

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

ARTUR ALVES RODRIGUES DA SILVA

**NANOSSENSOR ESTOCÁSTICO PARA DETECÇÃO DE COMPOSTOS
ORGANOESTÂNICOS: ESTUDO EXPERIMENTAL E TEÓRICO-
COMPUTACIONAL**

Recife - PE

2017

ARTUR ALVES RODRIGUES DA SILVA

**NANOSSENSOR ESTOCÁSTICO PARA DETECÇÃO DE COMPOSTOS
ORGANOESTÂNICOS: ESTUDO EXPERIMENTAL E TEÓRICO-
COMPUTACIONAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito para a obtenção
do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Gabriel
Rodrigues

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Dijanah Cota
Machado

Recife - PE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Artur Alves Rodrigues da

Nanossensor estocástico para detecção de compostos organoestânicos: estudo experimental e teórico-computacional/ Artur Alves Rodrigues da Silva- 2017.

56 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Cláudio Gabriel Rodrigues

Coorientadora: Dijanah Cota Machado

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2017.

Inclui referências e anexo

1. Nanotecnologia 2. Organoestânicos 3. Toxinas I. Rodrigues, Cláudio Gabriel (orient.) II. Machado, Dijanah Cota (coorient.) III. Título

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-267

ARTUR ALVES RODRIGUES DA SILVA

**NANOSSENSOR ESTOCÁSTICO PARA DETECÇÃO DE COMPOSTOS
ORGANOESTÂNICOS: ESTUDO EXPERIMENTAL E TEÓRICO-
COMPUTACIONAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovado em: 09/08/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues

Instituição: Depto. de Biofísica e Radiobiologia da UFPE

Prof. Dr. Janilson José da Silva Júnior

Instituição: Centro Universitário Brasileiro- UNIBRA

Prof^a. Dr^a. Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes

Instituição: Depto. de Biofísica e Radiobiologia da UFPE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Elisângela Alves e ao meu pai Roberto Pires, bem como a todos os meus familiares, que sempre me incentivaram e apoiaram ao longo desses anos. Amo todos vocês!

AGRADECIMENTOS

Grato a Deus por me conceder viver todos esses momentos.

Em especial, a minha dupla de orientadores, professor Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues e professora Dr^a. Dijanah Cota Machado. Tenho muita gratidão por todos os ensinamentos e por contribuírem na minha formação acadêmica.

A todos os membros da minha família pelo apoio e carinho nos momentos difíceis, em especial, minha mãe Elisângela Alves e pai Roberto Pires, meus avós, Eliezer Gomes e Maria de Fátima, meus tios, Etienne Alves e Edjazon Alves e minha querida irmã Alice Alves.

Também quero agradecer aos membros do Laboratório de Biofísica de Membranas e Células-Tronco – Dr. Oleg Krasilnikov (LBM-CT): Juliana Pereira, Janilson José, Wyndly Daniel, Lícyá Samara, Túlio Queiroga, Professora Dr^a. Márcia Bezerra e professor Dr. Reginaldo Pereira. Agradeço em especial a Laércio Pol Fachin, apesar de não ser membro oficial do LBM-CT, teve grande contribuição com dicas e sugestões ao trabalho.

Aos meus queridos amigos, Jeann Fabiann, Thuanny Maryna, Adson Belém, Deborah Fortes e todos os membros da Zona Norte Caruaru. Cada momento especial passado ao lado de vocês ajudou bastante nesses dois anos.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT) da Universidade Federal de Pernambuco, Maira Galdino da Rocha Pitta, pelo contínuo apoio e a Paulo Germano, secretário do PPGIT, pela atenção, paciência, e disponibilidade para resolver questões burocráticas.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo aporte financeiro.

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

Muito obrigado!

RESUMO

Os compostos organoestânicos (OTs) são caracterizados pela presença de uma ou mais ligações entre estanho e carbono. A produção e a utilização de produtos industriais, contendo OTs, geram grande preocupação mundial por oferecerem risco ao meio ambiente e à saúde humana. A aplicação de produtos à base de OTs abrange comumente a produção de biocidas, utilizados na agricultura e anti-incrustante naval; e na indústria de fabricação do cloreto de polivinila. A liberação do hidróxido de triciclohexilestanho (Cyhexatin) e Dicloreto difenilestanho (DPhT) em níveis elevados no meio ambiente está relacionada a graves problemas toxicológicos, pois, eles atuam como disruptores endócrinos. A cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alto desempenho têm uso limitado na identificação de OTs no meio ambiente, devido principalmente ao alto custo operacional e muitas etapas de pré-processamento da amostra. Nesse contexto, foi proposto o uso do nanoporo individual formado pela alfatoxina de *Staphylococcus aureus* (α HL) como plataforma alternativa para detecção e diferenciação dos organoestânicos (Cyhexatin e DPhT). Análises *in silico*, por meio do método de ancoramento molecular, também foram realizadas para esclarecer o mecanismo de interação OTs-nanoporo da α HL. As bicamadas lipídicas planas livres de solvente foram confeccionadas com o lipídeo diftanoil fosfatidilcolina conforme as técnicas convencionais de construção de membranas artificiais. Os experimentos foram realizados em condições de fixação de voltagem (± 200 mV, $\Delta = 20$ mV), com solução banhante composta por KCl 4 M, Tris 5 mM, pH 7,5 e temperatura de 25 °C. A análise dos dados experimentais mostrou que tanto o DPhT quanto o CyHexatin induziram alterações na condutância do nanoporo de maneira dose-dependente, reduzindo-a em aproximadamente 20% e 10%, respectivamente, quando aplicadas voltagens acima de 140 mV. A passagem das moléculas de DPhT e o CyHexatin pelo lúmen do nanoporo induziram três perfis característicos de redução na corrente iônica do nanoporo distintos entre si, permitindo a identificação dos compostos. Os valores dos tempos característicos de ausência (τ_{on}) e permanência (τ_{off}) para cada composto foram diferentes e dependentes do potencial transmembrana aplicado. Para o DPhT e o Cyhexatin foram identificados três valores de τ_{off} (curto, médio e longo), apresentando correlação com os três perfis de corrente iônica. Observou-se ainda que os limites de detecção de ambos os OTs, pelo nanoporo-sensor, foram da ordem de nanomolar. Os dados computacionais sugerem até três confôrmeros para o DPhT e dois para o Cyhexatin na região de constrição do nanoporo, predominando interações cátion-Pi (DPhT) e ligações de

hidrogênio (Cyhexatin). O nanoporo da α HL foi capaz de detectar organotins, podendo ser utilizado como método alternativo para detecção destes disruptores endócrinos em tempo real no meio ambiente.

Palavras-chave: Organoestânicos. Alfatoxina. Nanoporo. Nanossensor estocástico.

ABSTRACT

Organotin compounds (OTs) are characterized by the presence of one or more bonds between tin and carbon. The production and use of industrial products, containing OTs, generate great worldwide concern for representing a risk to the environment and to human health. The application of OT-based products commonly covers the production of biocides, used in agriculture and naval anti-fouling; and in the polyvinyl chloride manufacturing industry. The release of tricyclohexyltin hydroxide (Cyhexatin) and diphenyltin dichloride (DPhT) at high levels in the environment is related to serious toxicological problems, as they act as endocrine disruptors. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography have limited use in identifying OTs in the environment, mainly due to the high operational cost and many steps of pre-processing of the sample. In this context, it was proposed the use of the single nanopore formed by *Staphylococcus aureus* alfatoxin (α HL) as an alternative platform for the detection and differentiation of organotin (Cyhexatin and DPhT). *In silico* analyzes, using the molecular anchoring method, were also performed to clarify the OTs-nanopore interaction mechanism. The solvent-free planar lipid bilayers were made with the diphytanoyl phosphatidylcholine lipid according to conventional techniques for the construction of artificial membranes. The experiments were performed under voltage clamp conditions (± 200 mV, $\Delta = 20$ mV), with bathing solution composed of 4 M KCl, 5 mM Tris, pH 7.5 and temperature of 25 °C. Analysis of the experimental data showed that both DPhT and CyHexatin induced changes in the conductance of the nanopore in a dose-dependent manner, reducing it by approximately 20% and 10%, respectively, when applied voltages above 140 mV. The passage of the DPhT and CyHexatin molecules by the lumen of the nanopore induced three characteristic profiles of reduction in the ionic current of the nanopore distinct from each other, allowing the identification of the compounds. The values of the characteristic times of absence (τ_{on}) and permanence (τ_{off}) for each compound were different and dependent on the transmembrane potential applied. For DPhT and Cyhexatin, three values of τ_{off} (short, medium and long) were identified, showing correlation with the three ion current profiles. It was also observed that the detection limits of both OTs, by the nanopore-sensor, were at the nanomolar level. The computational data suggest up to three conformers for DPhT and two for Cyhexatin in the nanopore constriction region, with cation- π interactions (DPhT) and hydrogen bonding (Cyhexatin) predominating. The nanopore of α HL was able to detect

organotins and can be used as an alternative method to detect these endocrine disruptors in real time in the environment.

Keywords: Organotin compounds. Alfatoxin. Nanopore. Stochastic nanosensor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA 2D DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS OTS.....	21
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DAS PRINCIPAIS APLICAÇÕES DOS COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS.....	22
FIGURA 3 - PROCESSO DE INCRUSTAÇÃO E APLICAÇÃO DE TINTA ANTI-INCRUSTRANTE.....	23
FIGURA 4 - ESQUEMA DE REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA AROMATASE CYP19.....	26
FIGURA 5 - CONFIGURAÇÃO GERAL DAS ETAPAS E COMPONENTES DE UM BIOSSENSOR.....	29
FIGURA 6 - MODELO DO NANOPORO PROTEICO FORMADO PELA ALFATOXINA.....	31
FIGURA 7 - ESQUEMA DO PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO BIOSSENSOR UTILIZANDO O NANOPORO DA ALFATOXINA.....	32
FIGURA 8 - ANCORAMENTO OU “DOCKING” MOLECULAR.....	33
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONSTRUÇÃO DA BICAMADA LIPÍDICA.....	36
FIGURA 10 - ESQUEMA DE DETECÇÃO PELA ALFATOXINA NA PRESENÇA DOS DIFERENTES COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS.....	37
FIGURA 11 - SISTEMA DE AQUISIÇÃO ELETRÔNICA.....	38
FIGURA 12 - ESQUEMA DA REAÇÃO DE EQUILÍBRIO ENTRE O ANALITO E O NANOPORO.....	39

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

α -HL	- Alfa-hemolisina (do inglês <i>alpha-hemolysin</i>)
AAS	- Espectrometria de absorção atômica (do inglês: <i>atomic absorption spectrometry</i>)
ABRASCO	- Associação Brasileira de Saúde Coletiva
AED	- Detecção por emissão atômica (do inglês: <i>atomic emission detection</i>)
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DBT	- Dibutilestanho (do inglês: <i>dibutyltin</i>)
DDE	- Dicloreto difenilestanho
DNA	- Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPhT	- Difenilestanho (do inglês: <i>diphenyltin</i>)
FPD	- Detecção fotométrica de chama (do inglês: <i>photometric detector</i>)
CG	- Cromatografia gasosa
GLU	- Ácido glutâmico
GR	- Receptores de glicocorticoides (do inglês: <i>glucocorticoid receptor</i>)
HPLC	- Cromatografia líquida de alto desempenho (do inglês: <i>high performance liquid chromatography</i>)
IUPAC	- União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês: <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LYS	- Lisina
MBT	- Monobutilestanho (do inglês: <i>monobutyltin</i>)
MET	- Metionina
MS	- Espectrometria de massa (do inglês: <i>mass spectrometry</i>)
OTs	- Organoestânicos (do inglês: <i>organotins</i>)
PDB	- Banco de Dados de Proteínas (do inglês: <i>Protein Data Bank</i>)
PVC	- Policloreto de polivinila (do inglês: <i>polyvinyl chloride</i>)
RMSD	- Desvio médio quadrático (do inglês: <i>root mean square deviation</i>)
T3	- Triiodotironina
TBT	- Tributilestanho (do inglês: <i>tributyltin</i>)
TPhT	- Trifenilestanho (do inglês: <i>triphenyltin</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	- Angström
Ag	- Prata
AgCl	- Cloreto de prata
C	- Concentração
°C	- Grau Celsius
Cl ⁻	- Cloreto
COO	- Éster
F ⁻	- Fluoreto
HCl	- Ácido clorídrico
KCl	- Cloreto de potássio
kDa	- quilodalton
K _f	- Constante de formação
K _{off}	- Constante de dissociação
K _{on}	- Constante de associação
μM	- micromolar
ms	- milissegundo
mV	- milivolt
O	- Oxigênio
OH ⁻	- Hidroxila
S	- Enxofre
pA	- picoampere
pH	- Potencial hidrogeniônico
T	- Temperatura
®	- Marca registrada
τ	- tau
τ _{off}	- Tempo de permanência

τ_{on}	- Tempo de ausência (tempo entre os bloqueios)
ΔG_{lig}	- Energia livre de Gibbs
ΔH	- Variação de entalpia
ΔS	- Variação de entropia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Objetivo Geral.....	17
1.1.2	Objetivos Específicos.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	18
2.2	COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS.....	19
2.2.1	Histórico.....	19
2.2.2	Propriedades Químicas.....	20
2.2.3	Aplicações Comerciais dos Compostos Organoestânicos.....	21
2.2.4	Toxicidade dos compostos Organoestânicos.....	25
2.2.5	Métodos de Análise e Detecção.....	27
2.3	NANOPORO DA ALFATOXINA COMO BIOSSENSOR ESTOCÁSTICO....	28
2.3.1	Aspectos Gerais.....	28
2.3.2	Alfatoxina.....	30
2.4	ANCORAMENTO MOLECULAR.....	32
2.4.1	Interações Intermoleculares Envolvidas no Complexo ligante-receptor.....	34
3	METODOLOGIA	36
3.1	CONSTRUÇÃO DAS BICAMADAS LIPÍDICAS PLANAS.....	36
3.2	SISTEMA DE MONITORAMENTO E AQUISIÇÃO EM TEMPO REAL.....	38
3.3	ANÁLISE DE FLUTUAÇÕES DAS CORRENTES IÔNICAS.....	39
3.4	DOCAGEM ENTRE OS COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS E A ALFATOXINA.....	40
3.4.1	Programas utilizados no presente trabalho.....	40
3.4.2	Configuração do ligante receptor.....	40
4	RESULTADOS	41
4.1	MANUSCRITO: <i>Detection of organotin compounds by alpha hemolysin nanopore.....</i>	41
5	CONCLUSÕES	49
6	PERSPECTIVAS	50
	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

A poluição do meio ambiente aumenta a cada ano, principalmente devido aos impactos das atividades antrópicas, sendo que, os efeitos dessa contaminação estão cada vez mais visíveis, afetando a atmosfera, o solo, as florestas, os animais, os rios e os oceanos (GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003; ARIAS et al., 2007; VIEIRA et al., 2016). Entre as diversas atividades que podem introduzir substâncias químicas no meio ambiente, está o uso de tintas anti-incrustantes e pesticidas, cujo princípio ativo de muitos deles são compostos organoestânicos (OTs, do inglês “organotins”) (SOUSA et al., 2014).

Os compostos OTs apresentam uma grande aplicabilidade industrial, contudo, nos primórdios de sua descoberta, em torno de 1853 por Edward Frankland, o interesse era puramente científico. Começaram a ganhar notoriedade a partir da indústria do PVC (Policloreto de polivinila), por volta de 1940, e posteriormente devido a sua ação biocida, evidenciada no início de 1950. A partir de então esses compostos tornaram-se parte principal da composição de diversas tintas anti-incrustantes e pesticidas agrícolas, aumentando o impacto dos compostos químicos sobre os diversos ecossistemas (DE CARVALHO OLIVEIRA; SANTELLI, 2010; SOUSA et al., 2014). A extensa contaminação do ambiente marinho, junto com os efeitos deletérios causados pelas tintas anti-incrustantes à base de OTs, levou a introdução de restrições sobre sua utilização, culminando em sua proibição para esses fins, de maneira global (SONAK et al., 2009). Apesar disso, a utilização dos OTs na proteção de lavouras, como pesticidas, ainda é motivo de preocupação, pois, devido à baixa solubilidade da maioria destes compostos, observou-se grande tendência de acumulação dos compostos OTs pela biota que entra em contato com sedimentos contaminados (HRELIA et al., 1994; LI et al., 2016).

O Brasil é o maior consumidor de pesticidas agrícolas do mundo e sua utilização aumenta a uma velocidade duas vezes superior a dos demais países (FERREIRA et al., 2014). Segundo um documento da Abrasco (Associação Brasileira de Saúde Coletiva), publicado em 2012, o país consome o equivalente a 19% do total de pesticidas fabricados no mundo. Estes números são fruto do padrão tecnológico introduzido na agricultura brasileira nos anos de 1960, cujo objetivo era a obtenção de níveis mais elevados de produtividade (FERREIRA et al., 2014). Como consequência desta moderna agricultura, observam-se impactos ambientais como poluição dos rios, erosão e desertificação de solos, desmatamentos indiscriminados, contaminação de alimentos, consequentemente intoxicação, morte de animais e do homem, com resíduos de agroquímicos (ARIAS et al., 2007; FERREIRA et al., 2014).

