a interação das ligações desse complexo, portanto a melhor conformação do ranking será a com menor energia total, que é a mais provável de acontecer experimentalmente, pois a reação vai optar pelo menor gasto de energia possível.

5.1.1 Saxitoxina

Dessa forma, no docking molecular da alfa-hemolisina com o ligante saxitoxina, realizado através do *software* DockThor, a rodada número 8 apresentou menor energia total em todas as três submissões realizadas, sendo a melhor rodada apresentada no ranking como mostra a tabela 4.

Tabela 4. Score do DockThor das melhores rodadas do ligante saxitoxina com a proteína alfa-hemolisina.

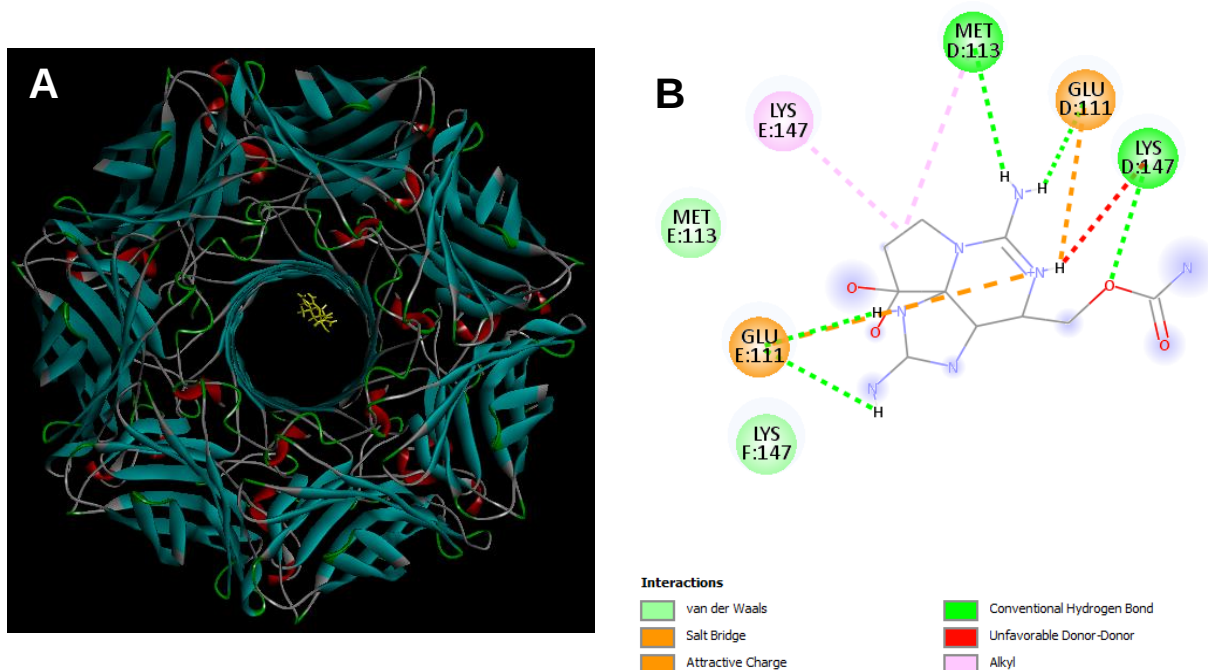
Score	Energia de Afinidade (kcal/mol)	Energia Total (kcal/mol)
Rodada 8	- 6,312	- 94,565

Fonte: autoria própria (2023).

No programa *Discovery Studio* é possível visualizar o complexo da proteína com o ligante e analisá-lo. Para isso, abrimos a visualização da proteína que foi submetida ao docking (alfa-hemolisina) e depois do ligante (saxitoxina) em sua melhor

conformação do ranking, para visualizá-los juntos no complexo (Figura 6A) e obter o diagrama 2D com as ligações intermoleculares envolvidas na interação do complexo (Figura 6B).

Figura 6. Complexo formado pela saxitoxina com o nanoporo proteico obtido no DockThor.



Fonte: autoria própria (2023). (A) Disposição espacial da saxitonina na região de constricção do nanoporo proteico. (B) Diagrama 2D das interações intermoleculares envolvidas no complexo saxitoxina-nanoporo.

