



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

ARTUR ALVES RODRIGUES DA SILVA

**BIOSENSORIAMENTO ESTOCÁSTICO VIA NANOPORO PROTEICO
INDIVIDUAL NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
MICOTOXINAS**

Recife
2023

ARTUR ALVES RODRIGUES DA SILVA

**BIOSSENSORIAMENTO ESTOCÁSTICO VIA NANOPORO PROTEICO
INDIVIDUAL NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
MICOTOXINAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues

Coorientador: Prof. Dr. Janilson José da Silva Júnior

Recife

2023

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

Silva, Artur Alves Rodrigues da
Biossensoriamento estocástico via nanoporo proteico individual no desenvolvimento de métodos analíticos para micotoxinas / Artur Alves Rodrigues da Silva– 2023.

81 f. : il., fig., tab.

Orientador: Cláudio Gabriel Rodrigues
Coorientador: Janilson José da Silva Junior

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2023.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Nanotecnologia 2. Micotoxinas 3. Metabólitos I. Rodrigues, Cláudio Gabriel (orient.) II. Silva Junior, José Janilson da (coorient.) III. Título

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -171

ARTUR ALVES RODRIGUES DA SILVA

**BIOSENSORIAMENTO ESTOCÁSTICO VIA NANOPORO PROTEICO
INDIVIDUAL NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
MICOTOXINAS**

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

Aprovado em: 30/03/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Michelly Cristiny Pereira (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Thiago de Salazar e Fernandes (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Edbhergue Ventura Lola Costa (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Prof^a. Dr^a. Juliana Pereira de Aguiar (Examinadora Externa)
Centro Universitário Maurício de Nassau

Dedico esta tese aos meus queridos bisavô, Miguel Alves da Silva e bisavó,
Maria José Alves de Oliveira (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Grato a Deus por me abençoar e permitir viver todos esses momentos.

Em especial, a minha dupla de orientadores, o professor Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues e professor Dr. Janilson José da Silva Júnior. Tenho muita gratidão por todos os ensinamentos e por contribuírem na minha formação acadêmica.

À 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 e tias, Etiene Alves, Marcela Williams e Edjazon Alves; minhas queridas irmãs Alice Alves e Maria Eduarda.

À minha noiva Larissa Ferreira, com quem tenho a felicidade e gratidão de compartilhar esta vida, além de ter a companhia de três lindos gatos; Malu, Toninho e Stark.

Também quero agradecer aos membros do Laboratório de Biofísica de Membranas e Células-tronco (LBM-CT); Juliana Pereira, Wyndly Daniel, Túlio Queiroga, Maria Isabel, professor Dr. Carlos Manoel, professora Dr^a. Márcia Bezerra, professor Dr. Reginaldo Pereira e a professora Dr^a. Paloma Lys. Todas as contribuições e suporte foram indispensáveis no dia a dia do laboratório.

Agradeço em especial, Dijannah Cota Machado a quem tenho imenso carinho e admiração por tudo que representa como pessoa. Todo suporte ao longo desses anos foram fundamentais e sou eternamente grato por sua amizade.

Aos meus queridos amigos, Jeann Fabiann, Thuanny Maryna e todos os membros da “Zona Norte - Old School”. Os momentos especiais ao lado de vocês ajudaram bastante durante esse processo.

Aos meus colegas de trabalho da Universidade Federal de Campina Grande; Carlos Eduardo, Givanílson Brito, Márcio Frazão e Maria Francisca. Grato por todo acolhimento em Cuité-PB.

À coordenadora do Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica (PPGiT) da Universidade Federal de Pernambuco, Maria Danielly Lima de Oliveira e a Paulo Germano, secretário do PPGiT, pela atenção, paciência e disponibilidade.

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

Muito obrigado!

RESUMO

As micotoxinas (MTXs) podem acometer grãos e cereais durante as fases de pré e pós colheita. Essas substâncias são consideradas como metabólitos secundários produzidos por grupos de fungos filamentosos e o acometimento das commodities citadas acima podem desencadear processos tóxicos, quando consumidos por humanos e animais. Órgãos de controle estabelecem diretrizes para a vigilância dos níveis das MTXs mais tóxicas, listando os principais gêneros alimentícios que devem receber essa atenção. O padrão-ouro para determinação e rastreamento das MTXs em alimentos se concentram na utilização da cromatografia líquida, acoplada ao detector de fluorescência ou a espectrometria de massas. No entanto, o uso de matrizes complexas e o alto custo operacional que envolvem estas técnicas dificultam o emprego nas rotinas de monitoramento analítico. Devido a necessidade de ampliar as possibilidades de novos dispositivos analíticos para as MTXs, propomos utilizar o nanoporo da alfatoxina no desenvolvimento de um sensor para detecção e quantificação das principais MTXs de interesse agrícola visando uma metodologia alternativa, menos onerosa e mais rápida que as técnicas convencionais. As bicamadas lipídicas planas livres de solvente foram confeccionadas de acordo com a técnica adaptada de Montal & Mueller, utilizando o lipídeo diftanoil fosfatidilcolina. Todos os experimentos foram realizados em condições de fixação de voltagem (± 20 a ± 200 mV, incrementos de 20 mV), com solução banhante composta por KCl 1 M ou 4 M, Tris 5 mM, pH 7,5 e temperatura de 25 °C. A adição de ocratoxina A, aflatoxina B1 ou fumonisina B1 à solução de KCl no lado TRANS do nanoporo unitário da alfatoxina, resultou em eventos de bloqueio da corrente iônica reversíveis e característicos. Com a análise de parâmetros extraídos da série temporal de cada MTX foi possível calcular a corrente residual (I/I_0), os tempos médios de permanência (τ_{off}) e “interbloqueio” (τ_{on}). Essas análises evidenciaram os três perfis das MTXs com valores de I/I_0 : 0.15 ± 0.001 ; 0.326 ± 0.025 ; 0.443 ± 0.025 ($n=3$) e τ_{off} : 0.0311 ± 0.006 ms, 0.059 ± 0.007 ms e 0.0996 ± 0.011 ms ($n=3$), para ocratoxina, aflatoxina B1 e fumonisina B1, respectivamente. A determinação da corrente residual associada com o τ_{off} permitem, desta forma, identificar e discriminar as MTXs em solução aquosa, conforme estudos prévios. Em análises com as três MTXs adicionadas simultaneamente em solução no lado TRANS, os valores de corrente residual e dos

tempos de toff permaneceram inalterados, identificando na mistura cada MTX e corroborando com a capacidade multianalítica da técnica trabalhada neste estudo. Também evidenciamos que o fato de aumentar a concentração de KCl de 1 M para 4 M, ampliou a sensibilidade do biossensor em até 5 vezes, corroborando com estudos anteriores. Por fim, a técnica apresentou a capacidade de detectar as MTXs na ordem de nanomolar. Portanto, o nanoporo da alfatoxina mostrou ser capaz de detectar as MTXs, podendo se tornar um método analítico alternativo na quantificação e discriminação de MTXs em meio aquoso.

Palavras-chave: micotoxinas; alfatoxina; biossensoriamento estocástico; nanoporo.

ABSTRACT

Mycotoxins (MTX) can affect grains and cereals in the pre- and postharvest stages. These substances are considered secondary metabolites produced by groups of filamentous fungi, and the involvement of the above commodities can trigger toxic processes when consumed by humans and animals. The control agencies establish guidelines for monitoring the content of the most toxic MTX, which list the main foods to which this attention should be paid. The gold standard for the determination and screening of MTX in foods is liquid chromatography coupled with a fluorescence detector or mass spectrometry. However, the use of complex matrices and the high operating costs of these techniques make their use in analytical monitoring routines difficult. Due to the need to expand the capabilities of new analytical tools for MTX. We propose to use the alphatoxin nanopore in the development of a sensor for the detection and quantification of the major MTX of agricultural interest to develop an alternative methodology that is less costly and faster than conventional techniques. Solvent-free flat lipid bilayers were prepared according to the technique adapted from Montal & Mueller using the lipid diphthanoylphosphatidylcholine. The bath solution consisted of 1 M or 4 M KCl, 5 mM Tris, pH 7.5, and temperature 25 °C. Addition of ochratoxin A, aflatoxin B1, or fumonisin B1 to KCl solution on the TRANS side of the alphatoxin nanopore resulted in characteristic reversible ionic current blockage events. With the analysis of the parameters extracted during the evaluation of the time series of each MTX, it was possible to calculate the residual current (I/I_0), the event dwell times (τ_{off}), and the interevent interval (τ_{on}). These analyzes showed the three MTX profiles with I/I_0 values: 0.15 ± 0.001 ; 0.326 ± 0.025 ; 0.443 ± 0.025 ($n=3$) and τ_{off} : 0.0311 ± 0.006 ms, 0.059 ± 0.007 ms and 0.0996 ± 0.011 ms ($n=3$), respectively, for ochratoxin, aflatoxin B1 and fumonisin B1. Determination of the residual current associated with the τ_{off} allowed identification and discrimination of the MTX in aqueous solution, as noted in previous studies. In analyzes in which the three MTXs were added simultaneously in solution at TRANS side, the values of residual current and τ_{off} remained unchanged, allowing identification of each MTX in the mixture and confirming the multianalytical capability of the technique used in this study. We also showed that increasing the KCl concentration from 1 M to 4 M increased the sensitivity of the biosensor by up to fivefold, confirming previous studies. Finally, the technique demonstrated the ability to detect MTX at nanomolar

levels. Therefore, the alphatoxin nanopore proved capable of detecting MTX, which could become an alternative analytical method for the quantification and discrimination of MTX in aqueous solution.

Keywords: mycotoxins; alphatoxin; stochastic biosensing; nanopore.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura e características morfológicas do <i>Aspergillus flavus</i> . Fonte: Adaptado de KLICH (2007).....	26
Fluxograma 1 –	Análise e detecção das micotoxinas. Fonte: Adaptado de ALSHANNAQ & YU (2017).....	31
Figura 2 –	Princípio básico de funcionamento de um biossensor. Fonte: Elaborado pelo autor (2023).....	37
Figura 3 –	Nanoporos de origem biológica. Fonte: Adaptado de BHATTI et al. (2021).....	39
Figura 4 –	Estrutura cristalográfica do nanoporo formado pela alfatoxina. Fonte: Adaptado de AGUIAR et al. (2015).....	41
Figura 5 –	Esquema de funcionamento do nanoporo da alfatoxina como biossensor estocástico. Fonte: Adaptado de BAYLEY & CREMER (2001).....	43
Figura 6 –	Estrutura de montagem das bicamadas lipídicas planas em orifícios presentes nos filmes de Teflon. Fonte: Adaptado de MONTAL & MUELLER (1972).....	46
Figura 7 –	Estratégias de engenharia molecular para detecção e discriminação dos analitos. Fonte: Adaptado de CHEN et al. (2021).....	48
Figura 8 –	Esquema de construção da Bicamada lipídica plana. Fonte: Adaptado de RODRIGUES (2006).....	53
Figura 9 –	Esquema dos componentes do sistema de aquisição eletrônica. Fonte: Elaborado pelo autor (2023).....	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	17
2.2	MICOTOXINAS (MTXs).....	18
2.2.1	Conceito e histórico.....	18
2.2.2	Classificação, estrutura e propriedades físico-químicas das MTXs.....	20
2.2.3	Toxicidade.....	23
2.2.4	Fungos produtores e principais alimentos contaminados.....	26
2.2.5	Legislação.....	28
2.3	MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DAS MICOTOXINAS.....	29
2.3.1	Etapas de pré-processamento das amostras.....	30
2.3.2	Métodos cromatográficos.....	33
2.3.3	Outros métodos aplicados para detecção de micotoxinas.....	34
2.4	BIOSSENSORIAMENTO ESTOCÁSTICO.....	36
2.4.1	Alfatoxina.....	40
2.4.2	Princípio de funcionamento do biossensor utilizando o nanoporo da alfatoxina como elemento de reconhecimento biológico.....	42
2.4.3	Aplicações do biossensor estocástico do nanoporo da alfatoxina.....	44
2.4.4	Modelos de formação das bicamadas lipídicas planas.....	45
2.4.5	Influência da solução banhante e da engenharia molecular sobre os nanoporos na detecção de biomoléculas.....	47
3	OBJETIVOS.....	52
3.1	OBJETIVO GERAL.....	52
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
4	METODOLOGIA.....	53
4.1	CONSTRUÇÃO DAS BICAMADAS LIPÍDICAS PLANAS.....	53

4.2	SISTEMA ELETRÔNICO PARA AQUISIÇÃO DAS “ASSINATURAS DIGITAIS” DAS MICOTOXINAS EM TEMPO REAL.....	54
4.3	ANÁLISES DAS SÉRIES TEMPORAIS DE BLOQUEIOS DAS MICOTOXINAS.....	55
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58
	APÊNDICE A – Alphatoxin Nanopore Detection of Aflatoxin, Ochratoxin and Fumonisin in Aqueous Solution.....	67
	APÊNDICE B – Material Suplementar do artigo: Alphatoxin Nanopore Detection of Aflatoxin, Ochratoxin and Fumonisin in Aqueous Solution.....	80
	ANEXO A – Resumo publicado na 51ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) 46º Congresso Brasileiro de Sociedade de Biofísica (SBBf)/ Lafabs.....	81

1 INTRODUÇÃO

No processo de cultivo, armazenamento e distribuição de grãos e cereais, diversos protocolos de segurança são seguidos a fim de evitar a presença de substâncias tóxicas nos alimentos que podem oferecer riscos a saúde humana e de animais quando consumidos. Destacam-se as micotoxinas (MTXs) que são definidas como metabólitos secundários produzidos por categorias de fungos filamentosos (NESIC; HABSCHIED; MASTANJEVIC, 2021; WU; GROOPMAN; PESTKA, 2014). Essa classe de toxinas é considerada um importante problema de segurança alimentar por causar as micotoxicoses e apresentam a capacidade de contaminar alimentos tanto na fase do plantio e crescimento das mudas na agricultura, quanto no processamento e estocagem dos alimentos. Entre os diversos fungos que atuam na produção dessas toxinas, podem ser apontados os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (NESIC; HABSCHIED; MASTANJEVIC, 2021; ROBENS; RICHARD, 1992).

Apesar do grande número de MTXs que já foram catalogadas, apenas um número restrito atua em processos de contaminação dos alimentos e rações, tornando-se de importância médica, agrícola e econômica o seu controle. Cabe enfatizar que alguns grupos de fungos apresentam-se mais relevantes devido a frequência de acometimento nos alimentos, contribuindo em maior proporção para a presença de MTXs. Nesse aspecto, temos o *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, produzindo as Aflatoxinas e seus subtipos (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂), *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*, com a produção da Ocratoxina A, e por fim *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, para a Fumonisina B₁ ou B₂ (GROOPMAN; KENSLER; WILD, 2008).