Devido ao uso indiscriminado dos compostos OTs ao longo dos anos, tornou-se de fundamental importância o monitoramento em tempo real, face a capacidade e facilidade de dispersão desses compostos no ambiente, comprometendo os recursos hídricos e a produção de alimentos como citados anteriormente (MA; GUI; ZHU, 2015; NOVENTA et al., 2015; GUI et al., 2016). As técnicas cromatográficas são as mais utilizadas para o monitoramento dos níveis dos compostos OTs no ambiente, principalmente a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), entretanto exigem uma mão-de-obra especializada além de um alto custo operacional, dificultando sua aplicação em larga escala (ARIAS et al., 2007).

Estudos a partir dos anos 2000 demonstram a capacidade de poros nanométricos em detectar, identificar e caracterizar diversas moléculas em sistemas aquosos. Em particular, neste cenário vem ganhando destaque o nanoporo formado pela alfatoxina de *Staphylococcus aureus*, também conhecida por alfa-hemolisina (α -HL). Este nanoporo, quando inserido em um suporte lipídico e banhado por solução eletrolítica, representa uma plataforma de sensoriamento reprodutível, sensível e versátil (BAYLEY; CREMER, 2001). A utilização deste nanoporo como elemento de reconhecimento é baseado no sensoriamento estocástico, onde as moléculas do analito se aproximam do nanoporo por difusão, e desta forma, entram e ocupam seu lúmen. Esta ocupação gera um evento de bloqueio transitório à passagem de íons que cruzam o seu interior (RODRIGUES et al., 2008). As vantagens atreladas à utilização da alfatoxina, proporcionaram sua aplicação em diversas áreas, como na discriminação simultânea de enantiômeros (KANG et al., 2006), sequenciamento do DNA (CLARKE et al., 2009), detecção de armas químicas (TNT) (LIU; ZHAO; GUAN, 2010a), drogas ilícitas (cocaína) (KAWANO et al., 2011), e no monitoramento de microcistinas na água (RODRIGUES et al., 2013).

Neste contexto, reconhecidas as limitações das técnicas atuais utilizadas na detecção de compostos OTs no meio ambiente, é indispensável e essencial o desenvolvimento de novas ferramentas analíticas que propiciem o monitoramento e caracterização dos compostos OTs. Desta forma, neste trabalho propomos estudar a interação dos organoestânicos com o nanoporo da alfatoxina de *Staphylococcus aureus*, aliado a um estudo computacional das interações entre estes compostos e o nanoporo com a finalidade de desenvolver um biossensor para esta classe de pesticidas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Estudar a interação de compostos organoestânicos com o nanoporo da alfatoxina visando sua utilização como biossensor para detecção destes compostos em sistemas aquosos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar experimentalmente os parâmetros biofísicos: tempo característico de permanência, tempo característico de ausência, constante de associação, constante de dissociação e energia de interação dos compostos organoestânicos Cyhexatin e DPhT com o nanoporo da alfatoxina;
- Determinar experimentalmente os limites de detecção do nanoporo da alfatoxina para os compostos organoestânicos supracitados.
- Identificar em simulações por docagem molecular, potenciais interações que favoreçam a ligação entre os compostos Cyhexatin e DPhT e o nanoporo da alfatoxina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O aumento das atividades antrópicas sobre o meio ambiente tem elevado os níveis de compostos xenobióticos, causando preocupação mundial, dado que, esses compostos apresentam a capacidade de reduzir a qualidade ambiental, comprometendo a saúde dos seres humanos (SOARES; PORTO, 2007).

A presença de diversas fontes de contaminação, a exemplo de efluentes industriais, drenagem agrícola e utilização de compostos químicos na indústria naval, tem exposta a biota aquática a níveis alarmantes de substâncias tóxicas (PORTO; MILANEZ, 2009; SOUSA et al., 2014). Tendo em vista que essa é uma das principais vias de impacto ambiental, a utilização de tintas anti-incrustantes e pesticidas contendo organoestânicos se mostra, devido os seus efeitos nocivos já evidenciados, uma preocupação a respeito dos danos que podem causar aos seres vivos (GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003).

As restrições aplicadas à utilização dos compostos OTs na indústria naval virou realidade e ao longo dos anos os níveis desses compostos vêm diminuindo no meio ambiente (ANASTASIOU et al., 2016). Apesar disso, o mercado agrícola ainda apresenta preocupação quanto à contaminação e lixiviação no ambiente desses compostos, devido a sua ampla aplicação em lavouras, como pesticidas (DE ANDRADE et al., 2010). Ao longo dos anos, o Brasil ganhou destaque na produção agrícola, principalmente devido às grandes áreas de terras disponíveis para cultivo, além de apresentar um clima favorável para os mais diversos gêneros agrícolas (soja, café, feijão, açúcar, entre outros) (GOMES, 2009). Esse crescimento veio acompanhado com um forte crescimento da indústria química, que passou a incentivar a utilização de defensivos agrícolas (pesticidas), com o intuito de preservar o plantio contra as pragas e desta forma aumentar a produção (SOARES; PORTO, 2007).

No Brasil, o uso de pesticidas na atividade agrícola data desde a década de 60 até os dias atuais. O crescimento agrícola associado ao uso de pesticidas, repercute diretamente na saúde da população brasileira, visto que, há uma crescente nos casos de pessoas contaminadas (GODOY; OLIVEIRA, 2004; PICCOLI et al., 2016). O reflexo disso também acomete populações de países estrangeiros, que similarmente aplicam esse processo produtivo baseado na utilização dessas substâncias tóxicas (CASSAL et al., 2014).

Atualmente, o maior desafio da nossa geração é o melhoramento da produção agrícola na ausência dessas substâncias, contudo a falta de medidas eficazes torna refém as lavouras dos

agroquímicos rotineiramente usados. Desta forma, medidas paliativas como o monitoramento desses contaminantes no meio ambiente é de suma importância para evitar a elevação dos impactos ambientais e consequentemente sobre a saúde da população mundial (GUI et al., 2016).

2.2 COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS

2.2.1 Histórico

Os primeiros estudos envolvendo a síntese e manipulação dos compostos OTs foram executados por Sir Edward Frankland (1825-1899) que, em 1853, utilizando como precursor o iodeto de etila e estanho metálico, produziu o diiodeto de dietilestanho (HOCH, 2001; SOUSA et al., 2014). A partir desse pioneirismo, outras descobertas foram empreendidas e desta forma já são conhecidos mais de 800 compostos OTs, a maioria de origem antropogênica, excetuando o metilestanho, que pode ser produzido por biometilação (LE GROGNEC et al., 2015).

A ausência de aplicações práticas, por muito tempo, manteve esses compostos apenas sob interesse exclusivamente científico. A partir de 1940, esses compostos ganharam destaque comercial para suprir a indústria de plásticos, particularmente a produção de policloreto de polivinila (PVC), que nesta época encontrava-se em ligeira expansão (SOUSA et al., 2014).

A exposição do polímero PVC ao calor, radiação ultravioleta ou radiação gama, pode, dependendo da intensidade e tempo de exposição, causar liberação de HCl, e o resultado é um rápido processo de degradação, revelado normalmente pela mudança de coloração para amarelo ou até mesmo marrom escuro (RODOLFO JR; NUNES; ORMANJI, 2006; RODOLFO JR.; MEI, 2007). Alguns estudos utilizando OTs, evidenciaram a capacidade destes em inibir esse processo de degradação, revelando uma importante ação estabilizante (WYPYCH, 2015).

A exploração da atividade biocida dos OTs surgiu a partir de 1950, por Van der Kerk e Luijten (1953), identificando que os compostos tri substituídos (tributilestanho, trifenilestanho, entre outros) apresentavam ação contra fungos e bactérias, além de organismos marinhos, vermes parasitas, moluscos aquáticos e insetos (VAN DER KERK; LUIJTEN, 1956). Os estudos complementares sobre a ação biocida dos OTs vieram com Kaars Sipesteyn em 1960, demonstrando a seletividade que o tributilestanho e o trifenilestanho apresentam em atuar contra fungos e bactérias. Desta forma um novo mercado se expandiu para a comercialização dos OTs (DE CARVALHO OLIVEIRA; SANTELLI, 2010; SOARES; PORTO, 2012). Nos anos 60, diversas multinacionais passaram a comercializar esses compostos a exemplo da alemã

Aventis, introduzindo o Brestan, nome comercial para o acetato de trifenilestanho, e a Philips Dufan, introduzindo o Du-ter baseado no hidróxido de trifenilestanho, usados em culturas de trigo, café, batata, amendoim, cacau e feijão (GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003). De modo paralelo, o mercado para o tributilestanho foi crescendo, a partir de sua incorporação em formulações de tintas antiincrustantes, devido a sua alta eficiência, comparada aos biocidas anteriormente utilizados (GOLDBERG, 1997). Graças a capacidade dessas tintas, mais especificamente contendo o cloreto de tributilestanho, em proporcionar mais de cinco anos de proteção aos cascos dos navios, a indústria para esses compostos entrou em grande expansão englobando cerca de 20% da comercialização de biocidas no início dos anos 90 (GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003).

Entretanto, a identificação de problemas relacionados à toxicidade dos compostos OTs, por causar mutações nos organismos que viviam próximos aos portos, promoveu a tomada de medidas legais que foram surgindo no inícios dos anos 2000, com o intuito de frear a produção e utilização dos compostos OTs para esses fins (GAO et al., 2015; LEE et al., 2015). Apesar do declínio progressivo das concentrações de compostos OTs no meio ambiente, este poluente e seus produtos de degradação (dibutilestanho (DBT); monobutilestanho, (MBT), óxido de estanho, entre outros) ainda estão presentes em quantidades vestigiais em ambientes marinhos (GAO et al., 2015; LEE et al., 2015).

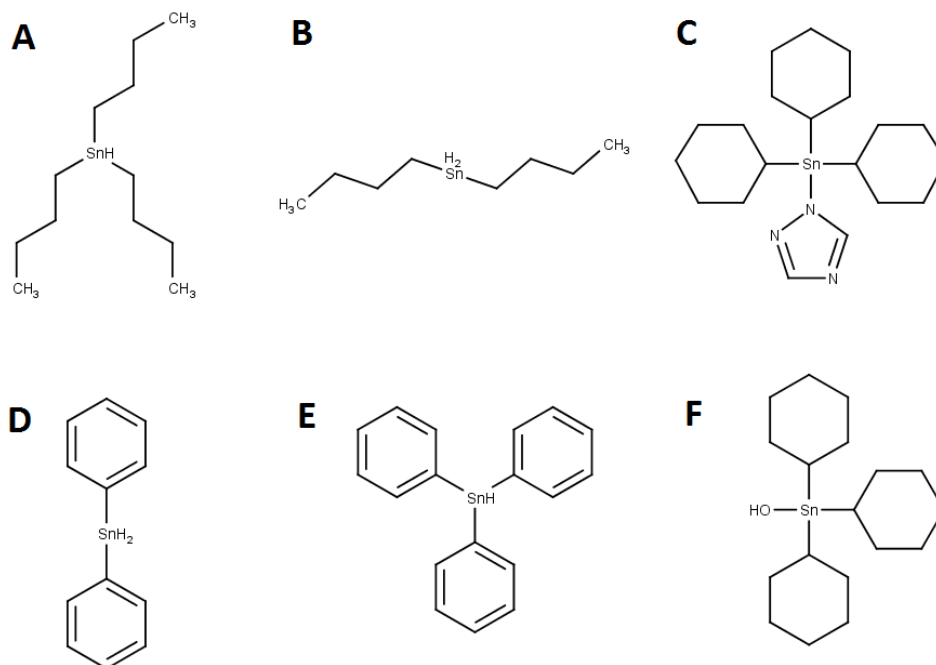
Devido à enorme quantidade de OTs despejados no ambiente marinho, durante o período de alta produção e utilização desses compostos, houve a contaminação do sedimento marinho transformando esse ambiente em um reservatório de compostos tóxicos (GRACELI et al., 2013). Além disso, a falta de restrições de seu uso no campo agrícola e de métodos de controle e monitoramento, deixam portas abertas para o crescimento de novas vias de contaminação em grande escala dos solos, rios e oceanos em pleno século XXI (RIBEIRO et al., 2008). As estimativas é que o crescimento do setor agrícola no país, responsável por quase metade do produto interno bruto brasileiro, não encontre barreiras para o uso de tais compostos, demonstrando um grande desafio da nossa geração no controle da exposição humana a esses compostos de alta toxicidade (GOMES, 2009; CREMONESE et al., 2017).

2.2.2 Propriedades químicas

Os compostos OTs são caracterizados pela presença de uma ou mais ligações entre estanho-carbono, essa ligação é estável na presença de água, O₂ atmosférico e calor (até 200°C),

contudo a ação de ácidos fortes e agentes eletrofílicos quebra facilmente essa ligação (**FIGURA 1**).

FIGURA 1. Estrutura química 2D dos principais compostos OTs.

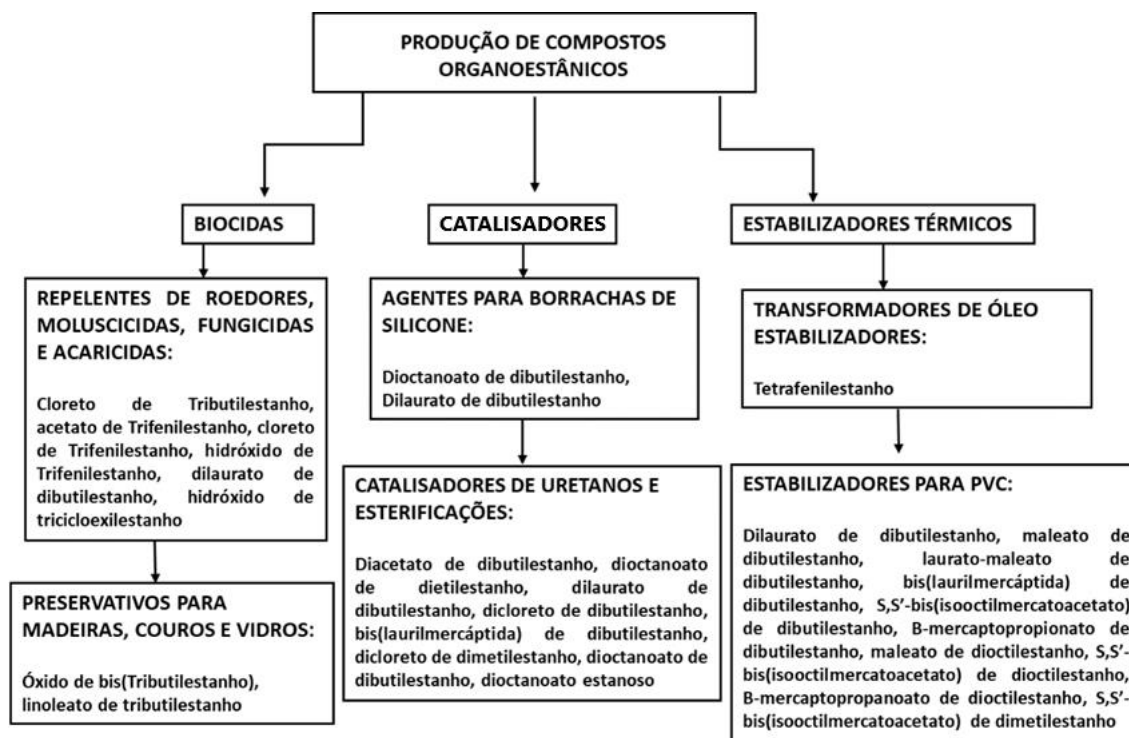


Fonte: Elaborado pelo autor. Imagem das estruturas químicas dos compostos OTs utilizados como biocidas. Tributilestanho-TBT (**A**), Dibutilestanho-DBT (**B**), 1, 2, 4-triazol de Tricicloexilestanho - Azocyclotin (**C**), Difenilestanho-DPhT (**D**), Trifenilestanho-TPhT (**E**) e o Hidróxido de Tricicloexilestanho - Cyhexatin (**F**). (Software: MarvinSketch®)

Os compostos OTs apresentam a formula geral R_nSnX_{4-n} , onde **R** é um grupamento alquil ou aril e **X** uma espécie aniônica (Cl^- , F^- , O^{2-} , OH^- , $-COO^-$ ou $-S^-$) (HOCH, 2001; GRACELI et al., 2013). Desta forma, esses compostos estão inclusos nos grupos dos organometálicos. A presença de um centro tetravalente classifica os compostos OTs em mono, di, tri e tetra substituídos. O número de substituintes orgânicos possuem um efeito intrínseco nas propriedades dos compostos, como insolubilidade e hidrofobicidade, diminuindo na ordem $Tri(R_3SnX_1) > Di(R_2SnX_2) > Mono(R_1SnX_3)$, substituídos (SOUSA et al., 2014).