5.1.2 Ciguatoxina

Já no docking molecular da alfa-hemolisina com o ligante ciguatoxina, realizado através do *software* DockThor, os primeiros lugares do ranking de cada uma das três submissões foram as rodadas de número 11, 22 e 11. Estas apresentaram menor energia total em relação às outras rodadas, sendo consideradas as melhores, como mostra a tabela 5.

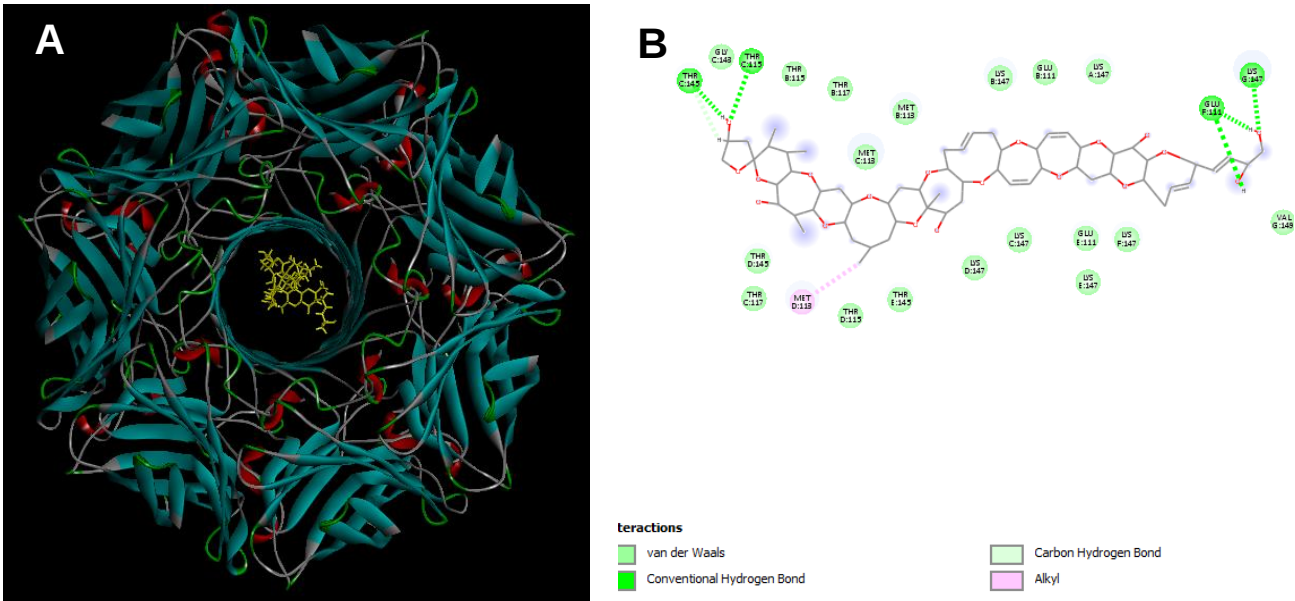
Tabela 5. Score do DockThor das melhores rodadas de cada uma das três submissões do ligante ciguatoxina com a proteína alfa-hemolisina.

Score	Energia de Afinidade (kcal/mol)	Energia Total (kcal/mol)
Rodada 11	- 8,441	186,340
Rodada 22	- 8,616	183,567
Rodada 11	- 7,855	187,719
Média ± DP	- 8,304 ± 0,3985	185,875 ± 2,1146

Fonte: autoria própria (2023). Dados em triplicata, expressos como média ± desvio padrão.

No programa *Discovery Studio* foram obtidas as imagens do complexo da proteína com o ligante (Figura 7A) e do diagrama 2D com as ligações intermoleculares envolvidas na interação do complexo (Figura 7B).

Figura 7. Complexo formado pela ciguatoxina com o nanoporo proteico obtido no DockThor.



Fonte: autoria própria (2023). (A) Disposição espacial da ciguatoxina na região de constricção do nanoporo proteico. (B) Diagrama 2D das interações intermoleculares envolvidas no complexo ciguatoxina-nanoporo.

5.2 ANÁLISE DO DOCKING MOLECULAR COM O SOFTWARE GOLD

O GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*), é um algoritmo genético para encaixar ligantes flexíveis em sítios de ligação de proteínas.