As síndromes toxicológicas podem ser enquadradas em agudas e crônicas, sendo as micotoxicoses agudas mais evidentes devido ao alto número de óbitos, apesar da menor frequência desses eventos. No entanto, a exposição em pequenas doses ao longo do tempo aumentam a propensão para o desenvolvimento de cânceres e alterações renais (KAMLE *et al.*, 2019; MARCHESE *et al.*, 2018). Dado a dificuldade do rastreamento das evidências associando as MTXs como causadores dessas doenças, estimar o número de óbitos causados por processos crônicos torna-se complexo. A susceptibilidade para o desenvolvimento das respostas agudas ou crônicas depende de fatores como idade, estado nutricional, a dose,

duração e via de exposição. Fatores que são condicionantes para maior exposição a essa classe de toxinas são pessoas enquadradas em maior vulnerabilidade econômica e animais criados de forma inadequada com a administração de ração sem controle de qualidade (BENNETT; MOORE, 2019; BENNETT; KLICH, 2003).

Os riscos de exposição a essas classes de toxinas devem-se ao difícil controle, dada a característica peculiar de contaminação, onde mesmo com a simples testagem da amostra indicando a ausência de fungo, não permite a confirmação de que o alimento não apresenta a MTX. Também é importante ressaltar, a naturalidade do crescimento dos fungos sob determinadas condições de umidade e temperatura, configurando a contaminação direta, que pode acometer desde a fase pré-colheita até as fases de transporte e armazenamento (pós-colheita) dos alimentos, fato este, que dificulta a eliminação das MTXs devido sua estabilidade a tratamentos químicos, térmicos e físicos (SIPOS *et al.*, 2021; TAGHIZADEH *et al.*, 2020).

A via de contaminação indireta também representa um risco, já que as rações contaminadas podem ser metabolizadas pelos animais e produzir metabólitos mais tóxicos que vão parar em produtos de origem animal, como ovos, carnes e leites (SILVA *et al.*, 2023, YANG; SONG; LIM, 2020). As dificuldades no controle das MTX em alimentos tornam essa problemática de relevante preocupação mundial, dado o modo imprevisível e inevitável de ação dos fungos, que até o momento ainda apresentam estratégias para o controle da ocorrência, mas não para eliminação por completo das micotoxinas nos mais variados produtos alimentares (BENNETT; MOORE, 2019).

O reflexo da problemática que envolve o controle das MTXs é observado nas perdas econômicas. É fato que a ameaça que as MTXs representam para a saúde humana e animal criam embargos econômicos dificultando o comércio internacional. Alguns dados estimam que cerca de 25% dos grãos colhidos ao longo do ano estão contaminados, promovendo o desperdício e perdas bilionárias para a indústria agrícola (ESKOLA *et al.*, 2020). Diversos órgãos de controle como a *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA, a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Organização para a Agricultura Alimentar e a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, estabelecem diretrizes regulatórias rigorosas para as principais MTXs em alimentos e rações para animais, que atualmente são aplicados por cerca de 100 países (ALSHANNAQ; YU, 2017).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicou uma resolução, a RDC 07/2011, que estabeleceu os limites máximos tolerados (LMT) para as micotoxinas em 14 categorias de alimentos. O cronograma de implementação e adaptação à legislação vigorou até o ano de 2019, após esse período o descumprimento dessa RDC é considerado uma infração sanitária. Apesar dos avanços na determinação e padronização dos limites máximos permitidos em alimentos, os procedimentos que são utilizados para estes fins ainda necessitam de aprimoramentos.

O processo de identificação e detecção das MTXs em alimentos e rações é iniciado com obtenção da amostragem, extração, limpeza e finalmente detecção e quantificação dessas toxinas. As rotinas laboratoriais aplicam os principais métodos de detecção e quantificação atualmente validados para este processo, que incluem a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção fluorimétrica (CLAE-DFL) (ANSARI *et al.*, 2018), ou acoplada à espectrometria de massas (CLAE-MS) (YANG *et al.*, 2022), espectrometria de massa por ionização/dessorção a laser assistida por matriz (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry* - MALDI-TOF) (JEROME JEYAKUMAR; ZHANG; THIRUVENGADAM, 2018) e o ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) (ALSHANNAQ; YU, 2017).

Apesar dos avanços, as técnicas citadas acima apresentam alguns problemas que proporcionam desvantagens para uso em rotina. Entre esses desafios a serem superados estão a dificuldade na implementação de técnicas portáteis e sensíveis para detecção das MTXs, grande diversidade de estruturas químicas, ocorrência simultânea necessitando de procedimentos com matrizes complexas, problemas com reações cruzadas nos ensaios imunoenzimáticos e o alto custo que envolve a aplicação dessas técnicas nas análises laboratoriais. Devido às limitações supracitadas, estudos estão buscando novas metodologias para transpor essas deficiências apresentadas (JETTANAJIT; NHUJAK, 2016).

Poros proteicos deram os primeiros passos como importante papel na formação da vida, por permitir o acesso a nutrientes no meio circundante das células. A evolução de todo sistema celular tem mostrado o quanto as mesmas dependem de canais para transportar nutrientes, íons e estabelecer vias de sinalização, metabolismo e comunicação celular (DAMER; DEAMER, 2020). Com o avanço da nanobiotecnologia visando o desenvolvimento de procedimentos e

dispositivos com o objetivo de detectar, identificar e quantificar moléculas, estão sendo utilizadas nanoestruturas biológicas dotadas da capacidade de reconhecimento molecular, permitindo o seu direcionamento para criação de uma classe inovadora de sensores. A utilização de nanoporos proteicos apresentam tais características e mais especificamente o formado pela alfatoxina de *Staphylococcus aureus*, que, por apresentar uma versatilidade funcional, além da reprodutibilidade e sensibilidade, atualmente é considerado um bom modelo de nanoporo proteico para detecção de moléculas em meio aquoso (BAYLEY; CREMER, 2001).

O biossensoriamento estocástico é a abordagem que envolve o princípio de detecção ao utilizar o nanoporo da alfatoxina, onde eventos individuais de ligação são observados entre uma molécula do analito alvo e um único nanoporo, sendo o encontro entre eles por meio da difusão, ou seja, de forma aleatória. Neste encontro, a molécula ocupa reversivelmente o lúmen do nanoporo da alfatoxina causando um decréscimo transitório (bloqueio) da corrente iônica (AGUIAR *et al.*, 2015). A definição de um estado ocupado e outro não ocupado, a partir do bloqueio reversível da corrente iônica, permite a caracterização da molécula através da análise do conjunto de flutuações entre um estado e outro, no determinado período de tempo analisado (série temporal) (BAYLEY; CREMER, 2001).

Desta forma, as vantagens que estão atreladas ao dispositivo sensor baseado na alfatoxina proporcionou sua utilização em diversas áreas, destacam-se: a detecção e discriminação de enantiômeros e polímeros (ROBERTSON *et al.*, 2007), sequenciamento e estudo da translocação do DNA (WANG *et al.*, 2020; WANUNU *et al.*, 2010), detecção de armas químicas (TNT) (GUAN *et al.*, 2005), drogas ilícitas (cocaína) (KAWANO *et al.*, 2011), microcistinas (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2019) e recentemente na detecção da ocratoxina A (LI *et al.*, 2022).

Sabendo que o biossensoriamento estocástico baseado em nanoporo é promissor no desenvolvimento de dispositivos analíticos e que o Brasil é um dos principais exportadores mundiais de produtos agropecuários passíveis de contaminação por MTX (TANIWAKI *et al.*, 2019), propomos utilizar o nanoporo da alfatoxina no desenvolvimento de um biossensor para detecção e quantificação das MTXs (aflatoxina B₁, ocratoxina A, fumonisina B₁) visando uma metodologia alternativa, menos onerosa e mais rápida que às técnicas convencionais utilizadas atualmente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A incidência de fungos que causam algum tipo de enfermidade aos vertebrados é muito menor quando comparado às bactérias “como parâmetro”, contudo, apresentam grande importância médica. As principais doenças com potencial de serem causadas a partir do crescimento dessa classe de microrganismo no hospedeiro, sendo em sua grande maioria de maneira oportunista, são as micoses. Caracterizadas por serem a principal doença infecciosa ocasionada por fungos, as micoses podem variar de uma irritação simples, como as famosas frieiras, até processos mais graves e potencialmente fatais, a exemplo da aspergilose pulmonar (LUPI; TYRING; MCGINNIS, 2005).

Em paralelo às micoses, as micotoxicoses são consideradas como processos tóxicos causados por substâncias produzidas pelos fungos. Basicamente, essas substâncias são denominadas de micotoxinas e são caracterizadas como metabólitos secundários que podem causar patologias, variando em intensidade e duração dos sintomas, dependendo do tipo de micotoxina que o indivíduo ou animal é exposto (BENNET; KLICH, 2003). A maneira mais frequente de exposição às MTXs é pela via dietética, já que é comum a presença dessas substâncias em alimentos que são cultivados e/ou armazenados de maneira incorreta (CARBALLO *et al.*, 2019). Por se tratar de um envenenamento, podemos estabelecer um contraste entre as micoses e as micotoxicoses, onde a primeira é caracterizada por ser um processo infeccioso e principal causa de doenças oportunistas no mundo, enquanto que as micotoxicoses são processos tóxicos a partir da ingestão de alimentos contaminados, afetando países em vulnerabilidade econômica e subdesenvolvidos, onde o controle de qualidade dos alimentos é deficiente (BENNET; KLICH, 2003; BENNETT; MOORE, 2019).

Com essas definições bem estabelecidas, vamos nos restringir em abordar apenas as MTXs. A importância que é dada a essa classe de moléculas é devido à preocupação mundial quanto a sua presença em alimentos (LEE *et al.*, 2015). A demanda em conter a presença das MTXs se baseia nos processos tóxicos que podem ser gerados, caracterizados por processos variáveis, onde órgãos diversos são acometidos tanto de forma aguda quanto crônica (GERMANO; OLIVEIRA,

1997). Essas variações nas sintomatologias refletem na necessidade de estudos mais acurados, que foram praticados ao longo do tempo desde sua descoberta, permitindo assim, obter as mais diversas informações acerca das MTXs. Isto posto, vamos expor nessa primeira etapa do trabalho alguns aspectos dessas substâncias, fornecendo informações acerca da história, toxicidade e técnicas que são aceitas atualmente para discriminação e detecção das MTXs em alimentos.

2.2 MICOTOXINAS (MTXs)

2.2.1 Conceito e histórico

Todo microrganismo apresenta um vasto metabolismo onde diversos processos bioquímicos estão associados à produção de componentes essenciais e não essenciais que contribuem para o desenvolvimento dos mesmos. Nesse processo, fatores como pH, temperatura entre outros, são cruciais para o sucesso dessa etapa, entretanto, paralelo às vias metabólicas principais, moléculas podem ser geradas através de vias secundárias e podem apresentar propriedades tóxicas ou antibióticas. Nesse contexto, grupos de fungos filamentosos apresentam a capacidade de produzir, a partir de seu metabolismo secundário, as MTXs. A priori, consideram-se como produtos naturais, no entanto, por conta do potencial tóxico que representam, recebem essa denominação (BENNETT, 1987; BENNETT; KLICH, 2003).

Podemos considerar que a terminologia micotoxina não é universal para essa classe de moléculas, já que o termo toxicidade depende do aspecto que é abordado na busca de elementos científicos que levam as substâncias a receberem a classificação de tóxica ou não tóxica. Um exemplo é que outras substâncias químicas tóxicas, também produzidas por fungos filamentosos, podem apresentar ação específica antimicrobiana, com efeitos positivos para saúde humana e de animais, denominados de antibióticos em vez de MTXs (ROBENS; RICHARD, 1992). Contudo, sua presença em alimentos e grãos levantou a hipótese de enquadrá-las como toxinas, em razão destes constituírem nossa dieta de consumo, bem como dos animais, e atuando diretamente no desenvolvimento de processos tóxicos (ROBENS; RICHARD, 1992).

O entendimento do processo de surgimento da terminologia e o seu emprego na definição dessas moléculas, iniciou-se no ano de 1962, onde uma crise veterinária atípica na Inglaterra provocou a morte de uma população de cerca de 100 mil perus. Esse evento ficou conhecido como “*turkey X Disease*” (BRADBURN; COKER; BLUNDEN, 1994) e posteriormente sua causa foi associada à presença da aflatoxina, um metabólito secundário oriundo do crescimento do *Aspergillus flavus*, em farinha de amendoim, que na época era um dos componentes da ração administrada para esses animais.

Esse fato foi importante para impulsionar os estudos na área, contudo, é importante salientar que fatos anteriores já apresentavam conhecimento da correlação dos problemas de saúde com a presença de substâncias possivelmente tóxicas em alimentos, com descrições acerca das toxicoses e os respectivos fungos causadores, mas eram raras as toxinas que tinham suas estruturas químicas identificadas. Desta forma, com o advento da doença que afetou os perus na Inglaterra, o período entre 1960 e 1975 ficou marcado pelo crescimento no interesse sobre as micotoxinas, que conseqüentemente permitiu um incremento considerável no número de pesquisas e publicações nesta área (BENNETT; KLICH, 2003; PITT; MILLER, 2017).

O evento de envenenamento ocorrido na Inglaterra foi proveniente da farinha de amendoim, chamado farelo “*Rossetti*”, importado do Brasil. Apesar das suspeitas de contaminação, nenhuma pesquisa foi aplicada para avaliar a relação do farelo brasileiro com as mortes dos animais (PITT; MILLER, 2017). Com o avanço das pesquisas nos anos seguintes, farelos semelhantes provenientes de Uganda e que estavam envolvidos em surtos semelhantes, foram aplicados em estudos que permitiu isolar o fungo causador e dessas culturas isoladas, uma substância que quando administrada em testes com patos foram observados os mesmos eventos tóxicos associados aos casos de “*turkey X Disease*”. Também foi possível analisar, por meio de técnicas de cromatografia, a separação dos componentes dessa substância bem como a identificação química dos mesmos (BENNETT; KLICH, 2003; OANCEA; STOIA, 2008).

Logo, as primeiras descrições desses estudos levaram à identificação dos componentes isolados produzidos pelos fungos, mais especificamente do *Aspergillus flavus* e o *A. parasiticus*, sendo denominadas de aflatoxinas e seus subtipos (baseados em pequenas diferenças químicas estruturais) em aflatoxina B₁, B₂, G₁ e

G₂. Em seguida, a segunda micotoxina de importância tóxica para os humanos e animais identificada foi a Ocratoxina A, proveniente de culturas de *Aspergillus ochraceus*. Estudos também evidenciaram que derivados de leite, proveniente de animais que ingeriam alimentos contaminados com aflatoxinas, apresentava uma substância diferente da ingerida, contudo, com as mesmas características do grupo. Para essa classe de compostos, uma denominação específica foi dada, as aflatoxinas M, e as mesmas foram caracterizadas por ser fruto da metabolização das aflatoxinas, principalmente a B₁ e a B₂, e identificadas conseqüentemente como aflatoxina M₁ e M₂ (FRISVAD *et al.*, 2019; OANCEA; STOIA, 2008).

Estimativas recentes indicam que cerca de 400 compostos produzidos por fungos são classificados como micotoxinas. No entanto, são poucas as que podem ser consideradas como uma ameaça à saúde humana e animal, reduzindo esse grupo aos compostos provenientes de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Fusarium* (ULGER *et al.*, 2020). Também é importante citar que ainda estão em estudo pesquisas com novas espécies para identificação dos seus metabólitos e que podem futuramente entrar para esse grupo. Dada à baixa porcentagem de espécies fúngicas que são conhecidas, a tendência é que possam existir milhares de novos compostos ou espécies produtoras para serem estudados (ALSHANNAQ; YU, 2017; FRISVAD *et al.*, 2019).