2.2.3 Aplicações comerciais dos compostos organoestânicos

No âmbito das diversas moléculas pertencentes ao grupo dos organometálicos, os compostos derivados de estanho apresentam uma vasta aplicabilidade comercial quando comparados a outros elementos (HOCH, 2001; DIAS, 2005; SOUSA et al., 2014) (**FIGURA 2**).

FIGURA 2. Representação das principais aplicações dos compostos organoestânicos.

Adaptado de DIAS et al., 2005. Esquema representando as diversas aplicações dos compostos organoestânicos. Esses compostos são caracterizados por apresentarem uma vasta aplicação, destacando-se nas áreas de estabilizante térmicos de PVC, catalisadores e na indústria de biocidas (tintas anti-incrustantes e os pesticidas).

Os triorganoestânicos apresentam atividade biológica máxima, onde são comercialmente utilizados como biocidas nas diversas áreas, enquanto que, os di- e os monorganoestânicos em estabilizantes de plástico, já os compostos tetraorganoestânicos não possuem grandes aplicações a não ser como precursor na síntese dos outros compostos OTs (DESPAIGNE et al., 2010).

Entre todas as aplicações, a maior disseminação de OTs no meio ambiente é atribuída ao uso de tintas anti-incrustantes (HOCH, 2001). Por volta de 1961, esse ramo na indústria naval teve a sua primeira tinta incorporada com OTs e devido a sua eficiência, foi amplamente empregado, principalmente as tintas contendo tributilestanho (TBT) (GOLDBERG, 1997; GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003). Os cascos dos navios submersos no mar por qualquer período de tempo estão expostos ao ataque de organismos incrustantes como cracas, mexilhões e algas (FREY et al., 2014). O acúmulo desses organismos provoca a diminuição da capacidade operacional máxima do navio e por consequência o aumento dos custos de transportes, mais especificamente, devido ao aumento do consumo de combustível

(CASTRO; WESTPHAL; FILLMANN, 2011). Logo, a aplicação de tintas anti-incrustantes com a finalidade de reduzir esses efeitos tornou-se de suma importância (**FIGURA 3**).

FIGURA 3. Processo de incrustação e aplicação de tinta anti-incrustante.



Adaptado de SOUZA et al., 2014. Incrustação e aplicação da tinta anti-incrustante. Evidenciação da incrustação nos cascos dos navios (**A-B**); ancoradouro na presença do navio para limpeza e aplicação da tinta anti-incrustação (**C-D**).

Contudo, devido às restrições sofridas na produção de tintas anti-incrustantes contendo OTs, a aplicação como estabilizantes de PVC e no controle de pragas, como pesticida, são os responsáveis pela grande demanda na produção e comercialização dos compostos OTs (IMO, 2002). O PVC ganhou destaque na indústria de plásticos por ser considerado um polímero altamente versátil e polivalente (FERNANDES; DIACENCO, 2002; SANTOS, 2015). Esse polímero é utilizado nos mais diversos segmentos do mercado, como construção civil, laminados/esmaltados, calçados e por ser um bom isolante elétrico, também é aplicado na fabricação de cabos elétricos, tornando-se o segundo plástico mais consumido no mundo (RODOLFO JR; NUNES; ORMANJI, 2006; SANTOS, 2015). No Brasil o PVC representa

14,9% do total de plásticos produzidos no mercado brasileiro movimentando R\$ 9,8 bilhões ao ano (SANTOS, 2015).

A degradação térmica foi um grande problema encontrado no processo de expansão e produção em massa que esses polímeros enfrentaram nos anos 40 (GEDDES, 1967; YU et al., 2016). Assim diversos estabilizantes foram empregados de modo a atuar no controle desse processo garantindo o máximo de rendimento do produto final. Dentre os compostos mais empregados e de maior eficiência para esta finalidade, os organoestânicos ganham destaque, pois, em níveis de até 0,5% da massa do composto, apresentam a capacidade de manter as características ao longo do tempo de meia-vida do polímero (SANTOS, 2015; WYPYCH, 2015).

O controle de pragas denota um papel importante no agronegócio e a utilização de pesticidas funciona como uma ferramenta que permite atingir a rentabilidade na produção (VIEIRA et al., 2016). No último balanço, realizado sobre as receitas das principais empresas estrangeiras produtoras de pesticidas, no Brasil, a fatia do PIB agrícola ocupado pela comercialização desses compostos, girou em torno de 10% (ANDRADE et al., 2012; FERREIRA et al., 2014). Entre o grande número de compostos químicos que podem ser aplicados com esta finalidade, a utilização de pesticidas à base de organoestânicos se mostrou rentável para diferentes pragas e tipos de lavouras (TABELA 1).

TABELA 1. Aplicações dos compostos OTs como pesticidas.

PESTICIDAS	CULTURAS	PRAGAS
CYHEXATIN	Citrus	<i>Tetranychus urticae</i> , <i>Phyllocoptruta oleivora</i> e <i>Brevipalpus phoenicis</i>
	Maça Berinjela	<i>Panonychus ulmi</i> <i>Tetranychus urticae</i>
CYHEXATIN, ÓXIDO DE FENBUTATINA E AZOCYCLOTIN	Citrus	<i>Phyllocoptruta oleivora</i> , <i>Brevipalpus phoenicis</i> , <i>Panonychus citri</i> e <i>Polyphagotarsonemus latus</i>
	Batatas	<i>Phytophthora infestans</i>
	Amendoim	<i>Cercospora arachidicola</i> e <i>cercosporium personatum</i>
	Soja	<i>C. kikuchi</i> , <i>Diaporthe phaseolorum</i> , <i>C. dematium</i> e <i>Golpearia glycines</i>
	Beterraba	<i>C. beticola</i> , <i>Ersiphe betae</i> , <i>Phoma betae</i> , e <i>phythium aphanidermatum</i>
	Café	<i>P. sringae</i>
	Cacau	<i>Cacao moniliasis</i> e <i>Phytophthora palmivora</i>

Adaptado de Godoi et al., 2001.

No Brasil a utilização de pesticidas que apresentam este tipo de princípio ativo, já proibido em outros países, sofreu veto da ANVISA apenas em 2008, principalmente devido sua importante ação na citricultura para o combate de doenças como a leprose dos citros, transmitida pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*, que é considerada uma das doenças virais de maior importância na citricultura brasileira (ANDRADE et al., 2012).

2.2.4 Toxicidade dos compostos Organoestânicos

O receio quanto aos impactos que esses compostos apresentam sobre os organismos vivos surgiu no início dos anos 80, a partir do momento que foi evidenciado que os organismos que se aderem aos cascos dos navios não eram os únicos a sofrerem a ação biocida dos OTs, expondo toda a biota ao redor aos mesmos efeitos deletérios (GOLDBERG, 1997; GABRIELSKA et al., 2000; GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003; SOUSA et al., 2014).

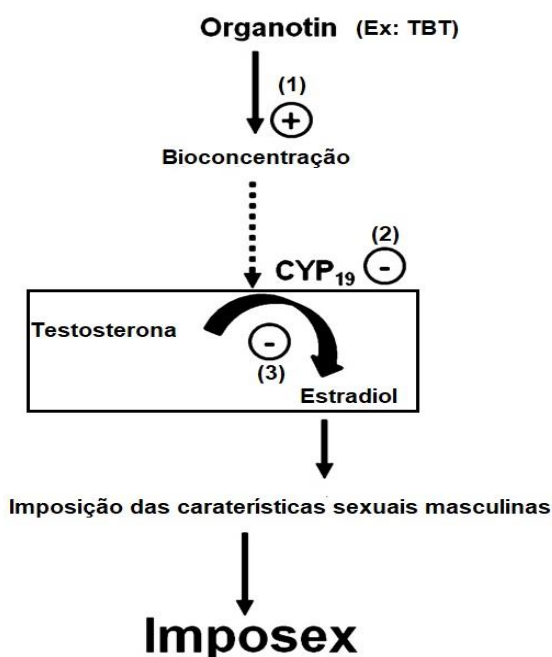
O primeiro registro de efeito nocivo dos OTs foi em Arcachon, uma baía fechada na costa do Atlântico Francês, com instalações de cultivo de ostras. A produção de ostras foi severamente afetada, onde foram evidenciados problemas de crescimento, baixa taxa de reprodução e o surgimento de anomalias de calcificação nas ostras. Estudos mostraram que esses problemas estavam associados à existência de numerosas marinas na baía, onde navios atracados estavam liberando quantidades elevadas de tintas anti-incrustante à base de organoestânicos, especificamente, contendo o tributilestanho (TBT) (RUIZ et al., 1996; GRACELI et al., 2013).

Outro efeito relacionado aos níveis elevados de tintas anti-incrustantes à base de organoestânicos, foi o desenvolvimento de órgãos sexuais masculinos em fêmeas de caramujos das espécies *Nucella lapillus* e *Nassarius obsoletus* (GRACELI et al., 2013; SOUSA et al., 2014). Este fenômeno passou a ser conhecido como “*imposex*” e pode afetar mais de 200 espécies de gastrópodes. Estudos demonstram a possibilidade do mecanismo de ação estar baseado na inibição da atividade da aromatase CYP₁₉, impedindo a conversão de testosterona em estradiol (**FIGURA 4**). Hoje, esse fenômeno funciona como um biomarcador específico para identificação de altos níveis de TBT nas costas da Europa (CASTRO; ROSSATO; FILLMANN, 2012; ANASTASIOU et al., 2016).

Os principais OTs utilizados como defensivos agrícolas são o cyhexatin, azocyclotin, entre outros. Os efeitos tóxicos desses compostos ainda não foram bem elucidados e apresentam poucos estudos na área. O cyhexatin demonstrou um leve efeito mutagênico em estudos

realizados com mamíferos. Já o azocyclotin apresentou efeitos em anfíbios, causando o encurtamento da pata traseira da espécie *Xenopus laevis*, durante o processo de metamorfose (LI et al., 2016). Outros estudos também demonstram os efeitos desses compostos em comunidades plantônicas, zooplânctons além do aumento da degradação microbiana anaeróbia do ambiente aquático (HRELIA et al., 1994; GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003).

FIGURA 4. Esquema de regulação da atividade da aromatase CYP₁₉.



Adaptado de Graceli et al., 2012. Diagrama da modulação dos OTs sobre a atividade da aromatase CYP₁₉. O aumento da concentração dos compostos OTs (1), causa a diminuição da atividade da aromatase CYP₁₉ (2), conseqüentemente, ocorre a diminuição na conversão da testosterona à estradiol em moluscos fêmeas (3). Acredita-se que essa via possa ser responsável pelo fenômeno de *Imposex*.

Os esforços em identificar as vias de toxicidade dos OTs em mamíferos permitiram obter mais informações sobre os efeitos desses compostos em sistemas biológicos, como por exemplo a ação imunotóxica exercida pelo Dibutilestanho (DBT). O DBT apresenta a capacidade de competir com o ligante, pelo sítio ativo dos receptores de glicocorticóides (GR) inibindo a supressão mediada pelos GR de citocinas pró-inflamatórias e conseqüentemente contribuindo para o surgimento de doenças auto-imunes (GUMY et al., 2008). Já a capacidade de causar disfunções na atividade endócrina, processo este conhecido e bem documentado em caramujos, também foram relatados em mamíferos, tendo o TBT e o TPhT como os principais

responsáveis, atuando principalmente como ligantes para o receptor de retinóide X (RXR) (GRÜN; BLUMBERG, 2006).

A toxicidade dos OTs coloca a prova o seu real custo benefício, apesar das grandes restrições que foram impostas no uso dessas substâncias, os níveis presentes no meio ambiente ainda são altos. Os impactos causados, tanto ao ambiente quanto à saúde do homem, tem estimulado o desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, sensíveis e precisos que possam fornecer o grau de contaminação, assim como, monitorar em tempo real os níveis dos OTs (GUI et al., 2016).

2.2.5 Métodos de Análise e Detecção

Diversas técnicas analíticas são utilizadas para a detecção e discriminação de OTs, os métodos se baseiam na combinação de uma técnica de separação com uma de detecção. As principais metodologias analíticas baseadas nas técnicas de separação utilizadas são a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) (DE CARVALHO OLIVEIRA; SANTELLI, 2010).

A cromatografia gasosa é a técnica de separação mais utilizada devido a sua alta resolução, maior versatilidade de detecção e melhor capacidade de separação simultânea dos diferentes compostos OTs. Infelizmente os compostos, mono-, di- e trissubstituídos não são suficientemente voláteis e ou termicamente lábeis, tornando necessário iniciar um processo de produção de derivados voláteis antes da separação por CG (FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003; DE CARVALHO OLIVEIRA; SANTELLI, 2010; GODOI; NOVENTA et al., 2015). O procedimento mais amplamente utilizado para obtenção de espécies voláteis dos compostos OTs é através da reação de “Grignard”, por meio da formação de derivados tetrasubstituídos (brometo ou cloreto de etil, butil ou pentilmagnésio), permitindo, desta forma, a produção de derivados estáveis e possibilitando a diferenciação das diferentes espécies de OTs (MORABITO; MASSANISSO; QUEVAUVILLER, 2000). Contudo, esses passos de derivação são demorados, sujeitos a interferências e envolvem considerável manipulação de amostra que pode levar à perda de analito (ABALOS et al., 1997; DE CARVALHO OLIVEIRA; SANTELLI, 2010).

A utilização do HPLC no processo de separação dos compostos OTs não necessita da aplicação de processos de derivação, eliminando as possíveis fontes de incertezas, reduzindo o tempo de análise significativamente, quando comparado com a CG (GUI et al., 2016). Além disso, diversas fases estacionárias e móveis podem ser utilizadas, facilitando a adequação dessa

metodologia para as diferentes amostras ambientais que serão utilizadas no processo de separação. No entanto a interface do sistema de separação, que compreende o HPLC, e o de detecção, em conjunto com o número reduzido de amostras dos compostos que podem ser analisados em um único ensaio, demonstram as principais desvantagens em relação a CG (GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003).

Os detectores mais empregados envolvem, a espectrometria de absorção atômica (AAS), detecção fotométrica de chama (FPD), detecção por emissão atômica (AED) e espectrômetro de massa (MS) (GUI et al., 2016), que podem ser acoplados aos cromatógrafos e desta forma identificar os compostos OTs. Desta maneira, a aplicação de técnicas baseadas na utilização de um cromatógrafo a um sistema de detecção permite a análise e identificação dos organoestânicos no meio ambiente (GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003). Contudo, dentre todas essas técnicas de especiação empregadas, alguns problemas dificultam a aplicação desses métodos, como o limite de detecção, não sendo suficiente para detectar os valores reais do analito no meio ambiente atrelado ao alto custo que envolve o preço dos equipamentos e pagamento de pessoas capacitadas para a realização desses procedimentos (DE CARVALHO OLIVEIRA; SANTELLI, 2010). Consequentemente, o monitoramento em tempo real desses compostos, utilizando estas técnicas, apresenta um custo benefício muito baixo, abrindo espaço para o desenvolvimento de novas técnicas analíticas (ARIAS et al., 2007).

Atualmente, há um grande número de estudos que estão em busca de melhorar as técnicas já existentes, conjuntamente com o desenvolvimento de novos métodos que visam transpor as limitações apresentadas pelos dispositivos supracitados (NOVENTA et al., 2015; ANASTASIOU et al., 2016; GUI et al., 2016;). Nesse contexto, poros nanométricos tem se destacado neste cenário, particularmente devido a capacidade dessas estruturas em permitir a detecção, identificação e caracterização de moléculas em tempo real. Metodologias utilizando o nanoporo formado pela alfatoxina de *Staphylococcus aureus* já comprovam a capacidade desse sistema, no monitoramento de contaminantes ambientais (RODRIGUES et al., 2013).

2.3 NANOPORO DA ALFATOXINA COMO BIOSSENSOR ESTOCÁSTICO

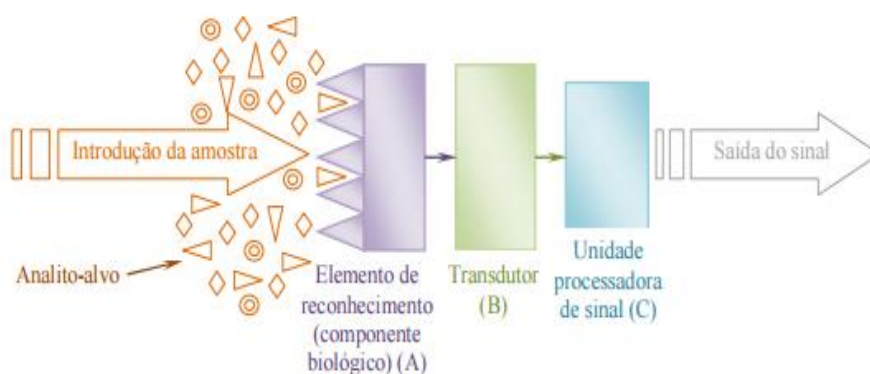
2.3.1 Aspectos Gerais

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*), propõe como biossensor, “um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica, quantitativa

ou semi-quantitativa, através do uso de um elemento de reconhecimento biológico, que está em contato direto com o elemento transdutor” (THEVENOT, 1999). Nesse aspecto ocorre o acoplamento entre um componente altamente específico e seletivo ao poder de ferramentas eletrônicas com alta sensibilidade, em captar o sinal gerado e transmitir como um sinal mensurável (LEE et al., 2008; CALIL; ROBERTO, 2011). O funcionamento de um biossensor pode, esquematicamente, ser representado por três etapas (**FIGURA 5**).