5.2.1 Saxitoxina

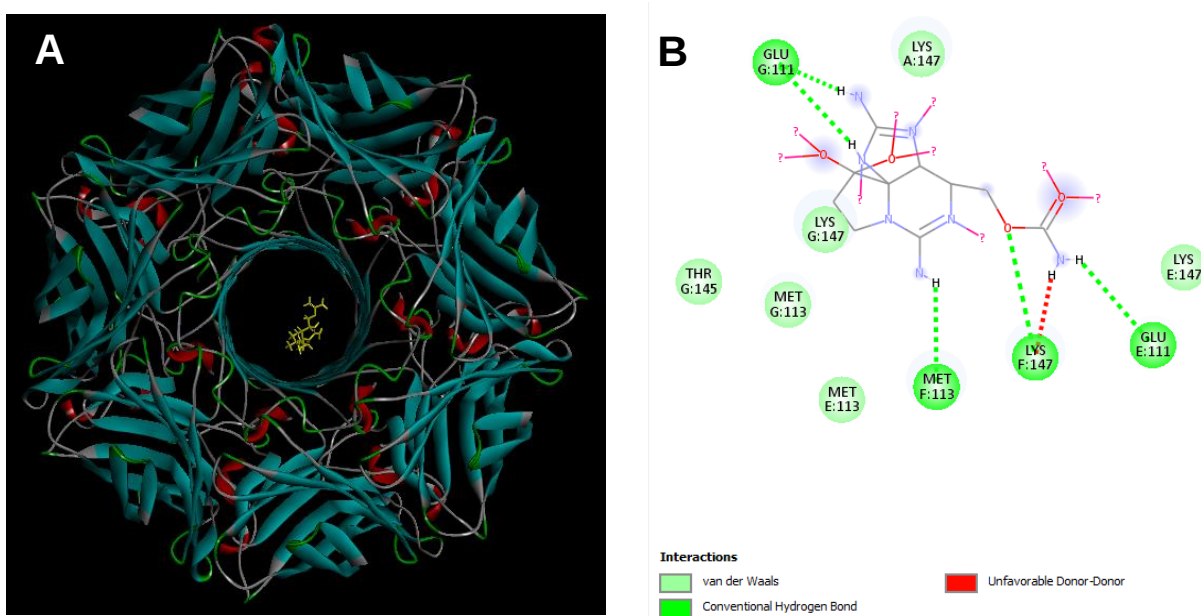
Na tabela 6 e figura 8 estão os resultados obtidos com esta plataforma para o ligante saxitoxina.

Tabela 6. Resultados de *fitness* para cada uma das melhores rodadas das três submissões do ligante saxitoxina com a proteína alfa-hemolisina no *software* GOLD.

Rodada	GoldScore Fitness
9	41,5651
1	40,7012
7	41,8800
Média ± DP	41,3821 ± 0,6103

Fonte: autoria própria (2023). Dados em triplicata, expressos como média ± desvio padrão.

Figura 8. Complexo formado pela saxitoxina com o nanoporo proteico obtido no GOLD.



Fonte: autoria própria (2023). (A) Disposição espacial da saxitoxina na região de constricção do nanoporo proteico. (B) Diagrama 2D das interações intermoleculares envolvidas no complexo saxitoxina-nanoporo.

5.2.2 Ciguatoxina

Na tabela 7 estão os resultados de *fitness* obtidos com esta plataforma para o ligante ciguatoxina.

Tabela 7. Resultados de *fitness* para cada uma das melhores rodadas das três submissões do ligante ciguatoxina com a proteína alfa-hemolisina no *software* GOLD.

Rodada	GoldScore Fitness
10	45,9269
3	52,1650
3	55,5767
Média ± DP	51.22287 ± 4.8934

Fonte: autoria própria (2023). Dados em triplicata, expressos como média ± desvio padrão.

Não foi possível a obtenção do diagrama 2D de interações intermoleculares do complexo formado pela ciguatoxina com o nanoporo proteico de alfa-hemolisina realizado pelo *software* GOLD. O programa Discovery Studio não suportou o tamanho do ligante.

Analisando os dados de docking molecular obtidos no DockThor e GOLD, os ligantes saxitoxina e ciguatoxina interagiram com o nanoporo de alfa-hemolisina e formaram, em sua maioria, ligações de hidrogênio, Van der Waals e alquila (Figuras 6B, 7B e 8B). Desta forma, demonstraram haver potencial de bloqueio, ainda assim alguns aspectos devem ser levados em consideração.