2.2.2 Classificação, estrutura e propriedades físico-químicas das MTXs

Classificar as MTXs é um processo bastante peculiar devido à complexidade dos compostos. Inserir várias delas em um determinado grupo e usar isso como parâmetro absoluto é bastante complicado. Essa problemática parte das MTXs apresentarem fatores como a variabilidade de estruturas, origem biossintética, efeitos biológicos variados e podem ser produzidos por diferentes espécies de fungos. Esses fatores permitem que a categorização das MTXs seja feita de acordo com as linhas de pesquisas aplicadas e a área de estudo (BENNETT; KLICH, 2003; NESIC; HABSCHIED; MASTANJEVIC, 2021).

Estudos na área médica conferem aos compostos a classificação baseados nos órgãos que as MTXs afetam em predominância, daí temos as hepatotoxinas, nefrotoxinas, neurotoxinas e assim por diante. Na área da biologia celular temos as MTXs teratogênicas, mutagênicas e carcinogênicas. Do ponto de vista de estrutura

química, lactonas, cumarinas e cadeias de hidrocarboneto hidroxilados compõem a estrutura base da maioria das MTXs (BENNETT; KLICH, 2003).

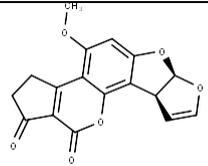
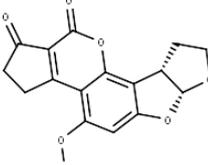
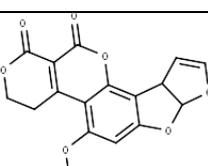
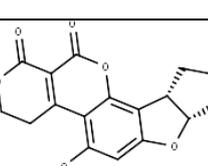
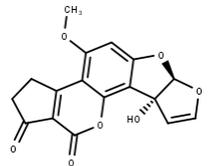
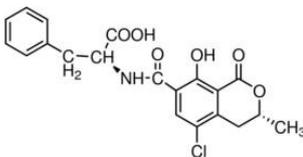
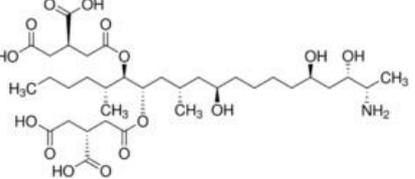
A partir da origem bioquímica, podemos apontar grupos que são produzidos através de metabolismo secundário (policetídeo) ou derivados de aminoácidos e, por fim, através da identificação do fungo responsável pela produção da MTX, podemos enquadrá-las em toxina do *Arpergillus*, de *Penicillum*, entre outras espécies. Importante salientar que nenhuma dessas classificações são satisfatórias quando utilizadas de maneira única, como exemplo, as aflatoxinas podem ser enquadradas como toxina do *Arpergillus*, nefrotóxicas e mutagênicas, apresentando as cumarinas como estrutura química principal e são compostos derivados de policetídeos (BENNETT; KLICH, 2003).

Quanto às características de estruturas químicas das MTXs que podemos destacar, temos as aflatoxinas, onde apresentam o núcleo cumarínico ligado a estrutura bi-furanóide, como base dos compostos (estrutura difurocumarínico). Importante frisar que entre as variações de aflatoxinas, a presença do anel ciclopentano na aflatoxina B₁ e B₂ ligado à estrutura principal permite a diferenciação com os subtipos G₁ e G₂, que apresentam a delta-lactona ligado à estrutura difurocumarínico (ASAO *et al.*, 1963).

Das ocratoxinas, a mais predominante é a ocratoxina A (OTA), que é um pentacetídeo formado pelo núcleo central, o dihidrocumarínico, ligado ao aminoácido β-fenilalanina (KHOURY; ATOUI, 2010). Por fim, as fumonisinas são compostos baseados em cadeias de hidrocarboneto hidroxilado, onde os subtipos vão variar de acordo com a presença do grupo amino ligado à cadeia, fumonisinas B₁ e B₂, enquanto a ligação com o grupo acetil é característico das fumonisinas A₁ e A₂ (KAMLE *et al.*, 2019).

Na **tabela 1**, podemos observar resumidamente as estruturas das MTXs de maior interesse econômico e científico. Também é importante salientar que as MTXs apresentam emissão de fluorescência, são termoestáveis, insolúveis em solventes apolares e solúvel em solventes polares como o metanol, no entanto de maneira moderada em água. Fatores como a exposição das MTXs em soluções muito ácidas ou alcalinas e raios ultravioletas podem gerar instabilidade e conseqüentemente sua degradação (CALADO; VENÂNCIO; ABRUNHOSA, 2014, SIPOS *et al.*, 2021).

Tabela 1 – Micotoxinas de importância agrícola.

Fungos	Alimentos Afetados	Micotoxinas	Estrutura Químicas
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Milho, trigo, arroz, amendoim, cacau pistache, amêndoa, feijão, nozes, figos, caroço de algodão	Aflatoxina B ₁	
		Aflatoxina B ₂	
		Aflatoxina G ₁	
		Aflatoxina G ₂	
	Leite e derivados	Aflatoxina M ₁	
<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus carbonarius</i>	Cereais, videiras secas, vinho, uvas, café, cacau, queijo	Ocratoxina A	
<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Milho e derivados, Trigo, Arroz e derivados	Fumonisina B ₁	

Fonte: autoria própria (2023).

A grande preocupação quanto à presença em alimentos e a capacidade de gerar implicações para saúde, torna as MTXs compostos altamente peculiares e perigosas (FINK-GREMMELS, 1999; PRESTES *et al.*, 2019). O conhecimento

dessas propriedades físico-químicas tem papel crucial na eficiência do processo de inativação dos compostos, quando presente nos alimentos, sendo importante frisar que a eficiência pode variar de acordo com alimento que é acometido e o grau de contaminação (GIZACHEW *et al.*, 2019).

2.2.3 Toxicidade

Definir os meios de toxicidade das MTXs não é uma tarefa fácil. Todo processo envolvido na determinação da relação entre a doença e as MTXs requer várias etapas, que inicialmente parte da obtenção de evidências científicas que embasem as sintomatologias observadas em humanos e realização de testes confirmatórios em modelos animais. Posteriormente é analisada a exposição humana para esse tipo de substância, onde são realizados dois tipos de monitoramento: o ambiental, por meio da identificação dos níveis das MTXs em alimentos, e o biológico, para identificação de resíduos dos compostos em fluidos e tecidos. As diversas variáveis que podem influenciar na obtenção dos resultados desse tipo de pesquisa com objetivo final de estabelecer uma situação de causa e consequência, dificulta colocar as MTXs como denominador comum na causa de diversas doenças (ALSHANNAQ; YU, 2017; BENNETT; KLICH, 2003; MARCHESE *et al.*, 2018).

Como já relatado anteriormente, as manifestações provenientes das micotoxicoses podem ser resumidas em processos agudos ou crônicos. De modo geral, a principal via de exposição é a ingestão de alimentos contaminados, mas não esquecendo que a inalação e o contato dérmico com as MTXs também podem estabelecer uma via de contaminação. Na literatura fica evidente que os casos agudos são menos recorrentes, restringindo-se a poucos casos ao redor do mundo e acometendo principalmente pessoas que se encontram em países subdesenvolvidos e em vulnerabilidade social (PROBST; NJAPAU; COTTY, 2007). Os principais sintomas incluem necrose hepática, evoluindo em muitos casos para processos hemorrágicos, edemas e letargia. Crianças são mais acometidas por processos agudos, já que adultos apresentam alta tolerância para as MTXs, e cerca de 25% da população que é acometida por altos níveis dessas substâncias acabam falecendo (PEREIRA; CUNHA; FERNANDES, 2022). Entre os principais casos relatados, sua grande maioria são em animais (BARAC, 2019; MARCHESE *et al.*, 2018).

Fatos importantes de processos agudos de contaminação por MTXs em humanos podem ser destacados, como exemplo, temos o caso do oeste da Índia, em 1974, causando a morte de 27% das pessoas acometidas. Em 1982, o Quênia apresentou registros de internação de indivíduos com hepatite aguda e evidências de envenenamento por aflatoxina, causando a morte de 60% das pessoas. Na Malásia, no ano de 1988, um grupo de 13 crianças morreram e posteriormente identificaram que elas tinham ingerido macarrão contaminado com aflatoxina. Por fim, novamente no Quênia, entre 2004 e 2005, 125 pessoas morreram, caracterizando o maior evento de intoxicação aguda em humanos até o momento documentado. Todos esses eventos apresentavam em comum recentes períodos de estiagem, comunidades em vulnerabilidade nutricional e, com exceção dos casos na Malásia, os demais foram causados devido à ingestão de milho contaminado (AZZIZ-BAUMGARTNER *et al.*, 2005; PROBST; NJAPAU; COTTY, 2007).

Apesar das graves consequências que a elevada exposição às MTXs podem causar a saúde humana e de animais, os casos crônicos se configuram em maior número. Na literatura já é consenso que a ingestão regular e gradual de MTXs podem levar ao desenvolvimento de disfunções no sistema imunológico, distúrbios hormonais, carcinogênicos, além de nefropatias e infecções no trato gastrointestinal (KAMLE *et al.*, 2019; MARCHESE *et al.*, 2018).

Avaliando inicialmente os efeitos no sistema imunológico, há indícios de que as MTXs atuam de maneira imunotóxica, permitindo influenciar a resposta humoral, celular e mediada por citocinas. Como consequência dessas alterações, problemas como a inibição de fagocitose, retardo da hipersensibilização cutânea e aplasia do timo são alguns dos efeitos gerados. É verdade que os sintomas que acometem o indivíduo são devido às infecções, o que dificulta associar a ação das micotoxinas no processo patológico. Contudo, através de alguns estudos, evidências foram encontradas que demonstram que a exposição às MTXs pode induzir a diminuição da resposta imunológica e consequentemente diminuir a ação combativa do organismo contra outras doenças (BIANCO *et al.*, 2012; SOLHAUG; ERIKSEN; HOLME, 2016; YOU *et al.*, 2023).

Distúrbios hormonais podem ser identificados principalmente com o retardo no desenvolvimento de crianças. Estudos observacionais em crianças (até 5 anos de idade) que foram expostas durante a fase inicial de crescimento às MTXs, puderam atestar que o quadro de baixa estatura e desnutrição estava associado à presença

dessas toxinas nos alimentos ingeridos por essas crianças. Esse quadro foi principalmente observado em países com problemas em garantir a segurança alimentar necessária para população, a exemplo de países da África ocidental (LOMBARD, 2014).

A possibilidade das MTXs de atuarem como compostos pró-carcinógenos tem fundamental importância do ponto de vista de avaliação de risco à saúde. Estudos mostram que a ingestão regular de alimentos contaminados com MTXs, principalmente das aflatoxinas, aumentam o risco do desenvolvimento de câncer do fígado (GERMANO; OLIVEIRA, 1997). Dos mecanismos de ação mais bem elucidados, destacam-se a capacidade das aflatoxinas em induzir processos de estresse oxidativo e da AFB1-exo-8,9 epóxido (AFBO), produto gerado da metabolização das aflatoxinas, em reagir com ácidos nucleicos, proteínas e fosfolípidos promovendo a interrupção genética, metabólica e de cascatas de sinalização celular (BENKERROUM, 2020). O grande número de evidências correlacionando as aflatoxinas com estes processos conduziram a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC - *International Agency for Research on Cancer*) a classificá-las como substâncias cancerígenas (BENKERROUM, 2020; MARCHESI *et al.*, 2018).

Aspectos importantes também são observados a partir da relação da ingestão de MTXs com problemas renais. Um exemplo é a nefropatia endêmica dos Balcãs (NEB), caracterizada por ser uma doença renal crônica que acomete populações de países como Bósnia-Herzegovina, Croácia, Macedônia, Sérvia, Bulgária e Romênia, principalmente aldeias rurais que ficam localizadas nas margens do rio Danúbio. Estudos propõem uma correlação entre a presença da OTA em produtos que constam na dieta da população local, como cevada e grãos de café verde, no desenvolvimento da doença. A possibilidade da OTA atuar como agente causador da NEB também fundamenta para capacidade dessa toxina no desenvolvimento do câncer do trato urinário superior, situação clínica muito presente nos casos mais graves da NEB (PAVLOVIĆ, 2013).

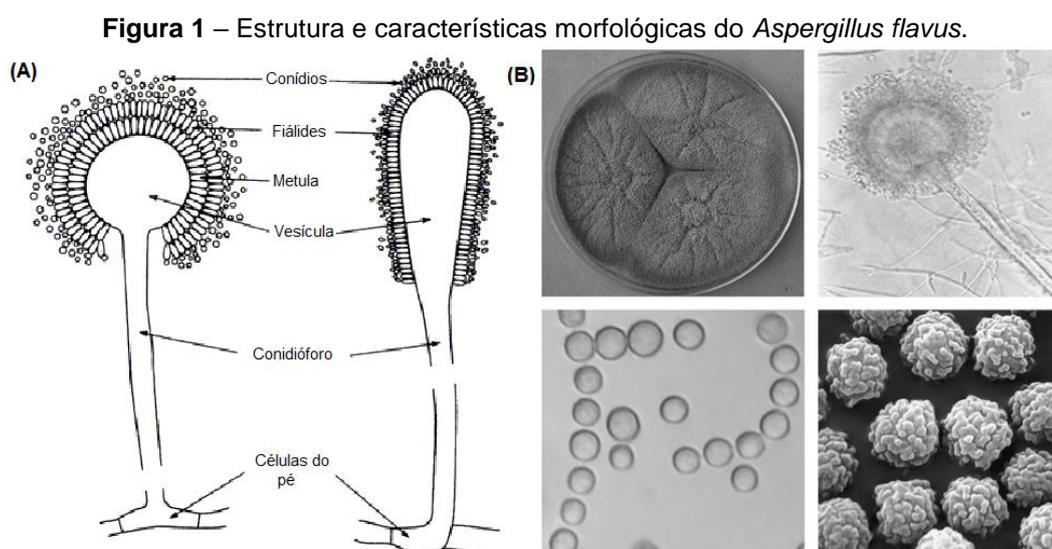
Por fim, podemos destacar que a região do trato gastrointestinal também sofre com a grande exposição às MTXs. Estudos já relatam a provável ação de aflatoxinas e da OTA, em reduzir a expressão de proteínas e aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, conseqüentemente diminuindo a função de barreira das células presentes nas mucosas, facilitando processos de infecções

bacterianas. De maneira geral, processos inflamatórios são induzidos na região e a exposição a longo prazo permite que a inflamação seja crônica, tornando a região susceptível para o desenvolvimento de outras doenças (GRENIER; APPLGATE, 2013; PINTON *et al.*, 2010).

Diante deste cenário, garantir a segurança alimentar é fundamental, dado o perigo que representa a intoxicação causada pelas MTXs, seja ela aguda ou crônica. Deste modo, os valores máximos para presença desses contaminantes naturais nos alimentos foram delimitados, para que se possa oferecer o risco mínimo à saúde dos humanos e animais.