A primeira etapa compreende no reconhecimento biológico, caracterizado pela interação entre o analito e o elemento de reconhecimento (enzima, anticorpo, ácido nucleico, canais iônicos, entre outros) (LEE et al., 2008; AGUIAR et al., 2015). O resultado dessa interação é a produção de um sinal baseado na alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas do elemento de reconhecimento (THEVENOT, 1999). No processo de transdução, o sinal formado proveniente da interação entre analito e o elemento de reconhecimento, é convertido em um sinal mensurável, que, por fim, a unidade de processamento analisa e amplifica o sinal proveniente do transdutor, armazenando-o em dispositivos adequados (SONG; XU; FAN, 2006; AGUIAR et al., 2015).

FIGURA 5. Configuração geral das etapas e componentes de um biossensor.



Retirado de CALIL; ROBERTO, 2011. Esquema de funcionamento de um biossensor. O processo de detecção do analito é realizado a partir do seu reconhecimento, ação praticada por um componente biológico **(A)**, gerando um sinal que é transformado **(B)**, e processado **(C)**.

A classificação dos biossensores leva em consideração aspectos como: mecanismo de detecção, transdução e de interação entre analito e o elemento de reconhecimento. Como citado anteriormente, a detecção pode ser realizada pela utilização de uma enzima, anticorpo, ácidos nucleicos, aptâmeros ou canais iônicos, esses componentes biológicos se apresentam como potenciais elementos de reconhecimento, classificando o biossensor a partir da natureza dos

mesmos (CALIL; ROBERTO, 2011). Baseado no tipo de transdutor, os biossensores são classificados em eletroquímicos, amperométricos, potenciométricos, condutimétricos, ópticos, piezoelétricos e calorimétricos (THEVENOT, 1999; CALIL; ROBERTO, 2011). E finalmente, o processo de interação do elemento de reconhecimento e o analito, permite classificar os biossensores em catalíticos e de afinidade (THEVENOT, 1999).

Contudo, uma nova forma de sensoriamento vem sendo academicamente empregado para a elaboração de dispositivos analíticos, baseado na utilização de nanoporos proteicos como elemento de reconhecimento de uma variedade de moléculas (LIU; ZHAO; GUAN, 2010b; KAWANO et al., 2011). Basicamente, a capacidade dessas nanobioestruturas em identificar alterações nos parâmetros físicos, além da capacidade de reconhecimento e seletividade das mais diversas espécies químicas, demonstra a imensa versatilidade desses nanoporos, favorecendo atualmente, a aplicação como principal elemento capaz de realizar o biossensoriamento estocástico (AGUIAR et al., 2015).

Para esta finalidade, os nanoporos proteicos necessitam apresentar algumas características, como, elevada condutância, estrutura molecular elucidada, facilidade de manipulação genética e estabilidade físico-química que favoreçam na aplicação como elemento de reconhecimento molecular. Baseado nessas características a alfatoxina tornou-se o modelo de nanoporo proteico para o desenvolvimento de biossensores estocásticos (BAYLEY; CREMER, 2001; NESTOROVICH, 2014; AGUIAR et al., 2015).

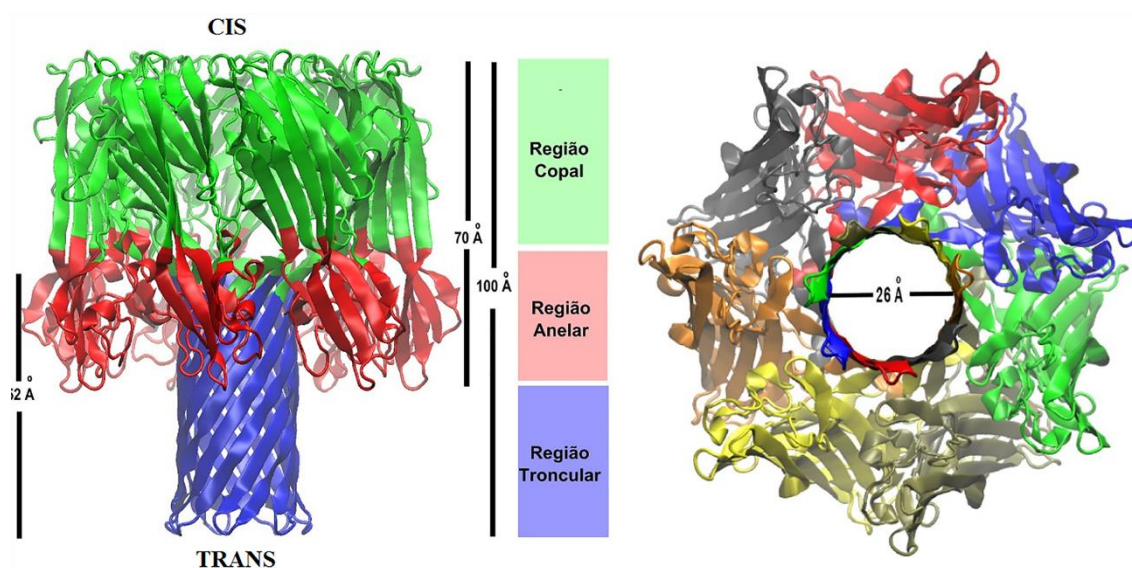
2.3.2 Alfatoxina

A alfatoxina ou também chamada de alfa-hemolisina (α -HL) é uma toxina bacteriana, classificada como uma exotoxina (NESTOROVICH, 2014; AGUIAR et al., 2015). A α -HL é uma proteína de peso molecular de aproximadamente 33 kDa, liberada na forma de monômeros de polipeptídios de 293 aminoácidos, produzida pelo *Staphylococcus aureus* (GRAY; KEHOE, 1984; KRASILNIKOV et al., 2000). Essa toxina pode se apresentar em dois estados conformacionais, um solúvel em água e outro mais estável, formando um poro quando inserida em membranas de células eucarióticas ou bicamadas lipídicas artificiais (KRASILNIKOV et al., 2000; BAYLEY; CREMER, 2001). Por apresentar tal característica, a alfatoxina pode ser denominada de toxina formadora de poro.

Conforme demonstrado na **figura 6**, a alfatoxina apresenta uma estrutura tridimensional elucidada, baseado na cristalografia de raios-X, sendo determinada na resolução de 1,89 Å (SONG et al., 1996). Esses dados demonstram a existência de 7 monômeros que se inserem em

bicamadas lipídicas, oligomerizando-se para formação do nanoporo heptamérico transmembranar (KRASILNIKOV et al., 2000). Desta forma, o nanoporo é delimitado em três domínios bem definidos: extramembranar ou copal, intramembranar ou troncular e o anelar. O domínio troncular e anelar estão ancorados na membrana, convencionalmente denominada entrada “TRANS”, enquanto que a região copal fica fora da membrana, denominada entrada “CIS” (NESTOROVICH, 2014).

FIGURA 6. Modelo do nanoporo proteico formado pela alfatoxina.

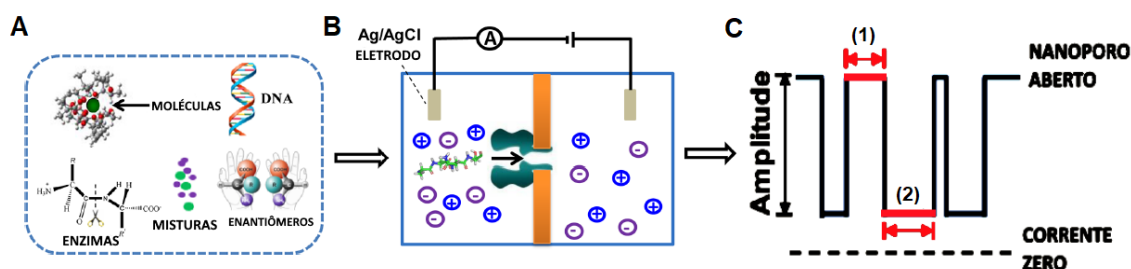


Retirado de AGUIAR et al., 2015. Ilustração da estrutura 3D do nanoporo proteico formado pela alfatoxina, baseado em dados da cristalografia de raios-X. À esquerda, vista lateral com a indicação das entradas CIS e TRANS; ao centro, ilustração dos domínios do nanoporo; à direita, vista superior das subunidades delimitantes do nanoporo proteico. As linhas verticais correspondem aos valores de comprimento de cada região, enquanto que a linha horizontal representa o diâmetro do nanoporo.

O esquema do princípio de funcionamento do biossensor baseado na utilização do nanoporo da alfatoxina está representado na **figura 7**. A inserção de um único nanoporo em uma bicamada lipídica artificial, separando dois compartimentos banhados por solução salina é submetido a aplicação de um potencial elétrico transmembrana, gerando uma corrente iônica máxima, que flui através do lúmen da α -HL (RODRIGUES et al., 2008; AGUIAR et al., 2015). Pode-se admitir um sítio de interação no interior do nanoporo, englobando principalmente os resíduos 111, 113 e 147, denominada região de constrição. A interação de cada molécula individual do analito com a constrição induz uma alteração (diminuição) da corrente iônica máxima, denominado de bloqueio (WANG et al., 2013). Basicamente podemos considerar dois

estados fundamentais, **ocupado** (pelo analito) e **não ocupado**, permitindo desta maneira acompanhar a série de flutuações (bloqueios) relacionadas à interação do analito com a α -HL. Desta forma, a obtenção da frequência de eventos (correlacionada à concentração do analito) e dos tempos médios de bloqueio, conjuntamente com a amplitude de bloqueio, permitem a identificação da molécula (ROBERTSON et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008; LIU; ZHAO; GUAN, 2010b; KAWANO et al., 2011).

FIGURA 7. Esquema do princípio de funcionamento do biossensor utilizando o nanoporo da alfatoxina.



Adaptado de WANG et al., 2013. Esquema da detecção de moléculas a partir do nanoporo da alfatoxina. Difusão dos mais variados analitos através de um único nanoporo inserido na bicamada lipídica, partindo da aplicação de um potencial transmembrana (A-B). Flutuação da corrente máxima, caracterizada pela interação dos analitos com o lume do nanoporo da alfatoxina, induzindo bloqueios característicos para cada molécula (C). Estado não ocupado (1) e estado ocupado (2).

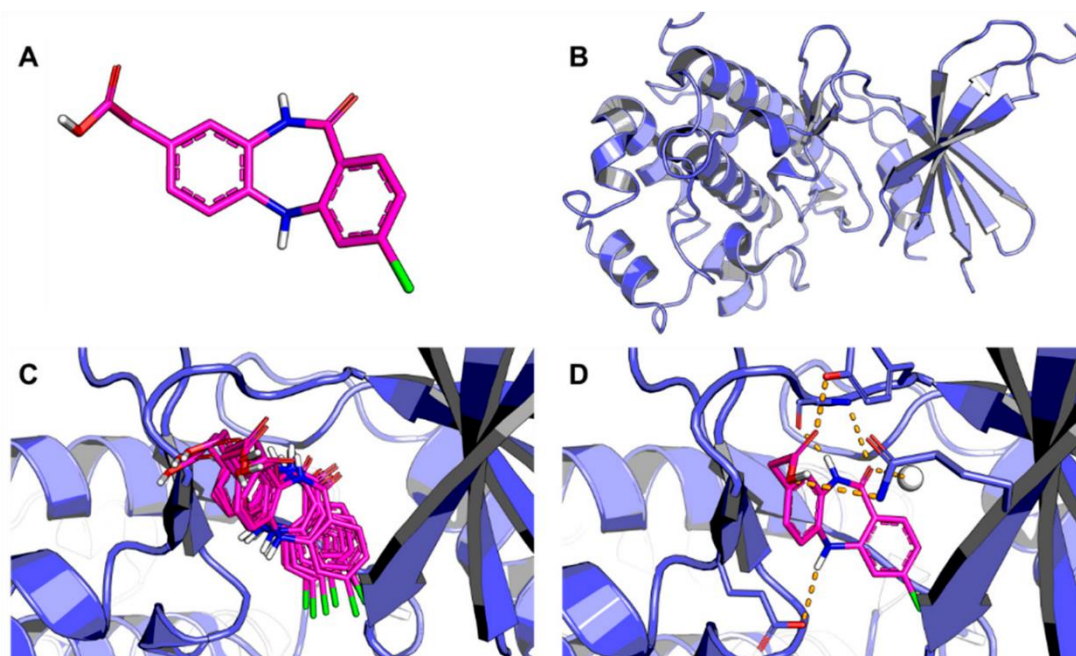
A detecção estocástica baseada no nanoporo da alfatoxina é uma abordagem promissora e do ponto de vista acadêmico já demonstra ser uma ferramenta molecular capaz de quantificar, detectar e caracterizar uma grande diversidade de moléculas (WANG et al., 2013). Por outro lado, os dados obtidos nesta abordagem permitem apenas uma análise indireta dos aspectos da interação entre as moléculas e o nanoporo da alfatoxina, portanto, o emprego de ferramentas computacionais para simulação de ancoramento molecular pode possibilitar a aquisição de informações, e desta forma, elucidar o mecanismo molecular interacional ou até mesmo corroborar os achados experimentais (MELO et al., 2015).

2.4 ANCORAMENTO MOLECULAR

O ancoramento ou “docking” molecular é um método utilizado, na determinação da melhor orientação de ligação entre um ligante e seu receptor. Esta ferramenta é uma importante técnica no âmbito da modelagem estrutural, pois permite prever o complexo mais estável entre as moléculas de interesse (**FIGURA 8**) (LENGAUER; RAREY, 1996; DE MAGALHÃES et al., 2014). A ampliação da aplicação desses métodos computacionais vem ganhando destaque

no estudo das mais variadas biomoléculas, tornando-se uma importante ferramenta para a compreensão de diversos processos e mecanismos biológicos (FERREIRA et al., 2015).

FIGURA 8. Ancoramento ou “docking” molecular.



Retirado de FERREIRA et al., 2015. Ilustração do processo de ancoramento molecular. Estrutura 3D do ligante (A) e do receptor (B), retirados a partir de bancos de dados. Após a utilização de softwares de ancoramento, uma lista das possíveis conformações do ligante na cavidade do receptor é gerada (C). Por fim o complexo de maior estabilidade é fixado, com intuito de identificar as principais interações intermoleculares envolvidas no sistema (D).

Por muito tempo, esse mecanismo poderia ser demonstrado, simplesmente como estruturas rígidas, onde o ligante e o receptor se complementavam, por meio do encaixe do ligante ao sítio ativo do receptor, modelo baseado na “chave-fechadura” proposta por Emil Fischer, em 1894 (FISCHER, 1894). Contudo este modelo não representa a realidade, pois em processos biológicos tanto o ligante quanto o receptor apresentam flexibilidade, demonstrando capacidade de modificar sua conformação durante o procedimento de encaixe do ligante ao sítio ativo do receptor. Esse ajuste conformacional, denominado de *induced-fit* (encaixe induzido), foi primeiramente enunciado por Koshland em 1966 (KOSHLAND; NÉMETHY; FILMER, 1966; VERLI; BARREIRO, 2005).

Nesse aspecto, os primeiros algoritmos de ancoramento molecular foram desenvolvidos no início da década de 80, trabalho iniciado por Kuntz e cols., em 1982 (KUNTZ et al., 1982). A flexibilidade molecular é um elemento importante para representação da realidade por parte

de um algoritmo de ancoramento e muitas vezes isso se torna inviável devido ao grau de flexibilidade de muitos receptores, desta forma diversos métodos tem sido implementados no desenvolvimento de algoritmos que solucionem esses problemas, diferenciando-os quanto a: (1) função de avaliação utilizada; (2) grau de flexibilidade das moléculas biológicas interagentes; e (3) aos métodos de busca empregados (DE MAGALHÃES, 2006).

As estratégias dos primeiros algoritmos de ancoramento tratavam tanto o ligante quanto o receptor como moléculas rígidas, no intuito de realizar triagens em bancos de dados contendo informações dos mais variados ligantes, para a identificação de novos compostos bioativos. Esses algoritmos apenas consideravam os graus de liberdade translacionais e rotacionais do ligante sendo denominados de “algoritmos de docking rígido” (TEAGUE, 2003). Ao longo dos anos, estudos introduziram os graus de liberdade conformacionais ao levar em consideração os ângulos diedrais do ligante, e assim foram denominados de “algoritmos de docking flexível”, permitindo o desenvolvimento de técnicas de ancoramento mais acuradas na predição do complexo ligante-receptor (TEAGUE, 2003; VERLI; BARREIRO, 2005).