O DockThor elabora um ranking das melhores conformações de um mesmo ligante de acordo com a sua energia total, quanto menor a energia total, melhor a rodada do ligante selecionado. Como visto na tabela 4, a melhor rodada selecionada para o ligante saxitoxina foi a de número 8 nas três submissões realizadas, significando que a energia total dela foi a menor em comparação com as outras rodadas. Esta rodada também apresenta ligações desfavoráveis doador-doador, porém pela presença de ligações fortes como alquila e ligações de hidrogênio, supõe-se que as ligações desfavoráveis não são tão relevantes nesse sistema. Já para o ligante ciguatoxina, o DockThor selecionou três diferentes melhores rodadas nas três submissões realizadas, sendo elas as de número 11, 22 e 11 (tabela 5), que também foram a de menor energia total em comparação com as demais rodadas das suas respectivas submissões.

Porém, comparando a energia total obtida pela saxitoxina (- 94,565 kcal/mol) com as obtidas pela ciguatoxina (185,875 ± 2,1146 kcal/mol) fica evidente que, pela saxitoxina apresentar um valor bem menor, experimentalmente, pode haver uma maior facilidade de interação entre ela e o nanoporo proteico, em comparação com a

ciguatoxina.

Além disso, as interações moleculares são importantes parâmetros para prever o nível de atração ou repulsão entre moléculas (ROCHA, 2001) e, de todas as interações não covalentes direcionadas entre biomoléculas, as ligações de hidrogênio são consideradas as mais importantes (CHEN et al., 2016). Tais ligações são vistas como um forte parâmetro de afinidade de ligação do complexo receptor-ligante e são as mais fortes entre as interações intermoleculares. Sendo assim, quanto mais ligações de hidrogênio entre o ligante e o nanoporo de alfa-hemolisina, maior o indício da formação de um complexo estável. Ambas as biotoxinas apresentaram 5 ligações de hidrogênio (Figuras 7B e 8B).

Em relação ao docking molecular realizado no software GOLD, os valores de pontuação *fitness* de cada uma das melhores rodadas das três submissões realizadas obtidos para a saxitoxina são demonstrados na tabela 6 (com valores de média $\pm$ desvio padrão). Estes valores são números adimensionais e quanto maior forem, indicam que melhor será a interação ligante-proteína (FERREIRA, 2016). Dentre as três rodadas avaliadas, a número 1, apesar de ser a com menor valor de *fitness*, foi considerada a mais favorável devido às suas cinco ligações de hidrogênio. Esta rodada também apresenta ligações desfavoráveis doador-doador, porém pela presença das ligações de hidrogênio, supõe-se que as ligações desfavoráveis não são tão relevantes neste sistema.

6 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que avaliando os valores de energia de afinidade, energia total e o número de ligações de hidrogênio, espera-se que, em termos experimentais, a interação NPA-saxitoxina seja mais forte que a interação NPA-ciguatoxina.

A interação do ligante saxitoxina com o nanoporo de alfa-hemolisina demonstrada pelo *software* DockThor apresentou importantes interações intermoleculares como as de hidrogênio, alquila e Van der Waals e uma baixa energia total necessária para a formação do complexo ligante-macromolécula. Na interação do ligante saxitoxina com o NPA demonstrada pelo *software* GOLD também foi possível notar a grande quantidade de ligações de hidrogênio, corroborando com a sugestão de que a saxitoxina seja capaz de formar um complexo estável com o NPA.

Em relação à ciguatoxina, foi obtida uma significativa quantidade de ligações de hidrogênio com o nanoporo de alfa-hemolisina, também surgiram ligações alquila, Van der Waals e ligação carbono-hidrogênio, porém a energia total apresentada é alta em relação à apresentada pela saxitoxina, tornando a ciguatoxina um ligante menos favorável.