2.2.4 Fungos produtores e principais alimentos contaminados

Entender os fungos responsáveis pela produção de MTXs é fundamental, já que muitos desses fungos podem acometer uma ampla variedade de grãos e alimentos que fazem parte diariamente da dieta de humanos e de animais. O principal grupo de MTX, as aflatoxinas, são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus spp.*, entre as espécies desse gênero, podemos destacar o *Aspergillus flavus* (KLICH, 2007) (**Figura 1**), responsável pela produção principalmente das aflatoxinas B, e o *Aspergillus parasiticus*, que além das aflatoxinas B, podem produzir subtipos das aflatoxinas G (GIZACHEW *et al.*, 2019).



Fonte: Adaptado de KLICH (2007). (A) Esquema do conidióforo de *Aspergillus flavus*; (B) Imagem superior esquerdo, cultura de *A. flavus* quando incubado durante 7 dias em ágar CYA, superior direito, conidióforo de *A. flavus*, imagem inferior esquerdo e direito, Conídios do *A. flavus*.

Outra espécie que é relatada em poucos estudos é o *Aspergillus nomius*, este último quando presente em alimentos podem gerar aflatoxinas subtipos B e G, no entanto em quantidades pequenas. Entre os alimentos que frequentemente são acometidos, destacam-se o amendoim, milho, trigo, arroz, castanha-do-pará, avelã, nozes, frutas secas, óleos vegetais e cacau (ALSHANNAQ; YU, 2017). Também se observa que a partir do metabolismo de animais expostos às aflatoxinas, os subtipos M₁ e M₂ podem ser gerados no organismo do animal, afetando alguns produtos como o leite, as carnes e ovos (DAOU *et al.*, 2020; PRANDINI *et al.*, 2009).

A OTA foi primeiramente isolada de cepas da espécie *Aspergillus ochraceus* no ano de 1965. Em anos posteriores foi identificado que outras espécies do gênero *Aspergillus spp.*, como o *A. niger/carbonarius*, e do gênero *Penicillium spp.*, como o *P. verrucosum*, também podem produzir a OTA. Regiões com condições climáticas caracterizadas por serem quentes e úmidas favorecem o crescimento dos fungos de espécies do gênero *Aspergillus*, com isso a OTA acaba acometendo os mesmos gêneros alimentícios que as aflatoxinas, destacando-se aveia, cevada e trigo. O fato de fungos como o *P. verrucosum* também produzirem a OTA faz com que em regiões de clima frio o predomínio de OTA em alimentos seja advindo justamente desta espécie (KHOURY; ATOUI, 2010). Além dos cereais, o vinho recentemente também entrou na lista de principais fontes de OTA, pesquisas tem mostrado que derivados de uva são responsáveis por cerca de 10 a 15% da ingestão total da OTA (FREIRE *et al.*, 2017).

Outro destaque são as fumonisinas, estas são produzidas por fungos do gênero *Fusarium spp.*, principalmente as espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum*. A característica principal desses fungos é atuar na colonização da rizosfera (região de contato do solo com as raízes) e conseqüentemente todo sistema vegetal da planta. Essas MTXs apresentam elevada prevalência no milho e seus derivados, sendo responsável em muitos casos pelo processo de podridão das espigas, gerando muitas perdas ao longo de sua fase pré-colheita (KAMLE *et al.*, 2019).

No âmbito do gênero *Fusarium spp.*, outras espécies apresentam a capacidade de produzir a zearalenona (ZEA), desoxinivalenol (DON) e a toxina T-2, todas MTXs que estão presentes em menor quantidade nos alimentos, mas não menos importantes, pois a ocorrência de algumas delas podem gerar processos graves de intoxicação. Cereais, como o milho e a cevada, frutas, como a banana e o tomate, podem ser afetados por essas MTXs. Como consequência da vasta

quantidade de fungos que podem acometer variados alimentos e a dificuldade em impedir a presença deles, os órgãos de saúde pelo mundo estão procurando garantir a segurança alimentar do consumidor com a criação de medidas de regulamentação (ALSHANNAQ; YU, 2017; BALENDRES; KARLOVSKY; CUMAGUN, 2019; BARAC, 2019).

2.2.5 Legislação

A partir dos diversos riscos que as MTXs podem oferecer a saúde humana e de animais, efeitos inevitáveis disso são as perdas econômicas que acometem muitos dos países produtores de grãos e cereais. O fato de muitos países adotarem medidas de controle para presença desses contaminantes nos alimentos, teve como intuito a proteção de seus consumidores contra as nocividades que as MTXs representam. Apesar desse controle, embargos ainda são realizados por parte de grandes regiões econômicas, como a Europa, para alimentos oriundos de países que negligenciam o controle dos níveis de MTXs, gerando graves déficits nas exportações de commodities (PRESTES *et al.*, 2019).

Determinar níveis de tolerância para uma substância é um processo bastante complexo. Dada as diferenças entre as populações e a grande diversidade que isso representa, fica explícita a resposta que diferentes grupos étnicos podem ter a uma determinada toxina. Em consequência da busca para o estabelecimento dos níveis seguros para saúde humana e de animais, é constante a tentativa de melhorar as metodologias para análise e detecção de tais compostos, bem como a realização de pesquisas de toxicidade mais robustas que embasem os valores que são determinados como toleráveis pelo organismo humano e animal (SOLHAUG; ERIKSEN; HOLME, 2016; WANG, Y. *et al.*, 2012). De maneira geral, órgãos de controle governamentais se responsabilizam por esses processos, além de constantemente revisar e atualizar as normas baseados nas mudanças e resultados de pesquisas que são publicados anualmente, quanto ao risco de determinada substância, incluindo as MTXs (PRESTES *et al.*, 2019).

O fato de países como o Brasil dependerem muito das exportações de commodities, torna-se necessário o acompanhamento das legislações dos países que se configuram seus principais clientes na compra, como a União Europeia, Estados Unidos, países asiáticos, entre outros. Desta forma, em 2011, a ANVISA

(Agência Nacional de Vigilância Sanitária) regulamentou através da resolução nº 7, os LMT para as MTXs, sendo necessário para toda empresa que produza, distribua e comercialize as categorias de alimentos, bebidas e matérias-primas elencadas no documento, respeitar os LMT de acordo com que foi publicado na resolução. Importante salientar, que a resolução nº 7/2011 implementou os LMT de forma gradual até 2017. No início de 2017, uma nova resolução foi publicada, nº 138, onde um novo cronograma foi estabelecido até 2019. Em virtude das resoluções e suas respectivas modificações até o ano de 2019, a **tabela 2** apresenta os valores para os LMT das principais MTXs e alimentos afetados, que estão disponíveis até o momento.

2.3 MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DAS MICOTOXINAS

Muitos dos fungos que acometem os alimentos na fase de pré-colheita podem ser identificados a partir de análises morfológicas dos cereais, grãos e até mesmo do corpo da planta. Apesar desses indícios favorecerem a contenção dos contaminantes, em grandes plantações fica difícil essa análise e controle, conseqüentemente, o alimento passa contaminado para fases seguintes que compreendem o transporte, armazenamento e processamento. Nessas etapas, fatores como umidade e temperatura, bem como manejo inadequado dos alimentos, estocando em ambientes inadequados, podem favorecer o desenvolvimento de fungos produtores de MTXs (BALENDRES; KARLOVSKY; CUMAGUN, 2019).

Apesar das dificuldades apresentadas para conter a presença das MTXs, ao longo do tempo, pesquisas foram direcionadas para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem de maneira rápida a identificação de alimentos contaminados, permitindo um maior controle de qualidade (TURNER *et al.*, 2015). De modo geral, para a determinação dos níveis das MTXs em amostras de alimentos, etapas de obtenção da amostragem, extração, limpeza e finalmente detecção e quantificação, são utilizadas na rotina de grandes centros de análises, a sequência desse processo pode ser observado no **fluxograma 1**.

Tabela 2 – Limites máximos toleráveis para presença das principais micotoxinas em alimentos.

Micotoxinas	Alimentos	LMT (µg/kg)
Aflatoxina M₁	Leite fluido	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5
Aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂	Cereais e derivados	5
	Feijão	5
	Castanhas, nozes, avelãs, amêndoas e pistaches	10
	Frutas desidratadas e secas	10
	Cereais e derivados para consumo infantil	1
	Produtos de cacau e chocolates	5
	Amendoim, milho, milho em grão, farinhas ou sêmolas de milho	20
Ocratoxina A	Feijão e café torrado/solúvel	10
	Suco e polpa de uva, vinhos e seus derivados	2
	Frutas secas e desidratadas	10
	Produtos de cacau e chocolate	5
Fumonisininas B₁, B₂	Milho para processamento	5000
	Alimentos a base de milho para alimentação infantil	200
	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica	1500
	Amido de milho e outros produtos	1000
Zearalenona (ZEA)	Milho em grão e trigo para processamento	40
	Farinha de trigo, massas, crackers, cereais e derivados, incluindo cevada maltada	100
	Arroz integral	400
	Farelo de arroz	600
	Milho de pipoca, canjica e produtos a base de milho	150
	Trigo integral, farinha de trigo, farelo de trigo	200
Desoxinivalenol (DON)	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1000
	Farinha de trigo, massas, biscoito de água e sal, produtos de panificação, cereais, cevada maltada	750

Fonte: Adaptado de BRASIL (2011) e BRASIL (2017).

2.3.1 Etapas de pré-processamento das amostras

É importante estabelecer que os programas de vigilância trabalham para que os produtos apresentem garantia de qualidade. Independente do programa adotado, as etapas que envolvem a preparação e coleta da amostragem, configura o

momento inicial do processo até de fato a amostra estar viável para uso em laboratório, permitindo a detecção das MTXs. Todo esse processo configura uma etapa crucial para a decisão da viabilidade ou não em aprovar o lote inteiro a qual a amostra faz parte (ALSHANNAQ; YU, 2017; KIBUGU *et al.*, 2021).



Fonte: Adaptado de ALSHANNAQ; YU (2017).

Apesar da independência na tomada de decisão sobre as medidas adotadas pelos órgãos de fiscalização e controle de qualidade, é importante que um plano conciso de análise seja realizado, partindo da obtenção de pontos de amostragem claramente identificados, a separação desses pontos em lotes e por fim, a coleta e preparação da amostra (KIBUGU *et al.*, 2021). Delinear esse plano de maneira correta garante investigar a heterogeneidade de distribuição das MTXs e conseqüentemente, resultados mais fidedignos das concentrações dessas toxinas nos alimentos analisados. Planos de amostragem foram estabelecidos por grandes agências internacionais, a exemplo da própria União Europeia e do departamento de agricultura dos Estados Unidos da América, proporcionando que outros países possam usá-las como suporte para implementação em sua cadeia de controle de qualidade (TURNER *et al.*, 2015).

Com a coleta da amostra representativa, as etapas seguintes são responsáveis por transformar essa amostra, através da implementação de técnicas específicas, em um produto que possa ser analisado laboratorialmente. O processo se inicia com a extração das MTXs a partir do emprego de solventes sobre as amostras trituradas, posteriormente, procedimentos de limpeza são empregados a fim de garantir a sensibilidade e especificidade dos métodos de detecção (SHEPHARD, 2008). Para extração, muitas amostras podem ser submetidas à interface líquido-líquido (*LLE - liquid-liquid extraction*), exemplos como o leite e vinhos. Essa metodologia configura como o processo mais simples e barato, permitindo a separação do composto de interesse a partir de sua solubilidade no solvente empregado na extração e na insolubilidade dos interferentes com o mesmo solvente (SONG *et al.*, 2013).

O bom uso desse tipo de extração pode ser observado no controle de qualidade de vinhos para avaliação dos LMT da OTA, que se encontra muito presente nesse tipo de bebida. No entanto, a maioria das amostras analisadas são sólidas, sendo necessário utilizar a extração de interface sólido-líquido para separar as MTXs de grãos e cereais, por exemplo. Dada a complexidade das matrizes em que se encontram as MTXs, a escolha dos métodos de extração tende a obedecer a alguns critérios, como as propriedades químicas das MTXs, onde a maioria é solúvel em solventes orgânicos como metanol, acetonitrila, entre outros, e a técnica que será utilizada para detecção das mesmas (REITER; ZENTEK; RAZZAZI, 2007; WANG *et al.*, 2016).

Para realizar a limpeza, etapa importante na eliminação dos interferentes, a técnica de LLE é o modelo mais simples como relatado acima, para os demais procedimentos a extração em fase sólida (SPE) apresenta variantes com o emprego de colunas, como a de troca iônica, de imunoafinidade (IAC), microfibras, entre outros. As colunas de troca iônica e por imunoafinidade são as mais utilizadas por representarem procedimentos mais rápidos, seguros e reprodutíveis (REITER; ZENTEK; RAZZAZI, 2007). De maneira geral, o processo de extração e limpeza realizado através das técnicas de SPE são baseadas na utilização de um cartucho, que configura a fase estacionária, que contém um adsorvente sólido responsável por reter as MTXs que estão presentes e diluídas com o extrato, que configura a fase móvel (TURNER *et al.*, 2015).

Como diferença básica entre as colunas de troca iônica e de imunoafinidade, temos que na primeira os sorventes são grupos funcionais que, de acordo com a natureza química das MTXs, podem variar entre grupos etil, octil, fenil, aminopropil entre outros, permitindo estabelecer a funcionalidade de retenção das MTXs no cartucho. Enquanto as colunas de imunoafinidade apresentam anticorpos específicos para uma determinada MTX, sendo todos os outros componentes da fase móvel e de não interesse removidos por uma etapa de lavagem. Em ambas as colunas, com as MTXs isoladas, uma nova etapa de lavagem é realizada, através da utilização de solventes miscíveis para as MTXs, permitindo assim seu isolamento para em seguida ser aplicado os métodos de separação e quantificação (ALSHANNAQ; YU, 2017).

Em suma, ao fim das etapas de pré-processamento das amostras, elas são condicionadas para uma grande variedade de métodos que podem ser escolhidas para sua análise e quantificação. A seguir vamos abordar algumas dessas técnicas que atualmente estão em uso para estes fins.

2.3.2 Métodos cromatográficos

A cromatografia vem sendo abordada como a principal metodologia para análise das MTXs. Muitas das publicações que envolvem a implementação e melhoramento da sensibilidade de análise desses compostos, envolvem o emprego de metodologias cromatográficas (YANG *et al.*, 2022). A cromatografia em camada delgada (CCD) é o mais simples dos métodos e com isso tem seu uso bastante limitado, sendo utilizado em alguns testes de triagem de grãos e cereais, a partir do uso em conjunto com técnicas de densitometria ou mesmo com uma simples avaliação visual baseado na fluorescência que algumas MTXs apresentam naturalmente (TURNER *et al.*, 2015).

Apesar da simplicidade, estudos já mostraram que a CCD pode se sobressair em relação a técnicas como a ELISA, apresentando sensibilidades aceitáveis para análises de muitos alimentos (LI *et al.*, 2013). A cromatografia gasosa (CG) também dispõe de recursos limitados para estudo das MTXs, problemas como a alta volatilidade desses compostos requer a necessidade de etapas de derivatização para que a técnica seja eficiente. Apesar dos empecilhos, alguns estudos aplicam a

CG juntamente com a espectrometria de massas (MS) na análise de algumas MTXs de natureza volátil, como a patulina (MARSOL-VALL *et al.*, 2016).