Os cálculos envolvidos no ancoramento molecular também apresentam o objetivo de avaliar as interações energéticas das orientações de um ligante e seu receptor, para isso, é importante o conhecimento das principais interações intermoleculares envolvidas na formação desse complexo (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).

2.4.1 Interações Intermoleculares Envolvidas no Complexo ligante-receptor

O estudo das interações que envolvem os processos de reconhecimento molecular entre ligante-receptor é de grande importância no entendimento do mecanismo de ação proposto por esses complexos moleculares (enzima-substrato, antígeno-anticorpo). As principais interações que regem esses sistemas são as interações de Van der Waals, interações eletrostáticas, e as ligações de hidrogênio (ROCHA, 2010).

Em termos de importância, as ligações de hidrogênio ocupam posição de destaque devido a capacidade de favorecer a formação do complexo ligante-receptor de maneira mais estável. Este tipo de interação ocorre entre o átomo de hidrogênio e dois ou mais átomos eletronegativos da mesma molécula ou em moléculas diferentes (ROCHA, 2001). Esse tipo de atração é reflexo de um átomo X (podendo ser flúor, oxigênio ou nitrogênio) que apresenta alta eletronegatividade ligado covalentemente ao hidrogênio, denominado de grupo doador. Devido a grande eletronegatividade, o elétron do hidrogênio é fortemente atraído pelo átomo X, desprotegendo o próton do hidrogênio. Deste modo, o próton pode interagir com regiões de

dipolo de outras moléculas ou em sua própria estrutura, denominadas de regiões aceptoras. Já as interações de Van der Waals, são regidas pela interação de grupos químicos apolares. Por outro lado, as interações eletrostáticas, resultam das interações de grupos carregados eletricamente. Assim, o conjunto dessas interações também podem desempenhar um papel importante no processo de ligação (ROCHA, 2001; ISRAELACHVILI, 2011).

De maneira geral esse processo de interação entre o ligante e o receptor é dirigido por uma combinação de efeitos entálpicos e entrópicos. A estimativa desses efeitos pode ser calculada através da energia livre de Gibbs (ΔG_{lig}), (**EQUAÇÃO 1**) (DE MAGALHÃES et al., 2014; GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

$$\Delta G_{\text{lig}} = \Delta H - T\Delta S \quad \text{eq. 1}$$

Onde:

ΔH é a variação de entalpia

T é a temperatura

ΔS é a variação de entropia

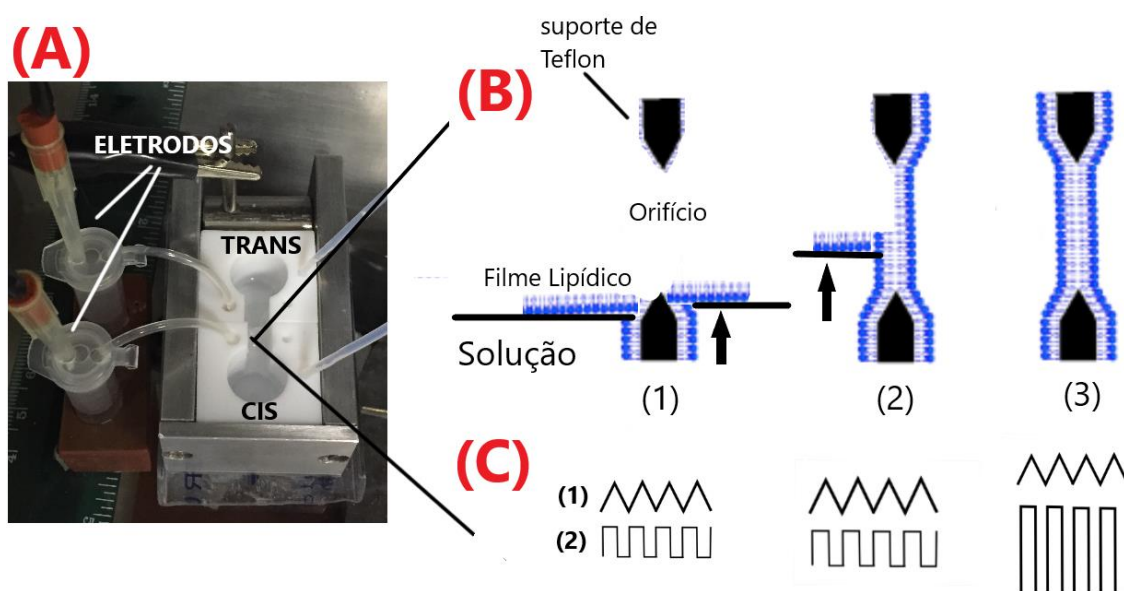
Desta maneira, a compreensão e utilização desses mecanismos de reconhecimento molecular, possibilita a redução de tempo e dos altos custos da bancada experimental, sendo relevante na busca por potenciais substâncias farmacológicas, que interessem as indústrias farmacêuticas (DE MAGALHÃES et al., 2014). Neste contexto, é interessante a utilização dessas ferramentas como suporte para melhor entender os processos de interações moleculares que estão envolvidos na ligação dos compostos organoestânicos e a região de constrição do nanoporo da α -HL.

3 METODOLOGIA

3.1 CONSTRUÇÃO DAS BICAMADAS LIPÍDICAS PLANAS

O processo de confecção de todas as bicamadas lipídicas planas utilizadas foi baseado na adaptação da técnica de MONTAL & MULLER, 1972. Esta técnica fundamenta-se na construção de uma bicamada lipídica por justaposição de dois filmes monomoleculares de lipídeos, num orifício com aproximadamente 100 μm de diâmetro, de uma partição de Teflon[®] que separa dois compartimentos (CIS e TRANS) de uma câmara experimental, também de Teflon[®] (**FIGURA 9**).

FIGURA 9. Representação esquemática da construção da bicamada lipídica.



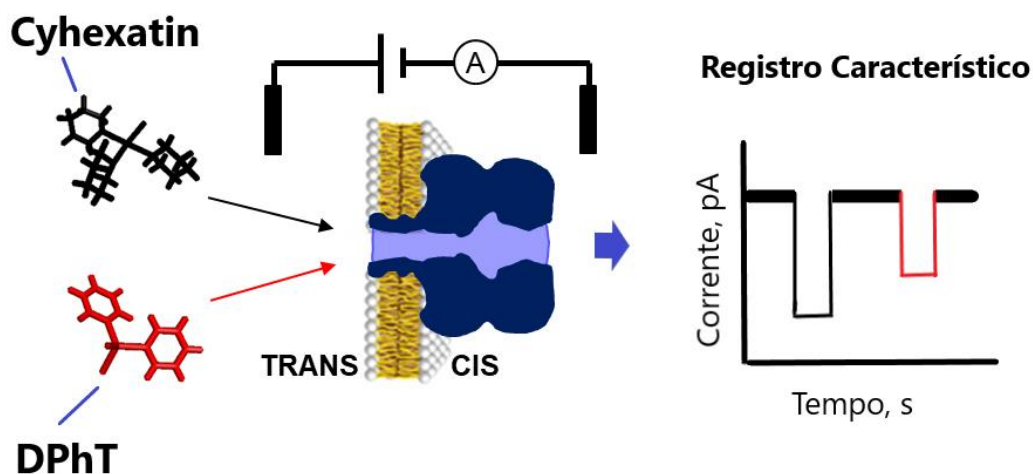
Fonte: Elaborado pelo autor. Foto da câmara de Teflon[®] e esquema representativo do processo para o monitoramento da formação da bicamada lipídica plana. **A)** Câmara de Teflon[®] com indicação dos lados *cis* e *trans*, e eletrodos de conexão da solução aquosa ao sistema eletrônico de monitoramento e aquisição. **B)** Etapas da formação: (1) filmes lipídicos sobre as superfícies das soluções, (2) deposição do segundo filme lipídico e (3) bicamada lipídica plana completamente formada. As setas indicam o sentido da elevação do nível da solução; **C)** etapas do monitoramento da formação da bicamada lipídica: (1) onda triangular aplicada ao sistema e (2) resposta de corrente capacitiva do sistema.

Os filmes monomoleculares de lipídeos foram obtidos a partir da adição de 10 μL de uma solução de lipídeo diftanoil glicerofosfocolina, da Avantis Polar Lipids (USA) 2% (p/v) em hexano (Merck), sobre a solução aquosa (KCl 4 M, TRIS 5 mM, pH 7,5 ajustado com ácido cítrico). Passados 10 minutos, com a evaporação do hexano, ocorre a formação espontânea dos filmes lipídicos na superfície da solução em ambos os compartimentos. Decorrido o tempo

necessário para a evaporação do solvente, o menisco da solução contida no compartimento “TRANS” é elevado por adição de mais solução, formando a primeira monocamada, posteriormente, elevando o lado oposto “CIS” temos a formação da bicamada lipídica. A formação da membrana foi acompanhada baseando-se no aumento dos valores da corrente capacitiva do sistema. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente 25 ± 2 °C.

Após a construção da bicamada lipídica realizamos a incorporação de um único nanoporo da alfatoxina *Calbiochem* (USA), pela adição de 0.2-0.5 μ l da solução estoque contendo α -HL (0,07 mg/ml) no lado “CIS” da membrana, para uma concentração final de ~ 2 ng/ml. Posteriormente, adicionamos os compostos organoestânicos (DPhT ou Cyhexatin), no compartimento “TRANS” da câmara experimental e monitoramos a corrente iônica através do nanoporo em condições de potencial aplicado de ± 200 mV (incrementos de 20 mV). (**FIGURA 10**).

FIGURA 10. Esquema de detecção pela alfatoxina na presença dos diferentes compostos organoestânicos.



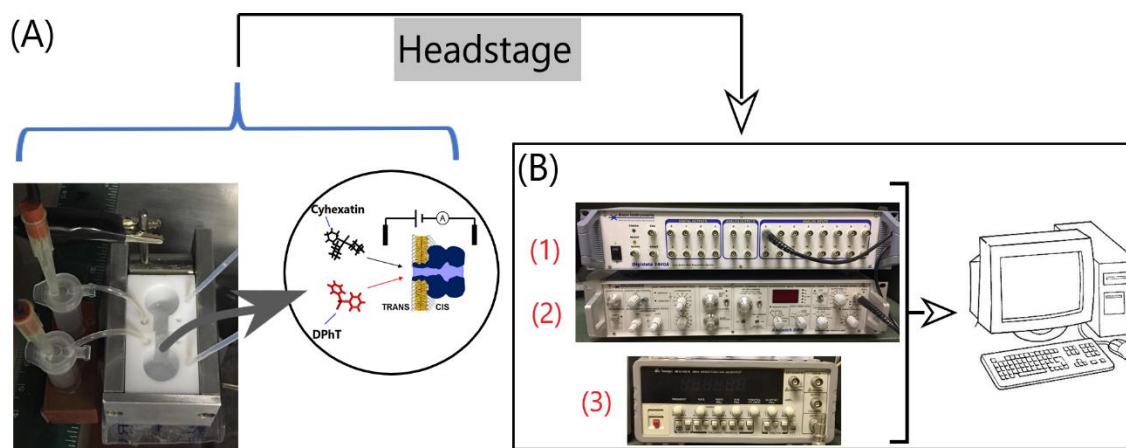
Fonte: Elaborado pelo autor. Configuração experimental do processo de detecção dos compostos OTs. Ao centro da imagem, representação do nanoporo da alfatoxina incorporado em uma bicamada lipídica. A aplicação de um potencial elétrico, gera um fluxo iônico através do nanoporo e consequentemente o carregamento dessas substâncias, que ao entrar em contato com o local de interação do nanoporo provoca bloqueios característicos dos compostos OTs.

3.2 SISTEMA DE MONITORAMENTO E AQUISIÇÃO EM TEMPO REAL

Na realização dos experimentos, o sistema utilizado para aplicação do potencial transmembrana, monitoração e aquisição dos registros foi constituído por um gerador de funções (*Hewlett Packard*, modelo 3310B), um filtro *Butterworth* à 15 kHz (*Frequency devices*, modelo 902), um amplificador de patch clamp (*Axonpatch 200B*, *Molecular devices*, USA) e uma placa conversora analógico-digital (*National Instruments* modelo BNC-2090) acoplada a um microcomputador IBM PC, executando o Programa Data Acquirer, com taxa de aquisição de 100 kHz.

A utilização de uma mesa de amortecimento de alto desempenho (TCM 63-500) e uma gaiola de Faraday, minimiza as interferências geradas por conta das perturbações mecânicas e eletromagnéticas, respectivamente (MONTAL; MUELLER, 1972; AGUIAR et al., 2015). Por fim, para o estabelecimento de uma conexão entre os compartimentos da câmara experimental com os sistemas de medidas elétricas, foi utilizado uma ponte salina do tipo Ágar-KCl (3% em peso de Ágar em KCl 3 M) e eletrodos de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl) (**FIGURA 11**).

FIGURA 11. Sistema de aquisição eletrônica.

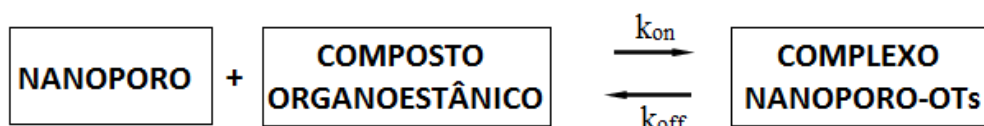


Fonte: Elaborada pelo autor. Aplicação do potencial transmembrana, monitoramento e aquisição dos registros de corrente iônica. A configuração experimental é ligada à interface eletrônica com a utilização de dois eletrodos, sendo um conectado ao terra e o outro ao Headstage do amplificador (A). A aquisição dos dados é obtida a partir da presença de quatro componentes fundamentais, o gerador de função (1), amplificador de patch clamp (2), placa conversora analógico-digital (3) e um microcomputador executando o programa Data Acquirer (B).

3.3 ANÁLISE DE FLUTUAÇÕES DAS CORRENTES IÔNICAS

Todos os parâmetros de assinatura molecular foram analisados utilizando os softwares, Sview e TauHist, para obtenção dos valores de condutância do nanoporo na presença do analito e os tempos médios de residência (τ_{off}) e interbloqueio (τ_{on}), respectivamente. Resumidamente, um histograma de frequência dos tempos no estado bloqueado e não bloqueado do canal é gerado, utilizando o TauHist, onde a τ corresponde a uma exponencial ou gaussiana traçada do histograma. Considerando a reação de interação entre qualquer organoestânico e o nanoporo uma reação bimolecular, informações cinéticas e termodinâmicas dessas interações (**FIGURA 12**), tais como as constantes de associação (K_{on}), de dissociação (K_{off}), de equilíbrio (K_f) do complexo OTs-nanoporo e energia de interação (ΔG) (KRASILNIKOV; RODRIGUES; BEZRUKOV, 2006), podem ser calculadas através das seguintes equações:

FIGURA 12. Esquema da reação de equilíbrio entre o analito e o nanoporo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

$$\text{Constante de associação } k_{on} = 1 / (\tau_{on} \times C_{analito}) \quad \text{Eq. 2}$$

$$\text{Constante de dissociação } k_{off} = 1 / \tau_{off} \quad \text{Eq. 3}$$

$$\text{Constante de formação } k_f = k_{on} / k_{off} \quad \text{Eq. 4}$$

$$\text{Energia de interação aparente } \Delta G \sim KT \ln K_f \quad \text{Eq. 5}$$

Onde:

k_{on} : Constante de associação

k_{off} : Constante de dissociação

k_f : Constante de formação

C : Concentração do analito

τ_{on} : Tempo entre os bloqueios

τ_{off} : Tempo de residência

3.4 DOCAGEM ENTRE OS COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS E A ALFATOXINA

3.4.1 Programas utilizados no presente trabalho incluem:

- Dockthor, plataforma online utilizada nas simulações de *docking* (DE MAGALHÃES et al., 2014);
- Discovery Studio, software utilizado na visualização das estruturas, bem como na identificação das interações entre os organoestânicos e o nanoporo da alfatoxina (*Versão 17.2.0.16349*); (Dassault Systèmes BIOVIA, 2016)

3.4.2 Configuração do Ligante-Receptor

A estrutura da alfatoxina (α -HL), utilizada nesse estudo foi obtido no *Protein Data Bank* (PDB), sob código 7AHL (SONG et al., 1996). Os ligantes Dicloreto difenilestanho (DPhT) e o hidróxido de tricicloexilestanho (Cyhexatin) foram retirados do banco de dados de substâncias químicas *ChemSpider* (*Royal Society of Chemistry-RSC*). As moléculas foram ancoradas em uma área de dimensões 6,5x6,5x6,5 pontos de Grid (cada ponto equivalente a 0,25 Å). A dimensão foi definida visualmente visando cobrir os principais resíduos presentes na constrição da alfatoxina. A escolha da região da constrição é justificada por apresentar o menor diâmetro do nanoporo. Essa região é formada pela presença de sete resíduos de Ácido glutâmico 111, Lisina 147 e Metionina 113, possibilitando desta forma, uma maior interação entre os ligantes (DPhT e Cyhexatin) e a α -HL.