Por fim, são necessários estudos envolvendo a dinâmica molecular, que sejam capazes de considerar a flexibilidade de receptores e ligantes e a cinética das reações, além de mais estudos comparativos e experimentais a fim de aprofundarem estes resultados preditivos. Desta maneira, o nanoporo de alfa-hemolisina e os estudos computacionais podem ser grandes aliados, auxiliando na prospecção de novos biossensores.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. P. et al. Stochastic biosensing by a single proteic nanopore in the development of analytical tools. **Química Nova**, v. 38, p. 817-827, 2015.
- AMORIM, A. M. G. Acumulação e depuração de microcistinas por *Mytilus Galloprovincialis* Lamarck. Porto, Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Portugal, 56p.,1997.
- BAGNIS, R.; THEVENIN, S.; GARCON, M. A survey of comparative toxicity in the food chain of ciguatera. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 43, n. 8, p. 1015-1019, 1977.
- BARBIERI, E. O perigo das biotoxinas marinhas. **São Paulo: Instituto de Pesca**, 2009.
- BATISTA, W. R.; NEVES, M. H. B. B. Biotoxinas Marinhas. **A Ressurgência (Niterói)**, v. 3, p. 36-39, 2009
- CARVALHO, G. et al. Aspectos relevantes sobre as intoxicações pelo consumo de pescado. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Espírito Santo**, v. 4, p. 118, 2021.
- CHEN, D. et al. Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. **Science Advances**, v. 2, n. 3, p. e1501240, 2016.
- CHRISTENSEN, V. G.; KHAN, E. Neurotoxinas de água doce e preocupações com a saúde humana, animal e do ecossistema: uma revisão da anatoxina-a e da saxitoxina. **Ciência do Meio Ambiente Total**, v. 736, p. 139515, 2020.
- COSTA, A. I. et al. Intoxicação alimentar por ciguatera. **Medicina Interna**, v. 24, p. 30-32, 2017.
- DIAZ, J. H. Global incidence of rhabdomyolysis after cooked seafood consumption (Haff disease). **Clinical Toxicology**, v. 53, p. 421–426, 2015.
- DOLINSKY, T. J. et al. PDB2PQR: Expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. W522- W525, 2007.
- EMBRAPA. **Centro de Inteligência e Mercado em Aquicultura**. Produção brasileira: espécies. Disponível em:<<https://www.embrapa.br/cim-centro-de-inteligencia-e-mercado-em-aquicultura/producao-brasileira/especies>> Acesso 05 maio 2021.
- ESTEVEZ, P. et al. Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry for the confirmation of Caribbean ciguatoxin-1 as the main toxin responsible for ciguatera poisoning caused by fish from European Atlantic coasts. **Toxins**, v. 12, n. 4, p. 267, 2020.

FERREIRA, L. G. et al. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, p. 13384-13421, 2015.

FERREIRA, F. B. Planejamento baseado na estrutura da metaloprotease BPMP-I e avaliação de tiossemicarbazonas ativas contra a peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2016.

GOUVEIA, N. et al. Primeiro registo da ocorrência de episódios do tipo ciguatérico no arquipélago da Madeira. **Abstract Book of the X Reuniao Oberica, Fitoplancton Toxico e Biotoxinas**, 2009.

LAMM, G. A equação de Poisson-Boltzmann. **Comentários em Química Computacional**, v. 19, p. 147-365, 2003.

LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE). São Carlos: Rima, 2004. 96p.

LAWRENCE, J. F.; MÉNARD, C.; CLEROUX, C. Evaluation of prechromatographic oxidation for liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish. **Journal of AOAC International**, v.78, n.2, p.514-520, 1995

LEHANE, L.; LEWIS, R. J. Review ciguatera: recent advances but the risk remains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 91-125, 2000.

LIEBESCHUETZ, J. W.; COLE, J. C.; KORB, O. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v, 26, p. 737–748, 2012.

LOPEZ, S. P. **Estudo eletrofisiológico do efeito de ficotoxinas marinhas em células granulares cerebelares**. 2011. Tese de doutorado. Universidade de Santiago de Compostela.

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

MELEGARI, S. P. et al. Estudo do mecanismo de ação tóxica da saxitoxina e avaliação de sua adsorção em materiais alternativos para aplicação em sistemas de tratamento de água. 2010.

MELO, M. C. A. et al. Inhibition of the hemolytic activity caused by *Staphylococcus aureus* alpha hemolysin through isatin-Schiff copper(II) complexes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, p. 1-5, 2016.