Com a tendência da necessidade de métodos mais robustos, a cromatografia líquida de alto desempenho (CLAE) ganha destaque, pois pode ser acoplada com detectores, à exemplo da espectrometria de massas, de modo que o uso de detectores de fluorescência, de diodos e ultravioleta, possibilitam uma maior versatilidade para a análise e quantificação das MTXs, bem como o aperfeiçoamento da metodologia frente a necessidade da detecção de níveis cada vez mais sensíveis (TURNER *et al.*, 2015).

A CLAE acoplado ao MS e ao detector de fluorescência (DFL) são considerados padrão-ouro, sendo indicado como métodos de referência pela Associação Internacional de Químicos Analíticos e pelo Comitê Europeu de Normalização. Com essas referências, toda nova técnica que se dispõe a oferecer uma alternativa como método de detecção e quantificação das MTXs tende a estabelecer um comparativo com valores que são obtidos através destas técnicas. Algumas pequenas características de ambas as técnicas possibilitam avaliar em que ambiente elas apresentam melhor vantagem nas análises. A literatura relata que a CLAE-DFL proporciona vantagens na detecção multianalítica (MUSCARELLA *et al.*, 2011a). Contudo, apesar da boa sensibilidade apresentada pela técnica, as etapas de pré-análise são muito laboriosas demandando muito tempo até o resultado ser obtido (MUSCARELLA *et al.*, 2011b). Já o CLAE-MS, apresenta maiores sensibilidades, bem como tempos reduzidos ao longo de toda análise. Também observa-se informações estruturais, além da possibilidade de implementação de diferentes interfaces de ionização que garantem o aprimoramento da técnica frente as diversas matrizes em que as MTXs se encontram (HUANG *et al.*, 2019).

2.3.3 Outros métodos aplicados para detecção de micotoxinas

Entre os métodos alternativos e que apresentam ótimos resultados, podemos destacar metodologias analíticas que empregam anticorpos. O estabelecimento de um sistema antígeno-anticorpo como princípio na detecção de moléculas já se encontra com vasta informação na literatura, o uso de anticorpos com alta especificidade oferecem uma grande versatilidade de aplicações e combinações

com outras técnicas (AZRI *et al.*, 2018; CHAUHAN *et al.*, 2016; PEI *et al.*, 2013; RAMAKRISHNA; MEHAN, 1993).

O ELISA é o procedimento mais simples, sendo empregado em kits comerciais para triagem rápida das MTXs, abrangendo as principais: aflatoxinas, OTA e fumonisinas. Para detecção desses compostos, o princípio básico da técnica é seguido, estabelecendo uma competição entre as MTXs presentes no extrato das que estão revestidas na superfície dos poços, por anticorpos específicos, atuando desta forma como antígenos (AZRI *et al.*, 2018). Apesar do emprego em kits comerciais, o uso na rotina pode representar um custo elevado dado a necessidade do uso de vários kits específicos para cada MTX em processos que necessitem da detecção de múltiplos compostos, além da presença de reações cruzadas, dificultando a obtenção dos índices de contaminação.

O desenvolvimento de testes imunocromatográficos de fluxo lateral configuram como testes de campo e possibilitam análises mais rápidas, sendo denominados de testes rápidos. Estudos já relatam a capacidade desta técnica em detectar múltiplas MTXs, como o estudo de Li *et al.* (2013). A estratégia desse trabalho envolveu reações competitivas em uma membrana de nitrocelulose contendo uma linha de aflatoxina B₁, outra de OTA e por fim de zearalenona. Os resultados dos LMT foram de 0,25 ng/ml, 0,5 ng/ml e 1 ng/ml, respectivamente, obtendo essas análises de amendoim, milho e arroz contaminados naturalmente. O tempo médio do teste ficou em torno de 20 minutos, contudo problemas como a baixa reprodutibilidade e longos processos na fabricação desses testes, ainda resultam em empecilhos na confiabilidade do método, que ainda necessitam de confirmações através do uso do CLAE-MS, técnica padrão-ouro para esses compostos.

Algumas técnicas já apresentam boa aceitação quanto à velocidade de análise e valores detectados das MTXs nos alimentos, mesmo apresentando pequenas desvantagens. Outras técnicas emergentes abrem margem para o emprego dessas metodologias na rotina laboratorial, fornecendo sensibilidade e reprodutibilidade semelhantes ao padrão-ouro. Um exemplo, é a funcionalização de anticorpos com partículas superparamagnéticas, que possibilitam identificar a reação de antígeno-anticorpo através da detecção magnética por mistura de frequência, e que através do emprego de um leitor portátil permite que a técnica seja aplicada nas análises de campo (PIETSCHMANN *et al.*, 2020).

Também podemos destacar o desenvolvimento de sensores baseados no uso de aptâmeros. Guo *et al.* (2014) utilizaram um aptâmero sintetizado especificamente para a aflatoxina B₁, imobilizado através de biotinizilação na superfície do tubo de PCR e hibridizado com um fragmento de DNA complementar. A ligação da toxina promove um deslocamento desse complexo resultando em mudança do sinal que é amplificado via PCR, permitindo a detecção e quantificação dos níveis de MTXs na solução preparada. Esse tipo de estratégia fornece valores bastante sensíveis, no entanto se configuram por várias etapas de preparo e por representar uma técnica onerosa para implementação em rotinas laboratoriais (CASTILLO *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2014).

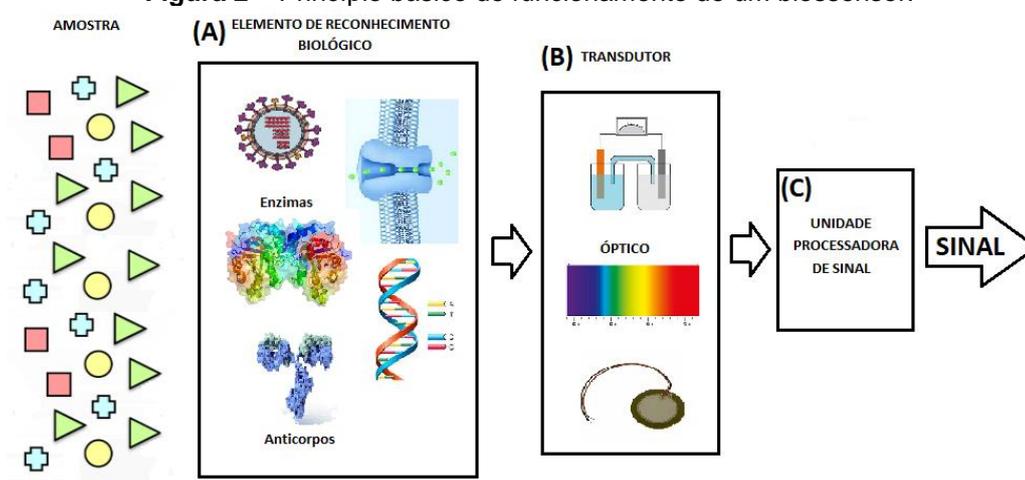
Como podemos observar, apesar da disponibilidade de muitas técnicas, ainda existe a necessidade do desenvolvimento de procedimentos de menor custo, rápidos e sensíveis, que possam oferecer vantagens as que são aplicadas atualmente. Com essa abordagem, estudos com biossensores estão ganhando atenção considerável, pois atuam como técnicas confiáveis, de análises rápidas e com baixo custo, quando comparamos com todas as técnicas já mencionadas.

2.4 BIOSSENSORIAMENTO ESTOCÁSTICO

Partindo da capacidade de alguns dispositivos em transformar informações provenientes de reações químicas de uma amostra em sinais mensuráveis, os sensores químicos são dispositivos que através do emprego de dois componentes, sendo eles um sistema de reconhecimento molecular e um transdutor, torna todo esse processo possível (PRABOWO *et al.*, 2021). Os biossensores podem ser enquadrados nessa classe de dispositivos. Segundo a IUPAC (do inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*), um biossensor configura-se como uma ferramenta analítica que, através da presença de um elemento de reconhecimento biológico, gera informações que podem ser quantitativas ou semiquantitativas, por meio de sinais químicos ou físicos que são então captados por um transdutor. Acerca do elemento de reconhecimento biológico, que podemos denominar como biorreceptor, pode este ser representado por proteínas ou estruturas proteicas mais complexas (canais iônicos, enzimas, anticorpos), ácidos nucleicos (DNA, RNA) e por fim, células ou vírus em sua integralidade (THEVENOT *et al.*, 1999).

O modelo básico de funcionamento de um biossensor pode ser representado em etapas (**Figura 2**), sendo resumido à presença de três componentes essenciais. Temos inicialmente a escolha do biorreceptor de alto grau de seletividade e sensibilidade para a detecção do analito de interesse. Em seguida, sua integração com o transdutor, que resulta no fornecimento de todas as informações advindas das alterações físico-químicas que o biorreceptor pode sofrer ao reagir com o analito. Finalmente, o uso de ferramentas eletrônicas que são capazes de captar todas essas informações, tornando-as mensuráveis e passíveis de visualização em telas de computadores (BHALLA *et al.*, 2016; THEVENOT *et al.*, 1999).

Figura 2 – Princípio básico de funcionamento de um biossensor.



Fonte: autoria própria (2023).

Os transdutores podem se apresentar em diferentes naturezas e irão possibilitar a emissão de um sinal inteligível com a detecção do analito pelo biossensor. Podemos classificar os transdutores em dois grandes grupos: os eletroquímicos, entre eles os amperométricos, potenciométricos e condutimétricos; e os não eletroquímicos, são eles os ópticos, piezoelétricos e os calorimétricos. De maneira geral, os transdutores eletroquímicos estão em fases mais avançadas de uso, principalmente os amperométricos e potenciométricos, dada a capacidade de manipulação e desenvolvimento destes tipos de componentes e o grau de confiabilidade em captar as respostas das alterações do biorreceptor (BHALLA *et al.*, 2016; THEVENOT *et al.*, 1999).

Em meados de 1953, o emprego de poros micrométricos que permitiam a contagem de partículas e depois comercializados em contadores de células

sanguíneas, recebeu o nome de contadores de Coulter (*Coulter counter*), já que seu idealizador, Wallace H. Coulter, foi o responsável por estudar e propor o uso dessas estruturas para esses fins. A ideia inicial proposta ao usar esse mecanismo de contagem de células, permitia estabelecer uma relação entre as partículas que passavam através do microporo e alterações na corrente iônica, identificando em número e tamanho as partículas que permeavam o poro. A busca para empregar dispositivos versáteis para detecção de um número cada vez maior de compostos estimulou, nos anos 90, estudos que consideravam o uso de canais iônicos dependentes de voltagem como elemento de reconhecimento molecular, entendendo que o princípio inicialmente visto no contador de Coulter, poderia ser aplicado com canais iônicos (ROBERTSON *et al.*, 2007).

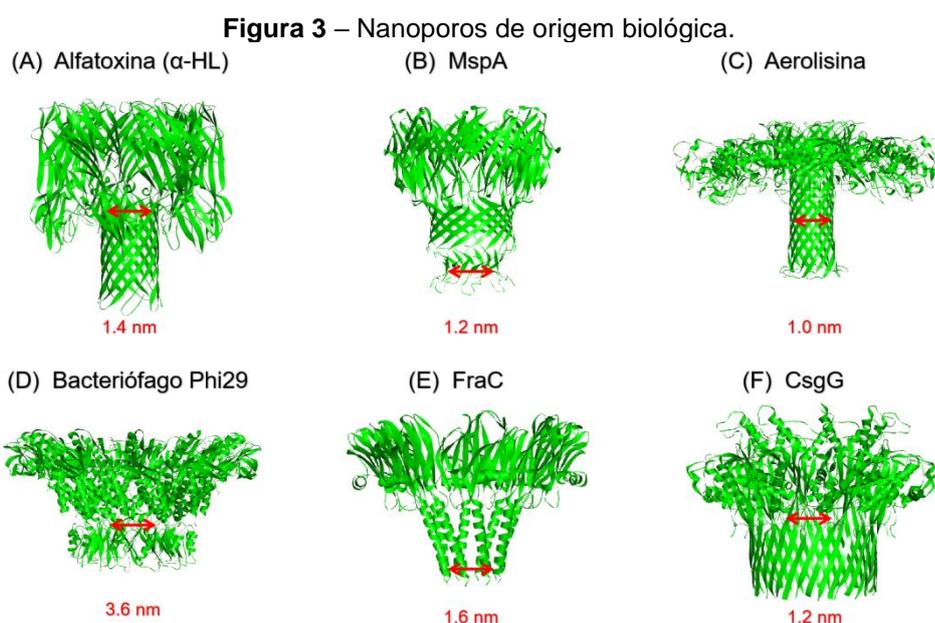
Ao considerar um canal iônico como objeto de detecção de analitos, uma abordagem já mencionada na literatura, que é o biossensoriamento estocástico, permite entender o princípio de funcionamento desse biossensor. De maneira mais ampla, os canais iônicos ou também chamados nanoporos proteicos, são macromoléculas encontradas de maneira natural nas membranas biológicas e que desempenham importante função na homeostase celular. Fatores como a percepção de parâmetros físicos, capacidade de reconhecimento e seletividade de espécies químicas, favorecem a exploração dos nanoporos proteicos como ferramenta de biossensoriamento estocástico para detecção, monitoramento, quantificação e caracterização de moléculas de maneira individual (AGUIAR *et al.*, 2015; BHATTI *et al.*, 2021; BAYLEY; CREMER, 2001).

Quando uma molécula individualmente interage com um único nanoporo, o monitoramento dos eventos de ligação entre ambas as estruturas embasa a maneira pelo qual o biossensor estocástico trabalha. A denominação estocástica é atribuída à série temporal aleatória de flutuações discretas registradas, devido à detecção por um único nanoporo de cada molécula do analito, portanto, as moléculas são detectadas uma a uma, ou seja, de maneira unitária. A aleatoriedade do sistema se deve ao fenômeno físico da difusão unicamente como responsável por conduzir a amostra a ser analisada através do interior do nanoporo, caracterizando o princípio da técnica (RODRIGUES *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2013).

Buscando canais iônicos que mimetizem a ação dos muitos canais presentes nas membranas celulares de mamíferos e que possibilitem seu uso como biossensor, estudos desenvolveram nanoporos artificiais com objetivo de detecção

de moléculas, a exemplo do DNA, polinucleotídeos, entre outros. Contudo, limitações quanto ao grau de precisão e caracterização dessas moléculas são algumas das desvantagens do uso dessa classe de nanoporo (DIEDERICHS *et al.*, 2019).

Com isso, outras abordagens procuraram trabalhar com poros de origem biológica (**Figura 3**), já que certas toxinas bacterianas ou de animais marinhos podem induzir a formação de nanoporos proteicos em bicamadas lipídicas das mais variadas células, configurando um mecanismo de patogenicidade ao hospedeiro, causando em muitos casos a lise celular e problemas decorrente desse processo. Bactérias como o *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis* e *Aeromonas hydrophila*; bem como invertebrados marinhos, à exemplo das anêmonas-do-mar, apresentam a capacidade de produzir toxinas formadoras de nanoporos proteicos (AGUIAR *et al.*, 2015; BHATTI *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2013).