Os parâmetros padrões de docking da plataforma online do DockThor foram utilizados, empregando um algoritmo genético com o número máximo de 1.000.000 de avaliações, com um tamanho de população de 1000 e um total de 30 rodadas. Para a análise do resultado, foi utilizado um RMSD (*Root mean square deviation*) de 2 Å separando os confôrmeros em função da energia de interação ligante-nanoporo.

4 RESULTADOS

4.1 MANUSCRITO: “*Detection of organotin compounds by alpha hemolysin nanopore*”, a ser submetido à revista *RSC Advances* (doi:10.1039/issn.2046-2069) com fator de impacto 3.108.

Please do not adjust margins



RSC Advances

PAPER

Detection of organotin compounds by alpha hemolysin nanopore

A. A. R. Silva,^a J. J. S. Júnior,^a D. C. Machado,^a L. Pol-Fachin,^{b,c} J. P. Aguiar^a and C. G. Rodrigues^{a*}Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

Organotin compounds (OTCs), present in the composition of biocides and PVC-containing materials, stand out in the group of chemicals that pose a risk to the environment. Release of tricyclohexyltin hydroxide (Cyhexatin) and diphenyltin dichloride (DPHT) at high levels are related to serious toxicological problems because they act as endocrine disruptors. Development of techniques for both detection and real time-monitoring of these compounds are of great importance. Thus, the present study shows the ability of nanopore formed by alpha-hemolysin (α HL) of *Staphylococcus aureus* to detect Cyhexatin and DPHT in aqueous solution. The OTCs molecules diffuse through the α HL nanopore and produce changes in the ionic current, exhibiting dwell times and amplitude current characteristic for each organotin. In addition, molecular docking studies were performed in the constriction region of the α HL nanopore suggesting two (Cyhexatin) and three (DPHT) possible binding sites for each OTCs, corroborating with the experimental findings. Finally, the technique using α HL nanopore achieved detection limit at the nanomolar level for both OTCs. The results obtained here can allow a future application of α HL nanopore in real-time monitoring of OTCs in the environment.

Introduction

Environmental pollution has become a major concern worldwide and the impacts caused by human activities have effects on the various ecosystems.¹ Among these activities, the production and use of industrial products containing organotin compounds (OTCs) which are part of the group of chemical substances that pose a risk to the environment.^{2,3} The OTCs have at least one chemical bond between a tin (Sn) with organic groups.⁴ The general chemical formula is $R_{(n)}SnX_{(4-n)}$, where R is an alkyl or aryl group and X is an anionic species (chlorides, hydroxides, oxides, among others).⁵ The application of OTCs-based products largely covers the production of biocides, used in agriculture and marine activity;⁶ as also in the industry for manufacturing polyvinyl chloride (PVC)⁷ and silicones.⁸ The tricyclohexyltin hydroxide (Cyhexatin) (Fig. 1a) and diphenyltin dichloride (DPHT) (Fig. 1b) are among the organotins used for these purposes, respectively.^{9,10} From 1950, the widespread use of these products promoted the elevation of OTCs levels in the environment.⁵ The worry caused by the presence of these substances in the environment, comes from the ability of most triorganotins, such as Cyhexatin, to act as endocrine disruptors, causing disorders in various hormone conversion pathways mediated by enzymes.^{11–13} Due to its toxic effects, the Cyhexatin had its use restricted by regulatory agencies.¹⁴ In 2009, the

Brazil National Health Surveillance Agency (ANVISA) banned its use and commercialization. The USA, China and Europe also banned the use of Cyhexatin.¹⁵ Although there are no restrictions about use of DPHT, studies clearly show that PVC-based materials may undergo leached and release DPHT in the environment, contaminating drinking water, and consequently, contributing to human exposure.¹⁶ The proven toxic effects of OTCs have led to the withdrawal of these compounds from the composition of the biocides, as well as the establishment of environmental quality standards, proposing a maximum limit for organotin residues present in water between $0.0002 \mu\text{g/L}^{-1}$ and $0.0015 \mu\text{g/L}^{-1}$, estimated by the European Union (EU).¹⁷ Given the need to control the levels of these elements based on values established and recommended by the environmental control agencies, it has emerged the perspective for the development of platforms that allow the detection of OTCs at the levels mentioned above.¹⁷ The analytical techniques based on the use of gas chromatography (GC) or liquid chromatography (HPLC), coupled to a detection system, allow the identification of these substances in the environment from several matrices.^{18–21} However, some problems make it difficult to apply these techniques routinely: (1) high operating costs, (2) lack of detection limits close to what is required by regulatory agencies for liquid samples and (3) exhaustive derivatization steps.^{17–22} Biosensors based on nanometric pores are gaining prominence in this scenario, particularly due to ability of these structures to detect, identify and characterize molecules.^{23,24} The nanopore formed by the alpha-hemolysin (α HL) from *Staphylococcus aureus* inserted in planar lipid bilayer (Fig. 1c), has become a biosensing platform with great importance in this type of approach, allowing the investigation of the single molecules properties in aqueous solution, without destroying them and providing very low detection limits.^{25,26} The OTCs

^a Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Avenida prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil. E-mail: cgrufpe@gmail.com; Fax: +55 81 2126 8560; Tel: +55 81 2126 8535

^b Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco, 50740-560, Recife, PE, Brazil.

^c Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, 50740-465, Recife, PE, Brazil.

See DOI: 10.1039/x0xx00000x

Please do not adjust margins

Please do not adjust margins

ARTICLE

Journal Name

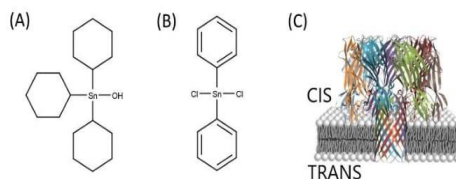


Fig. 1 Chemical structures of organotin compounds and alpha-hemolysin nanopore (α HL). (A) Tricyclohexyltin hydroxide (Cyhexatin); (B) Diphenyltin dichloride (DPHT); (C) Representative structure of α HL nanopore in planar lipid bilayer.

molecules in electrolytic solution diffuse through the lumen of the nanopore, causing transient changes (blockages) in the maximum ionic current flowing through the α HL nanopore. The analysis of the amplitudes as well as the dwell times of these blockages reveals the individual characteristics of each organotin allowing its identification.²⁷⁻²⁹ Given the importance of monitoring Cyhexatin and DPHT in the environment, coupled with the small number of studies that provide alternative techniques to detect these substances at the stipulated levels, the present work aims to identify and detect very low levels of two OTCs compounds in aqueous medium by the stochastic biosensing with the α HL nanopore.

Experimental

Chemicals and OTCs stock solutions

The wild type *S. aureus* alpha-hemolysin was purchased from Calbiochem (Madison, WI, USA). 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). The analytical standards of tricyclohexyltin hydroxide (Cyhexatin) and diphenyltin dichloride (DPHT) (>99 %) were purchased from SIGMA (St. Louis, MO, USA). Methanol was obtained from J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). High-purity water was obtained through a Milli-Q Plus purification system (Billerica, USA). 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris) and citric acid were from Fluka (Buchs, Switzerland). Potassium chloride (KCl) and Dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from SIGMA (St. Louis, MO, USA). Hexane was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The stock solutions were prepared dissolving the Cyhexatin in methanol and DPHT in DMSO at concentrations of 0.3 and 1 mM, respectively. The standard working solutions were prepared by appropriate dilution from stock solution.

Single nanopore insertion in planar lipid bilayer and data analysis

The preparation process of the planar lipid bilayer has been reported previously,³⁰ where the bilayer was formed by the lipid monolayer apposition technique (Montal & Mueller, 1972). In all experiments, the lipid used was DPhPC. After membrane formation, ~0.5 μ l of α HL stock solution (0.07 mg/ml) was added to the bath solution in *cis* side of the experimental chamber to promote the incorporation of a single nanopore. The bath solution was composed of 4 M KCl, 5 mM Tris-acid citric buffer (pH 7.5) as previously described.³¹ Then, with the nanopore

incorporated in lipid membrane, organotin compounds were added to the bath solution to the *trans* side. All experiments were performed at room temperature (25 ± 1 °C) 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. Currents were filtered by a low-pass eight-pole Bessel filter at 15 kHz (Model 9002; Frequency Devices, Haverhill, MA) and directly saved into computer memory with a sampling frequency of 100 kHz. All stages of data analysis for molecular signature parameters have been described in our previous studies.^{31,32,41}

Molecular docking studies

The heptameric structure of α HL nanopore was retrieved from PDB ID 7AHL.³³ Cyhexatin and DPHT were obtained from ChemSpider[®] chemical database (Royal Society of Chemistry-RSC), while their 3D structures were constructed using Avogadro software. The molecular docking calculations were performed in the constriction region of the α HL nanopore, using DockThor online portal, with the standard program docking parameters.³⁴ Using its in-built genetic algorithm, the atomic coordinates of the lowest energy OTCs conformations were clustered based in a root-mean-squared-deviation (RMSD) of 2.0 Å. All the output conformations that presented favorable interaction energies with α HL nanopore were organized in order of increasing energy. The lowest energy docked conformations were retrieved for further analysis. Subsequently, based on the "Solvent Extractor" tool in "Voss Volume Volexator" website,³⁵ volume analyses were performed. Such data was obtained aiming to correlate the space occupied by the OTCs and the residual current observed from single-nanopore experiments. For this purpose, an outer probe radius of 10 and an inner probe radius of 2 were employed.

Results and discussion

Influence of organotins at α -HL nanopore relative conductance

The individual α HL nanopore was inserted into a planar lipid bilayer which separates the experimental chamber in two sides called *Cis* and *Trans*. Both the sides contained electrolyte solution described above (in experimental section). Electric potential was applied, flowing an ionic current through the α HL nanopore. In the absence of organotins, the maximum conductance of the nanopore was ~4 nS, as already reported by previous work.³¹ However, the addition of one of the compounds (Cyhexatin or DPHT) on the *Trans* side caused ionic current blockages characteristic for each organotin. Similar studies have demonstrated the ability of the platform formed by α HL nanopore to detect volatile DNA-bound pesticides,³⁶ as well as small organic molecules such as organophosphorus chemical agents.^{37,38} In order to evaluate the influence of transmembrane potential on the partitioning of OTC inside nanopore the relative conductance was calculated. The relative conductance allows to estimate the partitioning of the analytes in the nanopore.^{41,42} We observed voltage dependence on

Please do not adjust margins

Please do not adjust margins

Journal Name

ARTICLE

relative conductance of the α HL nanopore in presence of OTCs (Fig. 2). Both OTCs cause a significant decrease in nanopore conductance from 140 mV. Under the conditions adopted in here, there was a reduction of $9.4 \pm 0.14\%$ for Cyhexatin and $18 \pm 1.76\%$ for DPhT. Furthermore, the relative conductance data indicate that the transmembrane potential which provide ideal conditions for detection of OTCs are 140 to 160 mV. These findings suggest that organotins exhibit positive net charge, which can be justified by dissociation of the anions under the conditions adopted, as previous studies have shown.⁴³

Current blockages: amplitude and characteristic times analysis

The ionic current recordings of the OTCs allowed us to observe differences in the amplitudes of the blockages in the ionic current of both compounds. We used the residual current (I_R) analysis,^{25,28} to distinguish the amplitudes of both compounds (Fig. 3a and b). This analysis was established as a percentage of the ratio of the values of the current amplitude produced by the blockage (I) and the current of the fully opened nanopore (I_0): $I_R = (I/I_0) \times 100$. Blockages in the ionic current events of the Cyhexatin possess two levels of the amplitude (I_1 and I_2) basically. The residual current (I/I_0) to each level was: $I_1 = 31 \pm 0.04\%$ and $I_2 = 17 \pm 0.1\%$. We also observed transitions from level I_1 to a deeper blockage current ($I_{1'}$) level with residual current of $I_1 = 8 \pm 1.4\%$ (Fig. 3a). DPhT presented three levels of current amplitude: $I_1 = 83 \pm 0.18\%$; $I_2 = 53 \pm 0.2\%$ and $I_3 = 22 \pm 0.04\%$. Likewise to Cyhexatin, the DPhT also exhibits a deeper blockage level ($I_{3'}$) associated to level I_3 with residual current of $I_3 = 6 \pm 0.04\%$ (Fig. 3b). As could be observed, the current residual values of the two compounds are different from each other, allowing to distinguish them. The presence of several current amplitude levels to both OTCs may be explained by ratio OTC diameter/ α HL lumen diameter.^{23,40} As the diameter of the OTC molecule is much smaller than the diameter of the α HL nanopore, probably, may occur two situations: 1) the molecule

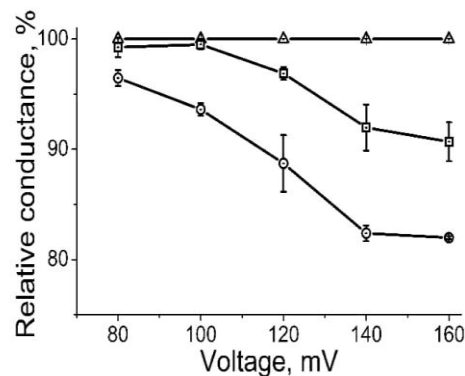


Fig. 2 Effects of organotin compounds in conductance of the α HL nanopore. Conductance of the nanopore in the absence of the compounds is considered 100% (Control). In the presence of one of the OTCs, the nanopore conductance is altered according to the type of organotin. The conductance of the nanopore in the presence of organotin compounds was relativized the control condition. (Δ) Control; ($\square$) Cyhexatin; ($\circ$) DPhT. Data are a mean $\pm$ SD of three experiments.

"find space" to diffuse through nanopore in different conformations; 2) more than one molecule translocate through nanopore at the same time. An attempt to restrict diameter of the α HL lumen, and thus reduce the number of current levels that an analyte may present, is to use molecular adapters such as β -cyclodextrin.⁴⁰ The β -cyclodextrin is very employed in the detection of small organic molecules by α HL nanopore, and its use improves the nanopore sensitivity.⁴⁰ In addition, we also obtained the characteristic time between successive blockages (τ_{on}) in the ionic current through nanopore and dwell time (τ_{off}) of OTCs inside the nanopore. τ_{on} is characterized as the mean time between the blockages and its value is associated to frequency of blockages events.^{37,39} In Fig. 4 can be seen that the values of τ_{on} for the OTCs possess dependence on applied transmembrane voltage, exhibited low values at high voltages.

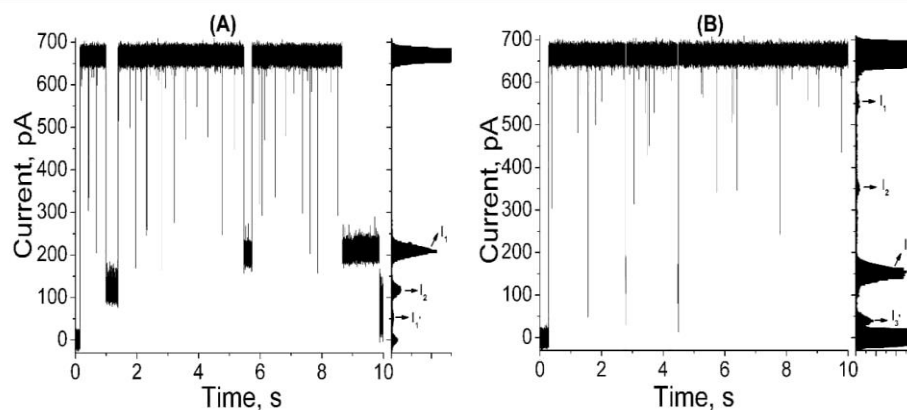


Fig. 3 Effects of the organotin compounds in the ionic current through α HL nanopore. (A) The ionic current through α HL nanopore in the presence of $1 \mu\text{M}$ of Cyhexatin. I_1 , I_2 and $I_{1'}$ indicate the ionic current amplitude levels represented by all-point histograms. (B) The ionic current through α HL nanopore in the presence of $1 \mu\text{M}$ of DPhT. I_1 , I_2 , I_3 and $I_{3'}$ indicate the current amplitude levels represented by all-point histograms. The compounds were added on the Trans side in 4 M KCl solution and transmembrane potential applied was 160 mV. Time resolution of 0.01 ms.