METCALF, J. S.; CODD, G. A. Cyanobacteria, neurotoxins and water resources: are there implications for human neurodegenerative disease?. **Amyotrophic Lateral Sclerosis**, v. 10, n. sup2, p. 74-78, 2009.

MIOTTO, M. C. et al. Caracterização ecofisiológica e molecular de duas cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii*, produtoras de saxitoxina, isoladas da Lagoa do Peri, Florianópolis, SC. 2017.

MORRIS, et al. Auto-Dock 4 and AutoDockTools 4: automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, p. 2785–91, 2009.

MOURA, J. F. et al. A interface da saúde pública com a saúde dos oceanos: produção de doenças, impactos socioeconômicos e relações benéficas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, p. 3469-3480, 2011.

MURK, A. J. et al. Biotoxinas marinhas: Tipos de envenenamento, mecanismos subjacentes de ação e programas de gerenciamento de risco. In: **Perigos químicos em alimentos de origem animal**. Wageningen Academic Publishers, 2019. p. 398-402.

MURRAY, S. A.; MIHALI, T. K.; NEILAN, B. A. Extraordinary conservation, gene loss, and positive selection in the evolution of an ancient neurotoxin. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 3, p. 1173-1182, 2011.

NELSON, W. E.; Textbook of pediatrics, **Saunders**, 20a edição. 2016.

NEVES, M. C. M. Levantamento de dados oriundos do DATASUS relativos à ocorrências/surtos de intoxicação alimentar no Brasil de 2007-2014. Monografia (Graduação) – UFPB/CCS, 2015.

OLIVEIRA, G. M. de et al. Presença de dinoflagelados bentônicos potencialmente tóxicos: identificação do perigo em áreas destinadas à maricultura na Baía de Sepetiba, RJ. 2009.

OSHIMA, Y.; LUKAS, B.; HUMMERT, C. Analytical methods for paralytic shellfish poisons. In: HALLEGRAEFF, G.M.; ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, A.D. (Eds.), Manual on harmful marine microalgae, Intergovernmental oceanographic commission manuals and guides, Paris, France – UNESCO, p.191-209, 2003.

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

PÉREZ RODRÍGUEZ, Laura María. Desarrollo de métodos bioquímicos para la detección de ficotoxinas.

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

REIS, E. C. Docking e análise do modo de ligação de três moléculas pequenas, um benzimidazol e dois compostos de crômio, nos sulcos do dna 5'- cgccaattcgcg-3'. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. São Paulo, São Paulo, 2008.

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

ROCHA W. Interações intermoleculares. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 4, 2001.

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

SCHRAMM, M. A. et al. Toxinas paralisantes em mexilhão *Perna perna* em áreas de cultivo da costa sul do Brasil: estudo de caso. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 17, n. 4, p. 443-450, 2009.

SILVA, Caroline Souza Pamplona da. **Caracterização molecular de cianobactérias isoladas de ecossistema manguezal do Estado de São Paulo e identificação de produtos naturais**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

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

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

SUZUKI, T. et al. LC-MS/MS analysis of palytoxin analogues in blue humphead parrotfish *Scarus ovifrons* causing human poisoning in Japan. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, n. 8, p. 1358-1364, 2013.

SWIFT, A. E. B.; SWIFT, T. R. Ciguatera. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 31, n. 1, p. 1-29, 1993.

TEIXEIRA, S. F. et al. Relato da Síndrome de Haff em Pernambuco e seu impacto socioeconômico. **Ciências da Saúde: desafios e potencialidades em pesquisa**, v.1, p. 375-384, 2022.

VALE, P. Biotoxinas marinhas-Marine biotoxins. **Revista Portuguesa de Medicina Veterinária**, v. 99, n. 549, p. 03-18, 2004.

VEIGA, A. et al. Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal. **Autoridade de Segurança Alimentar e Económica**, v. 1, p. 10-273, 2009.

VERDONK, M. L. et al. Improved protein–ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 52, n. 4, p. 609-623, 2003.

WELLOCK, C., ROSS, B. J. An Examination of Lamarckian Genetic Algorithm. Proceedings of Late Breaking Papers. **Genetic and Evolutionary Computation Conference (GECCO)**, p. 474-481, 2001.

ZACHARIAS M. Protein-Protein Complexes: Analysis, Modeling and Drug Design. London, Imperial College Press. 2010.