Fonte: Adaptado de BHATTI *et al.* (2021). Estrutura cristalográfica dos nanoporos de origem biológica. As setas vermelhas retratam as regiões de constrição dos poros, foco da literatura como principal região de interação dos nanoporos com as biomoléculas de interesse. Seus respectivos diâmetros estão destacados em vermelho. (A) Nanoporo da alfatoxina proveniente do *Staphylococcus aureus*; (B) *Mycobacterium smegmatis* porina A (MspA); (C) Aerolisina produzido pela *Aeromonas hydrophila*; (D) Poro conector do bacteriófago Phi29; (E) Actinoporina formada a partir da fragaceatoxina C (FraC), liberada pela anêmona-do-mar *Actinia fragacea*; (F) Nanoporo formado através da secreção da lipoproteína externa CsgG de *Escherichia coli*.

Entre as bactérias mencionadas acima, podemos destacar o *Staphylococcus aureus* responsável por produzir a alfatoxina ou também denominada alfa-

hemolisina (α -HL), uma toxina que em condições propícias pode se oligomerizar e formar um nanoporo heptamérico nas membranas, principalmente de hemácias (KRASILNIKOV *et al.*, 2000). A versatilidade de trabalhar com a formação de poros desta toxina em membranas artificiais, possibilitou o amplo emprego da α -HL como um biossensor estocástico para detecção, caracterização e análise de um vasto número de substâncias, incluindo polímeros artificiais (poli(etileno glicol) - PEG), naturais (DNA) e contaminantes ambientais (microcistinas) (AGUIAR *et al.*, 2015; BAYLEY; CREMER, 2001; KASIANOWICZ *et al.*, 1996; ROBERTSON *et al.*, 2007; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2019).

O uso da α -HL como biossensor está associado às várias vantagens que o nanoporo pode oferecer, como estrutura cristalográfica bem elucidada, possibilidade de mudanças em sua estrutura com aplicação da engenharia molecular, alta condutância e capacidade de permanecer aberto por longos períodos em condições experimentais, este último quando controladas as condições de pH, força iônica, temperatura e potencial elétrico aplicado no sistema. Como podemos observar, a α -HL pode representar o modelo ideal de nanoporo proteico, a seguir abordaremos sua estrutura e funcionamento na detecção das moléculas (AGUIAR *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2013).

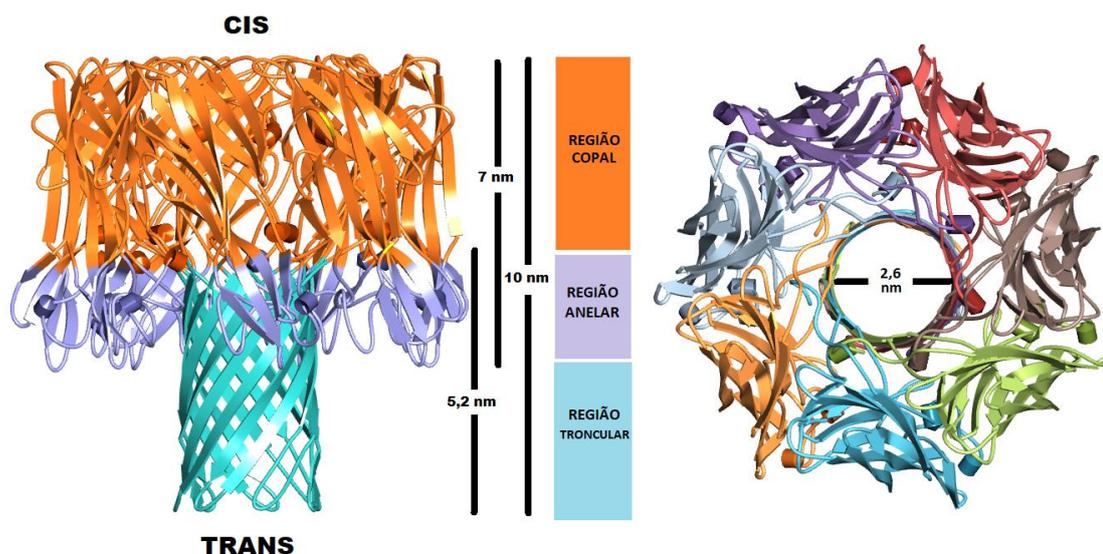
2.4.1 Alfatoxina

O modelo de nanoporo proteico formado pela alfatoxina do *Staphylococcus aureus* é caracterizado em sua forma mais simples pela secreção da alfatoxina em meios aquosos, com tamanho de 33 KDa, na forma de monômeros polipeptídicos de 293 aminoácidos, sendo classificada como uma exotoxina (KRASILNIKOV *et al.*, 2000). Devido a suas características de solubilidade, pode se apresentar de duas formas, uma solúvel em água, já mencionamos acima, e a segunda, um poro proteico quando inserida em membranas biológicas ou até mesmo em bicamadas artificiais, configurando uma estrutura mais estável da toxina (AGUIAR *et al.*, 2015).

Para entender melhor acerca do nanoporo proteico formado pela exotoxina do *Staphylococcus aureus*, a alfatoxina, na literatura já foi apresentada a estrutura cristalográfica bem elucidada do poro, conforme apresentado na **Figura 4**. Essa estrutura tridimensional foi primeiramente relatada por Song *et al.* (1996), através de dados de cristalografia de raio-X em resolução de 1,89 Å. Importante entender que a

base de estudos que levaram ao esclarecimento da estrutura do nanoporo foi iniciada em 1980 com a descoberta do gene responsável por codificar a proteína e estudos de reconstituição do canal em bicamadas lipídicas artificiais em 1981, por meio de estudos de eletrofisiologia (SONG *et al.*, 1996).

Figura 4 – Estrutura cristalográfica do nanoporo formado pela alfatoxina.



Fonte: Adaptado de AGUIAR *et al.* (2015). Ilustração da estrutura cristalográfica da alfatoxina. À esquerda, temos a vista lateral do nanoporo proteico para distinção das regiões **copal**, **anelar** e **troncular**. Também observa-se as indicações das regiões CIS e TRANS do nanoporo. À direita, vista superior em destaque para identificação das sete subunidades que compõem a formação do nanoporo da alfatoxina, as subunidades estão destacadas em cores distintas. Os barramentos verticais à esquerda, indicam os valores de comprimento de cada região e a barra horizontal à direita, o diâmetro da cavidade interna do nanoporo.

A partir da estrutura cristalográfica do nanoporo da alfatoxina, foram delimitadas três regiões, denominadas: copal ou extramembranar; troncular ou intramembranar; e anelar. De maneira convencional, podemos configurar as regiões troncular e anelar como região de entrada “TRANS”, por esses dois domínios estarem ancorados na membrana. Enquanto a região copal pode ser chamada de região de entrada “CIS”, por representar a parte do nanoporo voltada para o meio externo da membrana. A região CIS apresenta maior diâmetro, cerca de 4,6 nm, já a região TRANS apresenta um diâmetro aproximado de 2 nm. Também ocorre do nanoporo apresentar uma cavidade de menor diâmetro, cerca de 1,4 nm, representado pelo ponto de intersecção das regiões CIS e TRANS no interior do nanoporo. Essa constrição é vista na literatura como uma região de possível maior

interação do nanoporo frente a biomoléculas que são analisadas (AGUIAR *et al.*, 2015; BAYLEY; CREMER, 2001; KRASILNIKOV *et al.*, 2000; SONG *et al.*, 1996).

2.4.2 Princípio de funcionamento do biossensor utilizando o nanoporo da alfatoxina como elemento de reconhecimento biológico

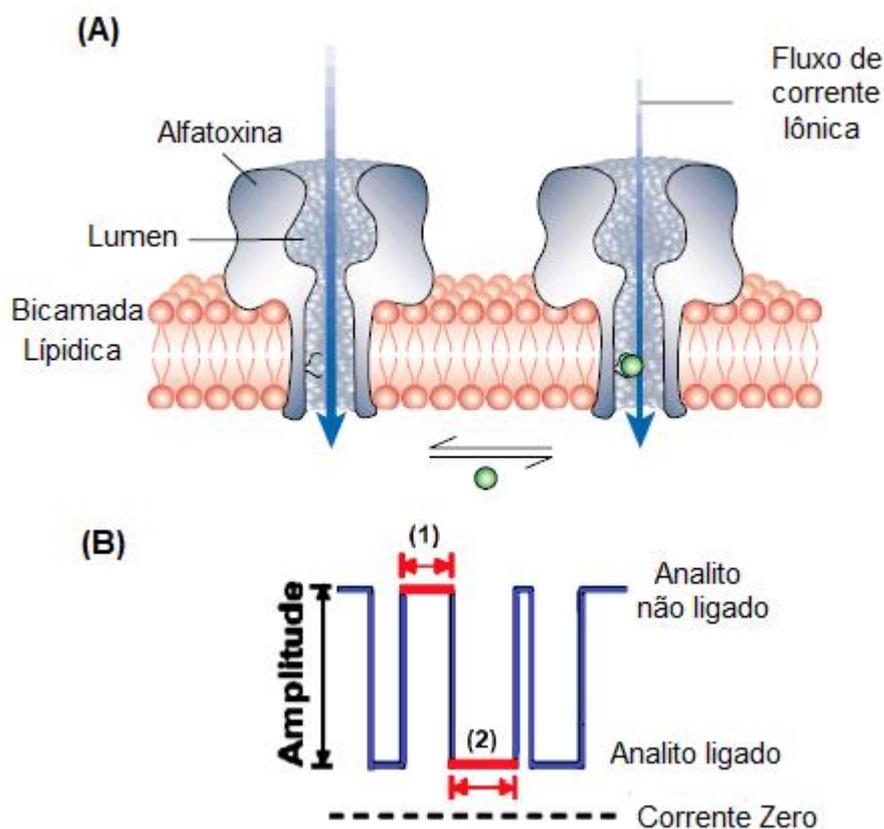
Para o funcionamento do biossensor, a exotoxina do *Staphylococcus aureus* precisa se oligomerizar, dando origem a estrutura heptamérica do nanoporo em uma bicamada lipídica artificial. O processo de inserção do poro nas membranas ainda não é bem elucidado, alguns estudos dão conta que para formação da base β -barril e oligomerização do poro na membrana, a toxina, quando secretado no meio aquoso na forma de monômeros, se liga à superfície celular através da ação de componentes proteicos, são eles o Hlg2 e LukF (YAMASHITA *et al.*, 2014). Na membrana, um processo de dimerização ocorre entre essas estruturas proteicas permitindo a exposição da região N-amino terminal. O deslocamento dessa região, localizada próxima do domínio copal, permite a interação entre os monômeros, formando então a região pré-troncular e que rapidamente evolui para um pré-poro, onde a base β -barril se encontra apenas na região extramembranar. Por fim, com a inserção da porção transmembranar do β -barril, o nanoporo é formado em sua totalidade (ULHUQ; MARIANO, 2022; YAMASHITA *et al.*, 2014).

Entendendo um pouco o processo de inserção e oligomerização do nanoporo, o princípio da técnica envolve o estabelecimento de um único nanoporo em uma bicamada lipídica artificial banhada por uma solução salina em ambos os lados da membrana. A partir da aplicação de um potencial elétrico transmembrana, uma corrente iônica é gerada, fluindo por todo o lúmen do nanoporo da alfatoxina. Ao adicionar o analito na solução banhante e de acordo com o princípio de difusão das moléculas como relatado anteriormente, o analito entra e ocupa o lúmen do nanoporo, induzindo uma variação discreta da corrente, denominado de bloqueio de corrente iônica (**Figura 5A**) (MISAWA; OSAKI; TAKEUCHI, 2018).

Na situação mais simples, considere que o nanoporo apresente dois estados, ocupado (pelo analito) e não-ocupado, e associado a cada um dos respectivos estados um sinal característico de saída. Para este sinal, podemos definir como uma série de flutuações de bloqueio, onde a frequência da ocorrência desses bloqueios está relacionada com a concentração do analito, enquanto os valores médios dos

tempos de duração no estado ocupado e de amplitude dos bloqueios permitem a identificação do analito. O conjunto dessas informações representam uma “impressão digital” da amostra analisada (**Figura 5B**) (AGUIAR et al., 2015).

Figura 5 – Esquema de funcionamento do nanoporo da alfatoxina como biossensor estocástico.



Fonte: Adaptado de BAYLEY; CREMER (2001). (A) Exemplo representativo do nanoporo da alfatoxina inserido em uma bicamada lipídica plana. No nanoporo à esquerda, apresentação do fluxo de corrente iônica através do lúmen do nanoporo proveniente da aplicação de um potencial transmembrana, dado a presença de soluções iônicas que banham ambos os lados da bicamada. No nanoporo à direita, a partir da presença de analitos na solução, a interação de uma única molécula ocorre de maneira reversível; (B) A interação dos mais variados analitos induz uma modulação da corrente iônica máxima caracterizado por um bloqueio na corrente iônica, com tempo e amplitude específicos para cada analito. (1) **estado não ocupado** do lúmen do nanoporo, (2) **estado ocupado** devido a interação do analito com lúmen do nanoporo.

Com a série de flutuações de bloqueios registrada, referente ao analito de interesse, os tempos de duração de cada bloqueio podem ser analisados e descritos estatisticamente por uma distribuição exponencial. Neste contexto, a constante de ajuste desta distribuição exponencial é definida como o tempo médio do bloqueio (τ_{off}). Com os valores de τ_{off} e as amplitudes geradas pelos analitos ao longo da série, temos então a “impressão digital” do mesmo. Para a frequência de eventos, a constante também obedece a uma distribuição exponencial, representada pela

constante de ajuste τ_{on} , indicando o intervalo médio entre os bloqueios. O inverso do valor de τ_{on} corresponde à frequência de ocorrência desses eventos ($f = 1/\tau_{on}$), sendo este parâmetro proporcional à concentração do analito (BAYLEY; CREMER, 2001; KASIANOWICZ *et al.*, 2008).

A possibilidade de avaliação de todos esses parâmetros a partir da série de bloqueios registrados da interação de forma unitária das moléculas do analito com o nanoporo da alfatoxina, proporciona à técnica de biossensoriamento estocástico baseado nesse nanoporo, um método de análise promissora, por quantificar e caracterizar as mais variadas substâncias, de maneira rápida e sensível.

2.4.3 Aplicações do biossensor estocástico do nanoporo da alfatoxina

O uso de biossensores estocásticos baseados na alfatoxina já possibilita de maneira acadêmica detectar, quantificar e caracterizar diversas classes de biomoléculas. Estudos usando polímeros sintéticos evidenciaram a capacidade da técnica na discriminação do PEG de diferentes pesos moleculares. Nesses estudos, o papel desempenhado pelo nanoporo da alfatoxina é análogo a técnicas mais robustas e caras como o MALDI-TOF, no entanto com a vantagem de análises rápidas e de forma não destrutiva desses polímeros (ROBERTSON *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2008). Para estudos na área que envolve polímeros biológicos, o biossensor vem sendo bastante proposto como técnica de sequenciamento e estudo da translocação do ácido desoxirribonucleico de fita simples (ss-DNA) (MISAWA; OSAKI; TAKEUCHI, 2018). Estudos também mostram a capacidade do biossensor na identificação de eventos epigenéticos, como a metilação do DNA (ZENG *et al.*, 2015) e no mapeamento da presença de precursores carcinogênicos em oligodesoxinucleotídeos sintéticos (PERERA *et al.*, 2015).