Please do not adjust margins

Please do not adjust margins

ARTICLE

Journal Name

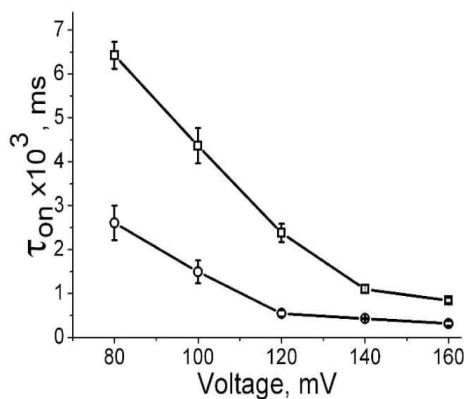


Fig. 4 Effects of organotin compounds on τ_{on} . The OTCs were added on the *Trans* side at concentrations 1 μ M of Cyhexatin ($\square$) and 50 μ M of DPhT ($\circ$). Data are a mean $\pm$ SD of three experiments.

This observation corroborates with the relative conductance data. The τ_{on} also has dependence on the type of organotin and transmembrane potential, for example, at 160 mV Cyhexatin has $\tau_{on} = 838.00 \pm 62.00$ ms and DPhT has $\tau_{on} = 315.83 \pm 55.63$ ms. Similarly, to the analysis of current blockage amplitudes to identify OTCs, dwell time (τ_{off}) also plays a key role in this premise.³⁹ Statistically, this parameter obeys an exponential distribution function of the time duration of the current blockage events, as previous studies have shown.³² To both OTCs, we observed the absence of current blockage events at negative voltages as well as a low frequency at positive voltages below 80 mV (Data not shown). On account of this, were obtained values of τ_{off} at high positive voltages only. For both OTCs, the analysis of dwell times of the blockage events indicated the presence of three populations of time duration: (1) short (τ_{off1}), intermediate (τ_{off2}) and long (τ_{off3}) (Fig. 5a and b). The Cyhexatin presented values of τ_{off1} , τ_{off2} and τ_{off3} were $\sim$

200 μ s, $\sim$ 3.8 ms and $\sim$ 2600 ms, respectively (Fig. 5a). For the DPhT the values were $\sim$ 60 μ s, $\sim$ 400 μ s and $\sim$ 2.2 ms, respectively (Fig. 5b). The data presented by τ_{off2} and τ_{off3} of Cyhexatin (Fig. 5a) showed voltage dependence, indicating a higher affinity of the molecules of Cyhexatin with the nanopore lumen at high voltages. However, we could not establish a correlation pattern between the levels of current blockage amplitude and the τ_{off} of Cyhexatin. Unlike of Cyhexatin, DPhT showed a slight voltage dependence only for τ_{off3} . Another particularity observed was a probably correlation of the levels of current blockage amplitude with the dwell times populations of the DPhT (Fig. 5b). In this way, we propose that the current blockages framed in the population profile of τ_{off1} represent in the great majority the level I_1 of current amplitude, characterized by short and fast blockages. For presenting an intermediate profile both in its current amplitude and dwell time, the blockages from population τ_{off2} represent the level I_2 . And the blockages from population τ_{off3} represent the levels I_3 and I_3' , with the predominance of great current amplitude and long dwell time.

Sensitivity of the nanopore sensor

The sensitivity of the nanopore was evaluated by calculating the frequency of events ($1/\tau_{on}$) as a function of organotin compounds concentration.^{37,41,44} For this parameter, we observed a linear behavior for Cyhexatin and DPhT, providing a basis for quantification of these compounds. The value of sensitivity of the nanopore based method were of 0.15 ± 0.02 nM S^{-1} and 0.14 ± 0.01 nM S^{-1} for Cyhexatin and DPhT, respectively. The detection limits obtained for Cyhexatin and DPhT were 0.005 nM (i.e., 0.001 μ g/L) and 0.01 nM (i.e., 0.003 μ g/L), respectively (Fig. 6). Detection limit values obtained for detection of DPhT in previous studies using gas chromatographed mass spectrometry (GC-MS) were close to our values.⁴⁵ However, for Cyhexatin, the α HL nanopore sensor

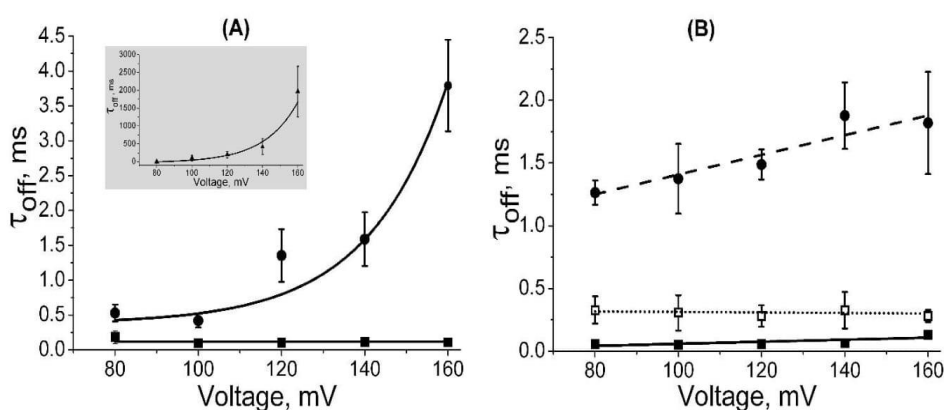


Fig. 5 Voltage dependence of the residence time of organotin compounds inside α HL nanopore. (A) Dwell time of Cyhexatin inside nanopore: (■) Short duration; (●) Intermediate duration and (▲) Long duration (insert). (B) Dwell time of DPhT inside nanopore: (■) Short duration; (□) Intermediate duration and (●) long duration. Data are a mean $\pm$ SD of three experiments.

Please do not adjust margins

Please do not adjust margins

Journal Name

ARTICLE

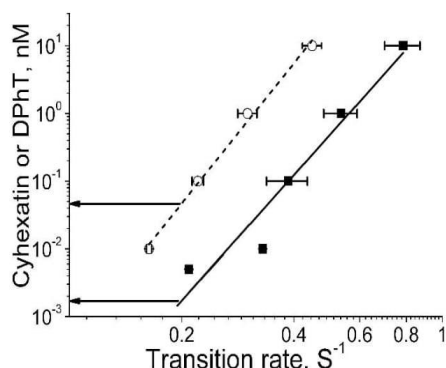


Fig. 6 Detection limits of the organotin compounds. The arrows indicate the detection limit to Cyhexatin (■) and DPhT (○). The bath solution was composed of 4 M KCl and 5 mM Tris-acid citric buffer (pH 7.5). Organotin compounds were added in *Trans* side of the nanopore. Transmembrane potential applied was of 140 mV. Data are a mean $\pm$ SD of three experiments.

of proved to be a sensitive tool, since it was possible to obtain a low detection limit, including lower than the detection limit values obtained in studies^{46,47} which used the GC-MS technique for the detection of this compound.

Organotin docking in α HL nanopore constriction

Studies at the atomic level have become a reality for several areas.⁴⁸ One of the tools used in these studies is the molecular docking. This tool allows to obtain information about the interactions and possible conformations of small molecules at protein binding sites.^{49,50} The use of this technique to predict the position and orientation of molecules on the surface of the α HL nanopore has already been reported.⁴² It is assumed that

the α HL nanopore constriction (region of smaller diameter) is the region where the greater interaction between analytes and nanopore occurs.^{29,34} Thus, we performed the docking calculations between OTCs and α HL nanopore constriction using the DockThor program.³⁵ The data showed that DPhT and Cyhexatin may have up to three and two types of conformers interacting with amino acid residues from the constriction region, respectively. Moreover, the main interactions between the nanopore and the OTC molecules are different between DPhT and Cyhexatin. Thus, Cation- π interactions predominate between DPhT and α HL amino groups of Lys147. Conversely, hydrogen bonds between Cyhexatin and the amino group of Lys147 and carboxylic acid of Glu111 may be observed, allied to hydrophobic interaction between the methyl group of Met113 and Cyhexatin cyclohexane groups. The different amount and types of interactions observed may explain the greater dwell time for the Cyhexatin molecule when compared to DPhT. In this context, the higher availability of regions susceptible to form hydrogen bonds and hydrophobic interactions provide stronger forces of interaction for Cyhexatin than DPhT to bind α HL constriction region. Experimental findings suggest that each current block level depicts the passage of one or more molecules simultaneously. On the other hand, the docking analysis suggest, as the responsible for each level, the possibility of forming three different conformers for the DPhT (Fig. 7d-f) and two for the Cyhexatin (Fig. 7g and h). According to docking data, each conformer blocks presented residual current in 67%, 24% and 6%, respectively (table 1). These values corroborate with the experimental findings where the DPhT exhibits three levels of current amplitudes (Fig. 3a). Occasionally, also it was observed the presence of a sub-level by the third level, which suggests the hypothesis of the passage of a fourth conformer in a more central form. Cyhexatin showed residual current values

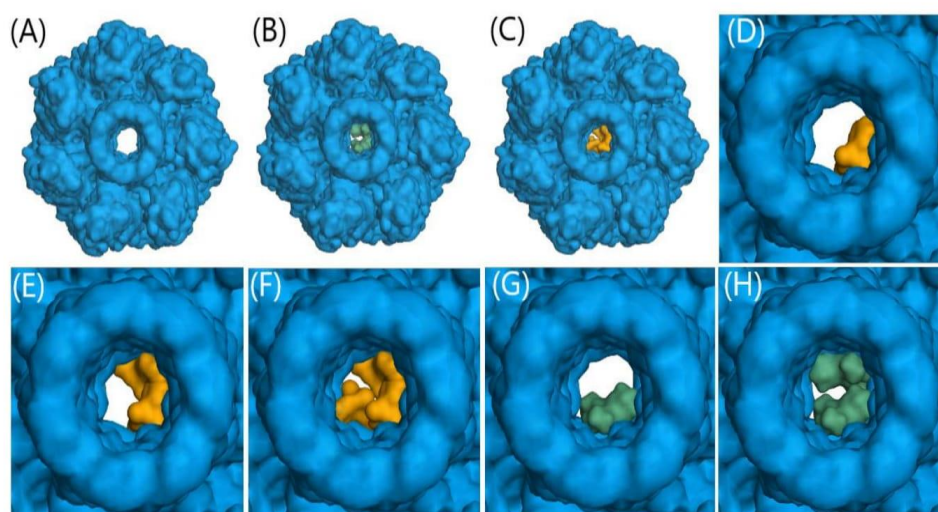


Fig. 7 Docking simulations between OTCs and α HL nanopore constriction. Panorama of α HL nanopore view from the *Trans* side in absence (A) and presence the conformers of Cyhexatin (B) or DPhT in constriction of nanopore (C). From the data obtained of DockThor, it was proposed that blockages profiles in the presence of DPhT can be represented by three possibilities: passing one, two or three molecules (D-F). For the Cyhexatin, we propose passage of one or two molecules through Ahl (G-H).

Please do not adjust margins

Please do not adjust margins

ARTICLE

Journal Name

Table 1 α HL constriction region volume as a function of DPhT and cyhexatin interaction.

Nanopore occupancy	Volume ($\text{\AA}^3$) ^a	% (I/I_0)
Empty	759	-
One	508	67%
Two	178	24%
Three	43	6%
One	437	58%
Two	51	7%

^aThe α HL residues 110-113 and 146-148 were considered for this analysis.

of 58% and 7% (table 1). These values suggest that the levels observed in experimentally (Fig. 3b), refers to the translocation of single conformer (Fig. 7g) with values of $I_1 = 31 \pm 0.04\%$ or $I_2 = 17 \pm 0.1\%$. This variation may be related to trans-side input conformation. Already the sub-level often observed, may be correlated to passage of two molecules (Fig. 7h), causing nearly total blockage of the current.

Conclusions

In this work, two approaches (experimental and theoretical) were used to analyze the ability of the α HL nanopore at the interaction and detection of organotin compounds, specifically the Cyhexatin and the DPhT. Experimentally were determined the time interval between blockages (τ_{on}) and dwell time (τ_{off}) of these compounds in the inside nanopore. The τ_{on} presented voltage dependence with lower time values at high voltage, in this way it was possible to evidence the presence of residual charge in the molecules under the adopted conditions. The τ_{off} values allowed to identify the presence of three characteristic times: short, intermediate and long for both compounds; and may be correlated with the blockage amplitude of the compounds. Theoretically, we proposed the interaction mechanism of the organotin compounds with the narrowest region of the nanopore through molecular docking simulations. It was shown that the characteristic times (τ_{on} and τ_{off}) differ between the compounds, as well as, the profiles of current amplitude level. These differences are due to three types of interactions (cation- π , hydrogen bonds and hydrophobic interactions) these compounds with groups in the nanopore constriction. The data presented here demonstrate that the α HL nanopore can be used as a stochastic biosensor for organotin compounds in aqueous environment.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

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).

Notes and references

- D. C. Vieira, J. A. Noldin, F. C. Deschamps and C. Resgalla Jr, *Chemosphere*, 2016, 162, 48-54.
- A. F. L. Godoi, R. Favoreto and M. Santiago-Silva, *Quim. Nova*, 2003, 26, 708-716.
- C. J. Sinclair and A. B. A. Boxall, *Environ. Sci. Technol.*, 2003, 37, 4617-4625.
- A. C. A. Sousa, M. R. Pastorinho, S. Takahashi and S. Tanabe, *Environ. Chem. Lett.*, 2014, 12, 117-137.
- M. Hoch, *Applied Geochemistry*, 2001, 16, 719-743.
- M. Choi, H. B. Moon, J. Yu, J. Y. Eom and H. G. Choi, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2009, 57, 77-85.
- M. Trummer, D. Solenthaler, P. Smith and W. Caseri, *RSC Advances*, 2011, 1, 823-833.
- R. C. Oliveira and R. E. Santelli, *Talanta*, 2010, 82, 9-24.
- S. C. Hoyt, P. H. Westigard and B. A. Croft, *J. Econ. Entomol.*, 1985, 78, 656-659.
- G. Ayrey, F. P. Man and R. C. Poller, *European Polymer Journal*, 1981, 17, 45-48.
- M. Li, C. Cao, S. Li, W. Gui and G. Zhu, *Environ. Toxicol. and Pharm.*, 2016, 43, 61-67.
- I. B. Castro, M. Rossato and G. Fillmann, *Environ. Toxicol. and Chem.*, 2012, 31, 947-954.
- E. Oberdorster and P. McClellan-Green, *Marine Environ. Resear.*, 2002, 54, 715-718.
- T. J. Woodruff, A. D. Kyle and F. Y. Bois, *Environ. Health Perspect.*, 1994, 102, 1088-1096.
- W. Gui, C. Tian, Q. Sun, S. Li, W. Zhang, J. Tang and G. Zhu, *Water Research*, 2016, 95, 185-194.
- A. I. Sadiki, D. T. Williams, R. Carrier and B. Thomas, *Chemosphere*, 1996, 32, 2389-2398.
- R. F. Cole, G. A. Mills, R. Parker, T. Bolam, A. Bichenough, S. Kroger and G. R. Fones, *Trends in Environ. Anal. Chem.*, 2015, 8, 1-11.
- S. Noventa, J. Barbaro, M. Formalewicz, C. Gion, F. Rampazzo, R. B. Brusà, M. Gabellini and D. Berto, *Analy. Chimica Acta*, 2015, 858, 66-73.
- C. Moscoso-Pérez, V. Fernández-González, J. Moreda-Pineiro, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo and D. Prada-Rodríguez, *Journal of chromatography A*, 2015, 1385, 85-93.
- Y. N. Ma, W. J. Gui and G. N. Zhu, *Anal. Methods*, 2015, 7, 2108.
- M. Abalos, J. M. Bayona, R. Companó, M. Granados, C. Leal and M. D. Prat, *Journal of Chromatography A*, 1997, 788, 1-49.
- R. Morabito, P. Massanisso and P. Quevauviller, *Trends in analytical Chem.*, 2000, 19, 113-119.
- J. P. Aguiar, J. J. S. Júnior, D. C. Machado, M. A. C. Melo and C. G. Rodrigues, *Quim. Nova*, 2015, 38, 817-827.
- H. Bayley and P. S. Cremer, *Nature*, 2001, 413, 226-230.
- J. W. F. Robertson, C. G. Rodrigues, V. M. Stanford, K. A. Robinson, O. V. Krasilnikov and J. J. Kasianowicz, *PNAS*, 2007, 104, 8207-8211.
- G. Wang, L. Wang, Y. Han, S. Zhou and X. Guan, *Accounts of chemical research*, 2013, 46, 2867-2877.
- X. Guan, L. Q. Gu, S. Cheley, O. Braha and H. Bayley, *ChemBioChem*, 2005, 6, 1875-1881.

Please do not adjust margins

Please do not adjust margins

Journal Name

ARTICLE

- 28 R. T. Perera, A. M. Fleming, R. P. Johnson, C. J. Burrows and H. S. White, *Nanotechnology*, 2015, 26, 074002.
- 29 T. Zeng, L. Liu, T. Li, Y. Li, J. Gao, Y. Zhao and H. C. Wu, *Chem. Sci.* 2015, 6, 5628.
- 30 M. Montal and P. Mueller, *Proc. Natl. A Sci.*, 1972, 69, 3561-3566.
- 31 C. G. Rodrigues, D. C. Machado, A. M. B. Da Silva, J. J. S. Júnior and O. V. Krasilnikov, *Biophys. J.*, 2011, 100, 2929-2935.
- 32 O. V. Krasilnikov, C. G. Rodrigues and S. M. Bezrukov, *Physical Review Letters*, 2006, 97, 018301.
- 33 L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley and J. E. Gouaux, *Science*, 1996, 274, 1859-1866.
- 34 C. S. Magalhães, D. M. Almeida, H. J. C. Barbosa and L. E. Dardenne, *Information Sciences*, 2014, 289, 206-224.
- 35 N. R. Voss and M. Gerstein, *Nucleic Acids Research*, 2010, 38, 555-562.
- 36 A. Nobukawa, T. Osaki, T. Tonooka, Y. Morimoto and S. Takeuchi, *Proc. of the IEEE*, 2015, 1, 596-599.
- 37 D. Wang, Q. Zhao, R. S. S. Zoysa and X. Guan, *Sensors and Actuators B*, 2009, 139, 440-446.
- 38 J. Gupta, Q. Zhao, G. Wang, X. Kang and X. Guan, *Sensors and Actuators B*, 2013, 176, 625-631.
- 39 Y. X. Hu, Y. L. Ying, Z. Gu, C. Cao, B. Y. Yan, H. F. Wang and Y. T. Long, *Chem. Commun.*, 2016, 52, 5542-5545.
- 40 L. Q. Gu, O. Braha, S. Conlan, S. Cheley and H. Bayley, *Nature*, 1999, 398, 686-690.
- 41 D. C. Machado, J. J. S. Júnior, M. C. A. Melo, A. M. B. Silva, A. Fontes and C. G. Rodrigues, *RSC Adv.*, 2016, 6, 56647-56655.
- 42 M. C. A. Melo, L. R. Teixeira, L. Pol-Fachin and C. G. Rodrigues, *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 363.
- 43 P. M. Samuel, S. Roy, K. A. Jaiswal and J. V. Rao, *J. Appl. Toxicol.*, 1998, 18, 383-386.
- 44 D. R. Trévenot, K. Toth, R. A. Durst and G. S. Wilson, *Biosensors & Bioelectronics*, 2001, 16, 121-131.
- 45 J. M. Gao, Y. Zhang, J. S. Guo, F. Jin and K. Zhang, *Enviro. Monito. And Asse.*, 2012, 185, 3831-3837.
- 46 J. A. Stab, M. J. M. Rozing, B. Van Hattum and W. P. Cofino, *Journal of Chromato.*, 1992, 609, 195-203.
- 47 J. A. Stab, W. P. Cofino, B. Van Hattum and U. A. T. Brinkman, *Fresenius J. Ana. Chem.* 1993, 347, 247-255.
- 48 L. G. Ferreira, R. N. Santos, G. Oliva and A. D. Andricopulo, *Molecules*, 2015, 20, 13384-13421.
- 49 I. A. Guedes, C. S. Magalhães and L. E. Dardenne, *Biophys Rev*, 2014, 6, 75-87.
- 50 C. Gumy, C. Chandsawangbhuwana, A. A. Dzyakanchuk, D. V. Kratschmar, M. E. Baker and A. Odermatt, *PLOS ONE*, 2008, 3, e3545.

Please do not adjust margins

5 CONCLUSÕES

- O nanoporo da alfatoxina é capaz de detectar os compostos organoestânicos Cyhexatin e DPhT em meio aquoso;
- Os tempos de residência no interior do nanoporo diferem entre os compostos, bem como, os perfis de mudança na corrente iônica;
- A técnica do nanoporo-sensor alcançou limite de detecção em concentrações nanomolares para ambos os compostos;
- Forças intermoleculares do tipo Cation-Pi, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio estão envolvidas na interação entre os resíduos da constrição da alfatoxina e os compostos OTs;

6 PERSPECTIVAS

- Utilização de adaptadores moleculares para aumentar a sensibilidade da técnica;
- Testar novos compostos organoestânicos para ampliar o nosso banco de dados;
- Analisar amostras ambientais.

REFERÊNCIAS

- ABALOS, M. et al. Analytical procedures for the determination of organotin compounds in sediment and biota: a critical review. **Journal of Chromatography A**, v. 788, n. 1–2, p. 1–49, 1997.
- AGUIAR, J. P. et al. Biossensoriamento estocástico via nanoporo proteico individual no desenvolvimento de ferramentas analíticas. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 817–827, 2015.
- ANASTASIOU, T. I. et al. Imposex and organotin compounds in ports of the Mediterranean and the Atlantic: Is the story over? **Science of The Total Environment**, v. 569–570, p. 1315–1329, 2016.
- ANDRADE, D. J. D. E. et al. Compatibilidade entre acaricidas e fertilizantes foliares em função de diferentes águas no controle do ácaro da leprose dos citros *brevipalpus phoenicis*. **Revista Brasileira De Fruticultura**, v. 35, n. 1, p. 39–50, 2012.
- ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61–72, 2007.
- BAYLEY, H.; CREMER, P. S. Stochastic sensors inspired by biology. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 226–230, 2001.
- CALIL, S. S.; ROBERTO, P. Biossensores : estrutura , funcionamento e aplicabilidade. p. 1–20, 2011
- CASSAL, V. B. et al. Agrotóxicos: Uma Revisão De Suas Consequências Para a Saúde Pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 437–445, 2014.
- CASTRO, Í. B.; ROSSATO, M.; FILLMANN, G. Imposex reduction and residual butyltin contamination in southern Brazilian harbors. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 5, p. 947–954, 2012.
- CASTRO, Í. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: Novos biocidas no ambiente aquático. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1021–1031, 2011.
- CLARKE, J. et al. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. **Nature nanotechnology**, v. 4, n. April, p. 265–270, 2009.
- CREMONESE, C. et al. Occupational exposure to pesticides, reproductive hormone levels and sperm quality in young Brazilian men. **Reproductive Toxicology**, v. 67, p. 174–185, 2017.
- DE ANDRADE, D. J. et al. Acaricidas used in conventional and organic citrus orchard: leprosis and phytoseiid mites population control. **Revista Brasileira De Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1028–1037, 2010.

DE CARVALHO OLIVEIRA, R.; SANTELLI, R. E. Occurrence and chemical speciation analysis of organotin compounds in the environment: A review. **Talanta**, v. 82, n. 1, p. 9–24, 2010.

DE MAGALHÃES, C. S. Algoritmos genéticos para o problema de docking proteína-ligante. **Tese (doutorado em modelagem computacional)- Laboratório nacional de computação científica, Petrópolis-RJ**, 2006.

DE MAGALHÃES, C. S. et al. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. **Information Sciences**, v. 289, n. 1, p. 206–224, 2014.

DESPAIGNE, A. A. R. et al. Organotin(IV) Complexes with 2-acetylpyridine benzoyl hydrazones: Antimicrobial activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 7, p. 1247–1257, 2010.

DIAS, A. K. C. Efeito inibitório de compostos organoestânicos sobre fungos isolados de câmaras de maturação. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul. RS**, 2005.

FERNANDES, S. S.; DIACENCO, A. A. Origem do pvc e seu processo de transformação. **Revista Científica da FEPI - Edição Interdisciplinar**, v. 1, n. 1, 2015.

FERREIRA, J. V. R. et al. Pesticidas aplicados na lavoura e o risco à saúde pública: uma revisão da literatura. **Cadernos UniFOA**, v. 9, n. 24, p. 85–94, 2014.

FERREIRA, L. et al. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. In: **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 2015.

FISCHER, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. **Berichte Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 27, n. 6, p. 2984–2993, 1894.

FREY, M. et al. Fouling around: vessel sea-chests as a vector for the introduction and spread of aquatic invasive species. **Management of Biological Invasions**, v. 5, n. 1, p. 21–30, 2014.

GABRIELSKA, J. et al. Different effects of di- and triphenyltin compounds on lipid bilayer dithionite permeabilization. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 55, n. 9–10, p. 758–763, 2000.

GAO, J. M. et al. Occurrence of organotin compounds in river sediments under the dynamic water level conditions in the Three Gorges Reservoir Area, China. **Environmental science and pollution research international**, v. 22, n. 11, p. 8375–8385, 2015.

GEDDES, W. C. Mechanism of PVC Degradation. **Rubber Chemistry and Technology**, v. 40, n. 1, p. 177–216, 1967.

GODOI, A. F. L.; FAVORETO, R.; SANTIAGO-SILVA, M. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 708–716, 2003.

GODOY, R. C. B.; OLIVEIRA, M. I. Agrotóxicos no Brasil: Processo de registro, riscos à saúde e programas de monitoramento. **Embrapa**, v. 1, 2004.

GOLDBERG, E. D. Tributyltin: case study of an environmental contaminant. **Marine Pollution Bulletin**, v. 34, n. 4, p. 280, 1997.

GOMES, I. R. Difusão do agronegócio e novas dinâmicas territoriais. **Terra livre**, v. 2, n. 33, p. 47–66, 2009.

GRACELI, J. B. et al. Organotins: A review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. **Reproductive Toxicology**, v. 36, p. 40–52, 2013.

GRAY, G. S.; KEHOE, M. Primary sequence of the alpha-toxin gene from *Staphylococcus aureus* wood 46. **Infection and immunity**, v. 46, n. 2, p. 615–8, 1984.

GRÜN, F.; BLUMBERG, B. Environmental obesogens: Organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. **Endocrinology**, v. 147, n. 6, 2006.

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

GUI, W. et al. Simultaneous determination of organotin pesticides by HPLC-ICP-MS and their sorption, desorption, and transformation in freshwater sediments. **Water Research**, v. 95, p. 185–194, 2016.

GUMY, C. et al. Dibutyltin disrupts glucocorticoid receptor function and impairs glucocorticoid-induced suppression of cytokine production. **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, 2008.

HOCH, M. Organotin compounds in the environment - An overview. **Applied Geochemistry**, v. 16, n. 7–8, p. 719–743, 2001.

HRELIA, P. et al. Genetic safety evaluation of pesticides in different short-term tests. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 321, n. 4, p. 219–228, 1994.

IMO. Focus on IMO: Anti-fouling systems. **International Maritime Organization**, v. 44, p. 1–31, 2002.

ISRAELACHVILI, J. **Intermolecular and Surface Forces**. 3ª Edição. Academic press, 2015.

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

KAWANO, R. et al. Rapid detection of a cocaine-binding aptamer using biological nanopores on a chip. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 22, p. 8474–8477, 2011.

KOSHLAND, D. E.; NÉMETHY, G.; FILMER, D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. **Biochemistry**, v. 5, n. 1, p. 365–385, 1966.

KRASILNIKOV, O. V.; RODRIGUES, C. G.; BEZRUKOV, S. M. Single polymer molecules in a protein nanopore in the limit of a strong polymer-pore attraction. **Physical Review Letters**, v. 97, n. 1, 2006.

KRASILNIKOV, O. V et al. Electrophysiological evidence for heptameric stoichiometry of ion channels formed by Staphylococcus aureus alpha-toxin in planar lipid bilayers. **Molecular Microbiology**, v. 37, p. 1372–1378, 2000.

KUNTZ, I. D. et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 161, n. 2, p. 269–288, 1982.

LE GROGNEC, E. et al. Methodologies Limiting or Avoiding Contamination by Organotin Residues in Organic Synthesis. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 18, p. 10207–10260, 2015.

LEE, J. O. et al. Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 4, p. 1023–1032, 2008.

LEE, M. R. N. et al. Assessment of organotin and tin-free antifouling paints contamination in the Korean coastal area. **Marine Pollution Bulletin**, v. 99, n. 1–2, p. 157–165, 2015.

LENGAUER, T.; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, n. 3, p. 402–406, 1996.

LI, M. et al. Thyroid endocrine disruption of azocyclotin to *Xenopus laevis* during metamorphosis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 43, p. 61–67, 2016.

LIU, A.; ZHAO, Q.; GUAN, X. Stochastic nanopore sensors for the detection of terrorist agents: Current status and challenges. **Analytica Chimica Acta**, v. 675, n. 2, p. 106–115, 2010a.

LIU, A.; ZHAO, Q.; GUAN, X. Stochastic nanopore sensors for the detection of terrorist agents: Current status and challenges. **Analytica Chimica Acta**, v. 675, n. 2, p. 106–115, 2010b.

MA, Y.; GUI, W.; ZHU, G. Analytical Methods in fruits using ultrahigh-performance liquid. **Analytical Methods**, v. 7, p. 2108–2113, 2015.

MELO, M. C. et al. Inhibition of the hemolytic activity caused by Staphylococcus aureus alpha-hemolysin through isatin-Schiff copper (II) complexes. **FEMS Microbiol Lett**, 2015.

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, n. 12, p. 3561–3566, 1972.

MORABITO, R.; MASSANISSO, P.; QUEVAUVILLER, P. Derivatization methods for the determination of organotin compounds in environmental samples. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 2–3, p. 113–119, 2000.

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

NOVENTA, S. et al. A fast and effective routine method based on HS-SPME-GC-MS/MS for the analysis of organotin compounds in biota samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 858, n. 1, p. 66–73, 2015.

PICCOLI, C. et al. Pesticide exposure and thyroid function in agricultural population in Brazil. **Environmental Research**, v. 151, p. 389-398, 2016.

PORTO, M. F.; MILANEZ, B. Eixos de desenvolvimento econômico e geração de conflitos socioambientais no Brasil: desafios para a sustentabilidade e a justiça ambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, n. 6, p. 1983–1994, 2009.

RIBEIRO, M. L. et al. Pesticidas: Usos e riscos para o meio ambiente. **HOLOS Environment**, v. 8, n. 1, p.54, 2008.

ROBERTSON, J. W. F. et al. Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 20, p. 8207–11, 2007.

ROCHA, M. V. J. Análise Do Modo De Ação Biocida De Compostos Organoestânicos : Ensaio a Partir De Modelos. **Dissertação (Mestrado em agroquímica)- Universidade Federal de Lavras-MG**, 2010.

ROCHA, W. R. Interações Intermoleculares. **Química Nova na Escola**, v. 4, p. 31–36, 2001.

RODOLFO JR., A.; MEI, L. H. I. Mecanismos de degradação e estabilização térmica do PVC: a review. **Polímeros**, v. 17, p. 263–275, 2007.

RODOLFO JR, A.; NUNES, L. R.; ORMANJI, W. **Tecnologia do PVC**. 2º Edição. São Paulo: Brasken, 2006.

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

RODRIGUES, C. G. et al. Nanopore use of Protein Detection, Identification, Monitoring and Measurement in Real Time Microcystin in Aqueous Systems. G01N33/48721. **PATENT WO2013026123 A1**, 2013.

RUIZ, J. M. et al. Three decades of tributyltin in the coastal environment with emphasis on Arcachon Bay, France. **Environmental Pollution**. v. 93. n. 2, p. 195-203, 1996.

SANTOS, F. D. A. Estudo comparativo dos custos e aquisição de PVC no Brasil: mercado interno versus importação. **FATEC Zona sul**, v. 2, n. 1, 2015.

SOARES, W. L.; PORTO, M. F. Atividade agrícola e externalidade ambiental: uma análise a partir do uso de agrotóxicos no cerrado brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 131–143, 2007.

SOARES, W. L.; PORTO, M. F. D. S. Uso de agrotóxicos e impactos econômicos sobre a saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, n. 2, p. 209–217, 2012.

SONAK, S. et al. Implications of the ban on organotins for protection of global coastal and marine ecology. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. SUPPL. 1, p. 96–108, 2009.

SONG, L. et al. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. **Science (New York, N.Y.)**, v. 274, n. 5294, p. 1859–66, 1996.

SONG, S.; XU, H.; FAN, C. Potential diagnostic applications of biosensors: Current and future directions. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 433–440, 2006.

SOUSA, A. C. A. et al. History on organotin compounds, from snails to humans. **Environmental Chemistry Letters**, v. 12, n. 1, p. 117–137, 2014.

TEAGUE, S. J. Implications of protein flexibility for drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 7, p. 527–541, 2003.

THEVENOT, D. R. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification (Technical Report). **Pure Applied Chemistry**, v. 71, n. 12, p. 2333–2348, 1999.

VAN DER KERK, G. J. M.; LUIJTEN, J. G. A. Investigations on organo-tin compounds. IV. The preparation of a number of trialkyl- and triaryltin compounds. **Journal of Applied Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 49–55, 1956.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: A flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 95–102, 2005.

VIEIRA, D. C. et al. Ecological risk analysis of pesticides used on irrigated rice crops in southern Brazil. **Chemosphere**, v. 162, p. 48–54, 2016.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT- a program to generate schematic diagrams of protein ligand interactions. **Protein Engineering**, v. 8, n. 2, p. 127–134, 1995.

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

WYPYCH, G. **PVC Degradation and Stabilization**. 3º Edição. Toronto: ChemTec Publishing, 2015.

YU, J. et al. Thermal degradation of PVC: A review. **Waste Management**, v. 48, p. 300–314, 2016.