Na literatura, estudos com o biossensor da alfatoxina também apresentam a capacidade de detecção e quantificação de pequenas moléculas orgânicas como produtos da hidrólise de agentes químicos organofosforados (gases nervosos) (GUPTA *et al.*, 2012) e compostos que podem ser usados na fabricação de explosivos, como o TNT (GUAN *et al.*, 2005; LIU; ZHAO; GUAN, 2010). Esse tipo de abordagem torna promissor o uso do biossensor estocástico no combate e prevenção do terrorismo. Também é possível o estudo da dinâmica de dobramento de proteínas, processo influenciado fortemente pelos sais e pH do meio, sendo

importante para o entendimento das dinâmicas conformacionais que estão envolvidas no surgimento de doenças como o Alzheimer e Parkinson (HU *et al.*, 2016; MEREUTA *et al.*, 2014).

Estudos promissores abordam a capacidade do biossensor na detecção de marcadores de cânceres, mais especificamente a técnica foi testada quanto a eficiência na detecção e sensibilidade para a mucina-1 epitelial (MUC1), glicoproteína expressa no câncer de mama. Dado a necessidade de novas ferramentas que propiciem o diagnóstico precoce, o biossensor da alfatoxina mostrou-se com alta seletividade e capaz de analisar amostras de soro (TIAN *et al.*, 2022).

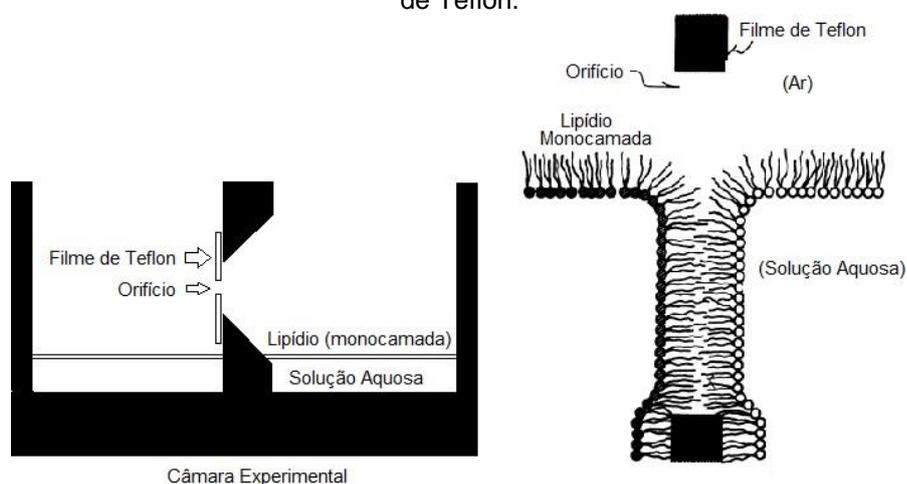
Outra abordagem que vem ganhando destaque é a implementação do sensor da alfatoxina na detecção de drogas ilícitas, à exemplo da cocaína (KAWANO *et al.*, 2011), e no monitoramento de contaminantes ambientais (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2019) e toxinas alimentares (LI *et al.*, 2022). O estudo estabelecido por nosso grupo de pesquisa evidenciou a capacidade de distinção, detecção e quantificação das microcistinas, uma cianotoxina que quando está presente na água inviabiliza seu consumo devido aos grandes problemas renais que podem causar (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2019). Por fim, recentemente a técnica foi utilizada para detecção de micotoxina, mais especificamente a OTA, contudo de maneira indireta através da associação de adaptadores moleculares (LI *et al.*, 2022).

2.4.4 Modelos de formação das bicamadas lipídicas planas

Membranas artificiais podem ser trabalhadas basicamente de duas formas: como (1) estruturas vesiculares pequenas, a exemplo dos lipossomas (LI *et al.*, 2019); e (2) estruturas planas simples que podem separar duas fases aquosas (MISAWA; OSAKI; TAKEUCHI, 2018). Importante salientar que ambas as metodologias apresentam vantagens de acordo com os objetivos de análise que são traçados nas pesquisas. No entanto, para os fins de sensoriamento, o uso das vesículas dificulta o controle das soluções internas, enquanto os sistemas de bicamadas planas têm se mostrado de fácil controle quanto ao manejo das soluções, apresentam estratégias que já fornecem suas formações livres de solventes, além da capacidade elétrica muito próxima das membranas biológicas (AGUIAR *et al.*, 2015).

Um dos grandes desafios das técnicas que empregam sensores estocásticos na detecção de moléculas, diz respeito à estabilidade do sistema de suporte para esses canais, que em muitos casos, a presença de problemas na durabilidade e estabilidade do sistema são responsáveis, em grande parte, pelas limitações dos dispositivos baseados nessa metodologia (AGUIAR *et al.*, 2015). Muitos dos métodos atuais de fabricação de bicamadas lipídicas planas utilizam películas finas poliméricas de Teflon, com a presença de orifícios de tamanho na casa dos micrômetros e que permitem a formação suspensa das bicamadas lipídicas planas (Figura 6).

Figura 6 – Estrutura de montagem das bicamadas lipídicas planas em orifícios presentes nos filmes de Teflon.



Fonte: Adaptado de MONTAL; MUELLER (1972).

Com o avanço das litografias, o desenvolvimento de orifícios menores possibilita aumento da durabilidade e estabilidade das membranas bem como a acomodação de um único nanoporo, proporcionando maior facilidade no desenvolvimento de dispositivos estocásticos (ROSENSTEIN *et al.*, 2012). Outras abordagens na fabricação das bicamadas lipídicas planas, podem envolver suportes sólidos, através da formação de filmes lipídicos na superfície de materiais como vidros, mica e silício hidrofóbicos (GORNALL *et al.*, 2011; STUDER *et al.*, 2009). Contudo, ainda não apresentam a facilidade de manejo e outras vantagens já mencionadas acima quanto ao método estabelecido por Montal e Mueller (1972).

É evidente que com o avanço das tecnologias e vislumbrando a criação de técnicas mais automatizadas e que possibilitem o emprego de métodos como o biossensoriamento estocástico baseado no nanoporo da alfatoxina em análises de

campo, recentemente os sistemas miniaturizados estão ganhando destaque, a exemplo dos sistemas microfluídicos ou microarray, como também são chamados (SAHA *et al.*, 2015). Esse tipo de tecnologia permite um controle maior quanto às soluções, padronização fina das biomoléculas analisadas com alto rendimento e alta sensibilidade, favorecendo análises mais rápidas que os padrões convencionais de montagem para bicamadas lipídicas planas (SAHA *et al.*, 2014; SAHA *et al.*, 2015).

Apesar dos ganhos em estabilidade, o processo de formação de membranas no interior desses canais ainda possuem desvantagens e estudos mais atuais procuram refinar a fabricação desses dispositivos quanto ao corte e formação dos microcanais, com o objetivo de melhorar a formação das bicamadas (FUNAKOSHI; SUZUKI; TAKEUCHI, 2006; SAHA *et al.*, 2015). Portanto, estudos que utilizam a metodologia tradicional, como arcabouço para análises na área do biossensoriamento estocástico, ainda estão em evidência permitindo avaliar diversos processos de interesse científico, aplicando em estudos de translocação de ácidos nucleicos (WANG *et al.*, 2020), polímeros sintéticos (MACHADO *et al.*, 2016), detecção de íons metálicos (WEI; YAO; KANG, 2018), esporos e toxinas bacterianas (PARK *et al.*, 2018) e quando customizado com amplificadores e demais instrumentos portáteis, torna-se uma técnica possível para análises em qualquer ambiente (LI *et al.*, 2022).

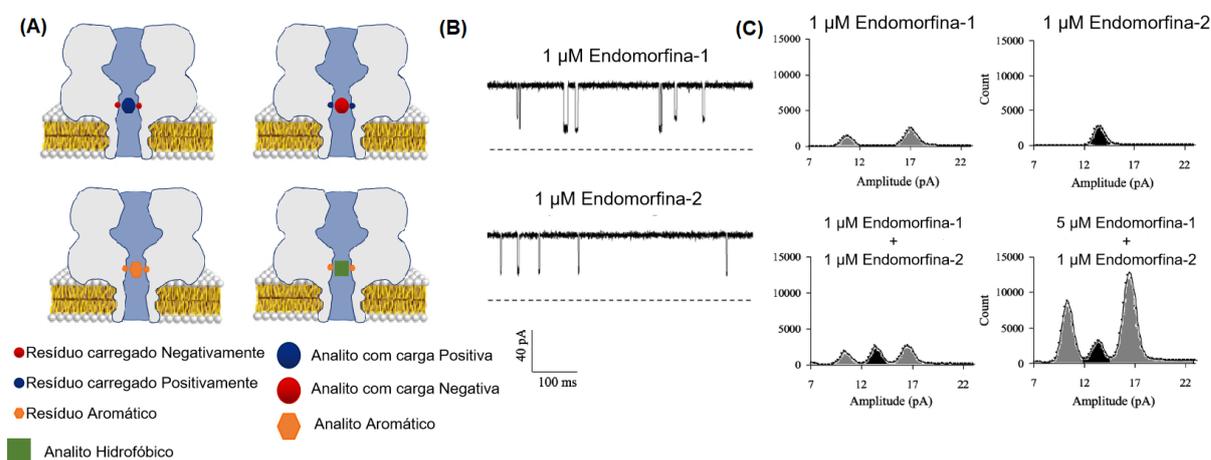
2.4.5 Influência da solução banhante e da engenharia molecular sobre os nanoporos na detecção de biomoléculas

A interação de biomoléculas com nanoporos proteicos ou sintéticos como elemento sensor em ambientes confinados são fortemente influenciados pela solução banhante. Fatores como a escolha da composição e concentração iônica da solução, voltagem, viscosidade e pH atuam diretamente na capacidade de detecção e sensibilidade que o biossensor pode apresentar (MACHADO *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2020). De acordo com as características químicas das biomoléculas analisadas, torna-se essencial avaliar essas condições que serão adotadas com intuito de otimizar a técnica. Procedimentos de engenharia molecular nos poros proteicos também podem melhorar as condições de biossensoriamento, esses processos utilizam-se da introdução de resíduos carregados ou de adaptadores em regiões cruciais do processo de detecção dos poros (**Figura 7A**). Importante frisar

que essas alternativas podem ser associadas para ampliar a capacidade de detecção dos nanoporos (CHEN *et al.*, 2021; WEI; YAO; KANG, 2018).

Nessa perspectiva, os estudos procuram adotar diferentes estratégias para melhorar a investigação de diversos processos e ampliar a margem de biossensoriamento do nanoporo da alfatoxina frente a diversas biomoléculas. Chen *et al.* (2021) propuseram a inserção de resíduos mutantes na posição ocupada pela metionina 113, localizado na região de constrição da alfatoxina (zona mais estreita e considerada região primária de reconhecimento do nanoporo). A ideia foi criar um sítio de reconhecimento para interações não covalentes a partir de grupos funcionalizados que tivessem a capacidade de detectar e discriminar moléculas catiônicas, aniônicas, aromáticas e hidrofóbicas. Essa abordagem foi eficiente na diferenciação de peptídeos de mesma carga e aromaticidade, bem como com estrutura e peso molecular quase idênticos. Um exemplo testado no estudo foi com a endomorfina-1 e a endomorfina-2, em que a alteração sutil de um aminoácido, entre essas moléculas, resultou em eventos de bloqueio com assinaturas diferentes (amplitude e os seus respectivos tempos de bloqueios) (**Figura 7B e C**).

Figura 7 – Estratégias de engenharia molecular para detecção e discriminação dos analitos.



Fonte: Adaptado de CHEN *et al.* (2021). (A) Representação gráfica do nanoporo da alfatoxina demonstrando um exemplo de região no lúmen do nanoporo para inserção de mutações. Essas mutações podem, através de ligações não covalentes, atuarem na discriminação de analitos pertencentes a mesma categoria e/ou de estruturas moleculares idênticas. As formas geométricas fazem alusão às características que podem ser adotadas para os resíduos localizados no lúmen da alfatoxina e dos analitos. (B) Registros de corrente iônica da Endomorfina-1 (gráfico superior), e Endomorfina-2 (gráfico inferior). (C) Histogramas de todos os pontos do perfil de corrente iônica adquirido por cada uma das moléculas, proveniente da implementação das estratégias de inserção das mutações, propiciando a diferenciação de ambos os compostos quando presentes simultaneamente em solução.

O uso de adaptadores moleculares no interior da alfatoxina desempenham alternativas promissoras, pois permitem ajustar a técnica para detecção de moléculas específicas. Gu *et al.* (1999) foram pioneiros na implementação da β -ciclodextrina (β CD) associada ao nanoporo da alfatoxina para detecção de moléculas orgânicas. O uso das ciclodextrinas apresentam a vantagem de formar uma cavidade hidrofóbica para detecção de diversos analitos orgânicos, dada a capacidade de concepção de um anel no interior do poro de modo reversível, sendo retido por resíduos de leucina na posição 135 do nanoporo ou por resíduos de metionina, lisina e ácido glutâmico, nas posições 113, 147 e 111, respectivamente. Com o grande desafio de prolongar a permanência desse adaptador no interior do nanoporo, foram introduzidas mutações que permitiram elevar a ligação na ordem de 1000 vezes quando comparado ao uso do nanoporo em sua forma selvagem (sem mutações) (BANERJEE *et al.*, 2010; GU; CHELEY; BAYLEY, 2001).

Estudos mais recentes introduziram outros adaptadores, Wei; Yao; Kang (2018) estudaram o 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenil)-porfirina (TPPS) para detecção de íons metálicos, o TPPS atuou como uma sonda de reconhecimento para testes usando o Cu^{2+} . Foram obtidas assinaturas bem características na presença do TPPS isoladamente e quando o Cu^{2+} é capturado (complexo alfatoxina-TPPS- Cu^{2+}), com uma relação linear à medida que a contração do Cu^{2+} é aumentada (faixa de detecção de 0,03 nM - 1 μ M). Aptâmeros podem ser utilizados como mostrado por Li *et al.* (2022), cujo os autores utilizaram um aptâmero específico para micotoxina (OTA) associado a partículas magnéticas. Essas sondas na presença da OTA, em solução banhante do nanoporo da alfatoxina, liberam a fita simples de DNA que, conseqüentemente, são detectados pelo nanoporo. Todos esses modelos descritos até aqui, apesar de avançarem com alterações que ampliam a detecção de moléculas pelo biossensor, também implicam no aumento da complexidade da técnica. Na literatura, abordagens utilizando unicamente o nanoporo da alfatoxina em seu estado selvagem, podem ter o processo de reconhecimento molecular melhorado através de mudanças na composição da solução banhante, caracterizando modelos mais simples.

Kawano *et al.* (2009) investigaram a influência da viscosidade e de como a alteração deste parâmetro poderia auxiliar na redução da translocação do DNA de fita simples. Utilizando o glicerol para atingir viscosidade de até 18,5 mPa s em solução de 1 M de KCl, a velocidade de translocação da fita simples de DNA foi

reduzida em aproximadamente 20 vezes, quando comparado com a solução padrão sem glicerol. Contudo, nessas condições a condutância vai ser comprometida.

Wang *et al.* (2020) introduziram uma solução de Cloreto de cálcio (CaCl_2) no lado TRANS, mantendo uma solução padrão no CIS (Cloreto de potássio - KCl) para retardar a translocação do DNA e RNA através da formação de um gradiente de fluxo ao redor do nanoporo da alfatoxina. A taxa de captura do DNA também reflete a eficiência que envolve a aplicação dos nanoporos nas análises de DNA. Wanunu *et al.* (2010) utilizando poros sintéticos ampliaram a taxa de captura do DNA em até 30 vezes através da implementação de um gradiente salino. As condições assimétricas adotadas, de 0,2 M do lado CIS e 4 M no TRANS, aumentam a faixa de potencial na região próximo da boca do poro, tornando maior o efeito polarizado da fita, quebrando com mais facilidade a barreira de energia livre. Todos esses procedimentos partiram da adição do DNA no lado CIS e importante frisar que para o uso desses modelos de soluções assimétricas para melhorar a detecção de outras biomoléculas, estas ficam condicionadas a presença de carga residual.

Através do uso de soluções simétricas, nosso grupo evidenciou que o aumento da concentração da solução salina banhante de 1 para 4 M, de KCl, eleva a resolução de interação entre polímeros e o nanoporo da alfatoxina. Nas condições adotadas, moléculas inertes (PEG) atuaram como moléculas carregadas, sendo a análise desta condição uma possível elucidação para estudos da interação de outras moléculas de mesma natureza com o nanoporo (RODRIGUES *et al.*, 2008). Procurando entender os processos envolvidos nesse aumento, Rodrigues *et al.* (2010) avaliaram a influência dos ânions halogenados e como o efeito *salting-out* interfere nesses mecanismos de interação. Os dados provenientes deste estudo sugerem que os parâmetros cinéticos da interação analito-nanoporo da alfatoxina são fortemente influenciados por cada ânion, estabelecendo uma competição entre íons e o analito (PEG) pela água. Esse sistema pode ser apontado como uma possível razão para os efeitos de Hofmeister.

Nesse sentido, Silva Júnior *et al.* (2019) demonstraram a capacidade da técnica, a partir da utilização de solução simétrica de KCl 4 M, na detecção e discriminação das microcistinas. O grau de hidratação da solução e as interações eletrostáticas foram fatores considerados para que o biossensor pudesse detectar esta classe de cianotoxinas. Este fato, e corroborando com os estudos de Rodrigues *et al.* (2010), demonstram que a metodologia é promissora para o melhoramento da

sensibilidade do nanoporo da alfatoxina como biossensor, bem como para aplicação da técnica na detecção e elucidação de novos processos biológicos envolvendo a interação de novas biomoléculas com o nanoporo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar o nanoporo proteico individual da alfatoxina no desenvolvimento de um método analítico livre de adaptadores para detecção de micotoxinas em solução aquosa.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

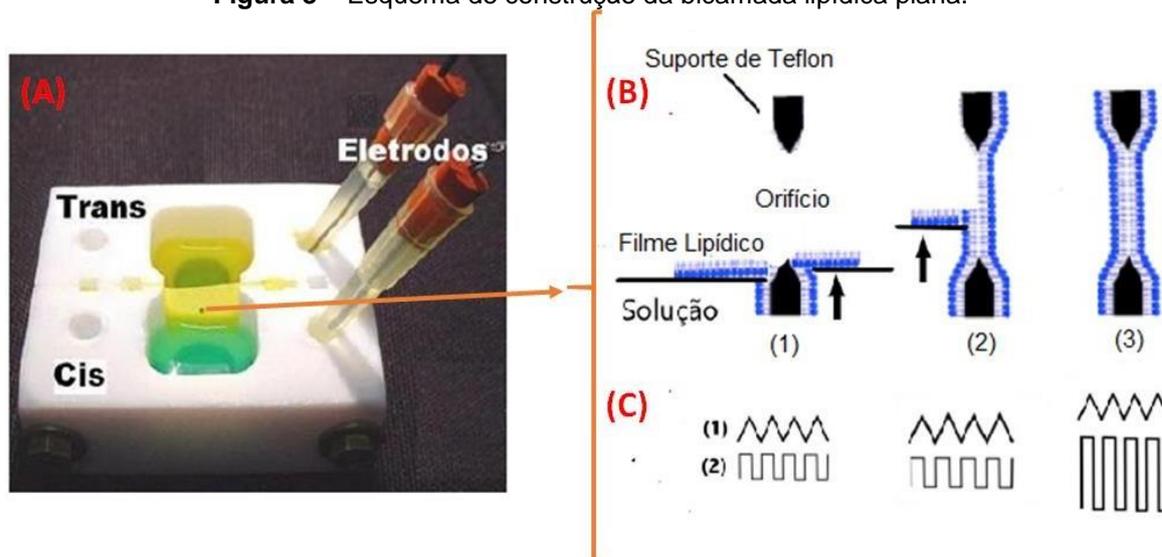
- Montagem da bicamada lipídica seguindo a técnica de Montal & Mueller (1972) para caracterização inicial das micotoxinas;
- Estudar a translocação de micotoxinas (aflatoxina B₁, ocratoxina A e fumonisina B₁) com o nanoporo proteico individual da alfatoxina na presença do ânion cloreto e do cátion potássio (KCl), nas concentrações de 1 e 4 M;
- Determinar os parâmetros característicos de cada micotoxina: tempo médio de bloqueio (τ_{off}), intervalo médio entre os bloqueios (τ_{on}) e valores de corrente residual (I/I_0);
- Determinar os limites de detecção e sensibilidade do nanoporo da alfatoxina para as micotoxinas (aflatoxina B₁, ocratoxina A e fumonisina B₁) em solução aquosa.

4 METODOLOGIA

4.1 CONSTRUÇÃO DAS BICAMADAS LIPÍDICAS PLANAS

A primeira etapa que envolve a construção das bicamadas lipídicas planas transcorreu de acordo com a técnica de Montal & Mueller (1972). Com algumas adaptações, utilizamos uma câmara experimental de Teflon®, dividida em dois compartimentos (CIS e TRANS) a partir da presença de uma partição fina também de Teflon®. Ao centro da partição, um orifício de 80 µm permitiu o contato entre as soluções aquosas, contendo em sua superfície filmes lipídicos monomoleculares. À medida que ocorreu o encontro dessas soluções no orifício, a bicamada lipídica foi sendo formada por justaposição (**Figura 8**).

Figura 8 – Esquema de construção da bicamada lipídica plana.



Fonte: Adaptado de Rodrigues (2006). (A) Fotografia da câmara experimental de Teflon®, com a representação dos lados CIS e TRANS, e contato dos eletrodos responsáveis por estabelecer conexão com o sistema eletrônico. (B) Etapas de formação da bicamada lipídica: (1) presença do filme lipídico da superfície da solução, (2) elevação da solução do lado TRANS para formação da primeira monocamada no orifício da partição de Teflon®, (3) Bicamada lipídica formada após a elevação da solução no lado CIS. (C) Monitoramento da formação da bicamada; (1) onda triangular aplicado no sistema, (2) resposta da corrente capacitiva.

Para formação dos filmes lipídicos na superfície das soluções aquosas (KCl 1 ou 4 M, TRIS 5 mM, pH 7.5) contidas nos lados CIS e TRANS da câmara experimental, adicionamos a solução do lipídio diftanoil glicerofosfolina (*Avantis Polar Lipids-USA*) dissolvido em hexano (*Merck*), no volume de 10 µl, para cada um dos lados. A formação das monocamadas ocorreu de maneira espontânea, logo

após a evaporação do hexano, apresentando um tempo médio de 10 minutos da adição da solução até a efetiva evaporação do solvente. Com a formação do menisco lipídico, inicialmente a solução do lado “TRANS” foi elevada para formação da primeira monocamada e posteriormente a solução do lado “CIS” foi elevada para conclusão da formação da bicamada. Para controle das soluções contidas na câmara experimental, um conjunto de seringas foram conectadas a ambos os lados, permitindo a adição da solução aquosa e sua elevação ao nível superior ao do orifício. Em todos os experimentos, o sistema de formação da bicamada lipídica foi acompanhado a partir das medidas de capacitância do sistema e temperatura ambiente de 25 ± 2 °C.

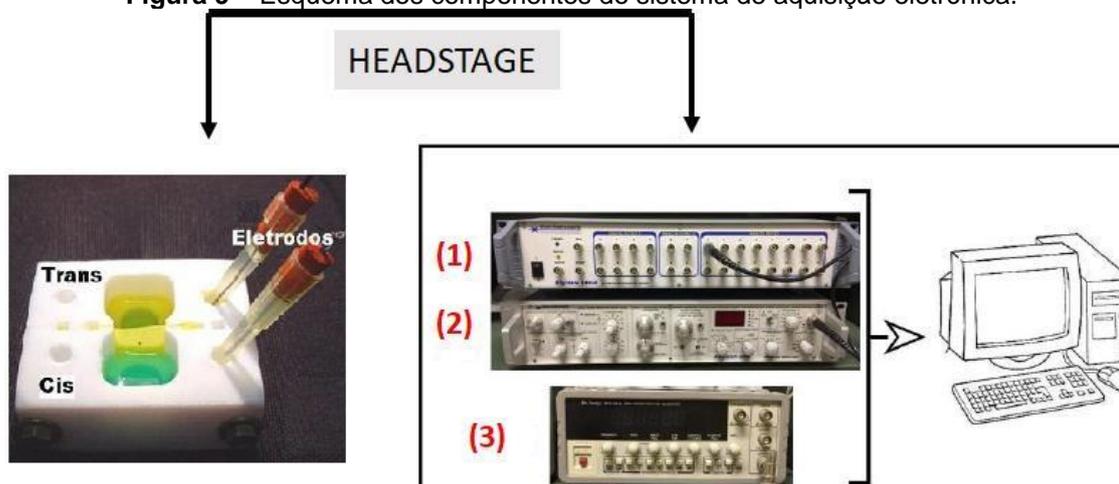
Com a bicamada lipídica artificial formada, o processo de incorporação de um único nanoporo da alfatoxina (*Calbiochem*, USA) foi realizado através da adição, no lado “CIS” da membrana, da solução estoque contendo a alfatoxina (0,07 mg/ml), no volume que variou entre 0,2-0,5 μ l alcançando a concentração final de ~ 2 ng/ml. Com o sistema formado, as micotoxinas foram adicionadas no lado “TRANS” da câmara experimental em concentrações partindo de 0.71 nM até 10 μ M. Todas as MTXs foram diluídas em metanol (Merck, Darmstadt, Germany). Por fim, um protocolo padrão de voltagem foi seguido, através da aplicação do potencial transmembrana ± 200 mV (com incrementos de 20 mV), para que os eventos de bloqueios pudessem ser monitorados.

4.2 SISTEMA ELETRÔNICO PARA AQUISIÇÃO DAS “ASSINATURAS DIGITAIS” DAS MICOTOXINAS EM TEMPO REAL

Em todos os experimentos o sistema eletrônico utilizado para aplicação do potencial transmembrana, monitoramento e aquisição dos registros foi constituído por um gerador de funções (*Hewlett Packard*, modelo 3310B), um filtro *Butterworth* (*Frequency devices*, modelo 902), um amplificador de patch clamp (*Axonpatch 200B*, *Molecular devices*, USA) e uma placa conversora analógico-digital (Digidata 1440) acoplada a um microcomputador, executando o Programa pClamp 10 (*Axon Instruments*). Com a finalidade de minimizar a interferência de perturbações mecânicas e eletromagnéticas, a câmara experimental foi colocada sobre uma mesa de amortecimento de alta performance (TMC 63-500) e blindada por uma gaiola de Faraday de alta eficiência (Amuneal Cage μ -metal). A conexão entre os

compartimentos da câmara experimental ao sistema eletrônico foi feita através de pontes salinas do tipo Ágar-KCl (3% em peso de Ágar em KCl 3 M) e eletrodos de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl) (**Figura 9**).

Figura 9 – Esquema dos componentes do sistema de aquisição eletrônica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023). Representação básica do sistema experimental conectado ao sistema de interface eletrônica. O modelo de aquisição de dados requer a presença de quatro componentes, são eles (1) gerador de função, (2) amplificador de patch clamp, (3) placa conversora analógico-digital e um microcomputador.

4.3 ANÁLISES DAS SÉRIES TEMPORAIS DE BLOQUEIOS DAS MICOTOXINAS

Os parâmetros necessários para caracterização e quantificação das micotoxinas foram adquiridos a partir do uso do software *Clampfit* (versão 10.7). O uso desse programa possibilitou a varredura das gravações e extração dos valores de corrente das amplitudes de bloqueio causados por cada MTX. Esses dados permitiram o cálculo da **corrente residual (I/I_0)**. Onde, I corresponde ao valor da corrente do nanoporo bloqueado (presença das MTXs) e I_0 o valor de corrente na ausência das MTXs. Também foram obtidos os valores dos tempos de permanência (*dwell time*) e “interbloqueios” (*interevent interval*). A análise desses parâmetros através de um histograma da frequência dos tempos no estado bloqueado e não bloqueado do nanoporo, são representados pelos **tempos médios de permanência (τ_{off})** e **“interbloqueios” (τ_{on})** respectivamente, onde a τ corresponde a exponencial traçada dos histogramas gerados. A partir desses dados primários, informações da cinética de interação entre as MTXs e o nanoporo podem ser calculados.

Para o cálculo das **constantes de associação (k_{on}), dissociação (k_{off}) e equilíbrio (k_f)** da cinética de interação analito-nanoporo, usamos as seguintes equações:

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

$$k_{off} = 1/\tau_{off} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$k_f = k_{on}/k_{off} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

k_{on} : Constante de associação

k_{off} : Constante de dissociação

k_f : Constante de formação

C: Concentração do analito

τ_{on} : Tempo médio “interbloqueios”

τ_{off} : Tempo médio de permanência

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O modelo tradicional de formação da bicamada lipídica plana foi eficiente para obtenção das análises com micotoxinas;
- O biossensor formado pelo nanoporo da alfatoxina é capaz de detectar e discriminar as micotoxinas simultaneamente;
- O fato do nanoporo da alfatoxina interagir de maneira única com variados analitos, permitem em suas análises identificar o perfil característico para cada molécula estudada. Analisando as gravações de corrente iônica das MTXs, foi possível identificar os perfis característicos individualizados (τ_{on} , τ_{off} e I/I_0) para a aflatoxina B₁, ocratoxina A, e fumonisina B₁, parâmetros estes fundamentais para identificação e discriminação simultânea das MTXs nas condições experimentais adotadas neste trabalho;
- Estabelecer estratégias menos onerosas tornam-se fundamentais no desenvolvimento de métodos de detecção para as MTXs. Corroborando com estudos anteriores de nosso grupo, pudemos concluir que a simples alteração na composição da solução banhante do biossensor da alfatoxina, criaram condições para detecção das MTXs. Este fato foi possível graças a utilização de solução com alto grau de hidratação (KCl 4 M), que influenciou positivamente na sensibilidade do biossensor e na capacidade de detecção das MTXs;
- Face os avanços no desenvolvimento de métodos analíticos para as MTXs, é importante que estes apresentem a capacidade de detecta-las nos níveis preconizados por agências de controle, à exemplo da ANVISA. A metodologia abordada em nosso trabalho, a partir da utilização do nanoporo da alfatoxina como biossensor, indicam que os limites de detecção foram na ordem de 0,8 nM (aflatoxina B₁), 1 nM (ocratoxina A) e 0,45 nM (fumonisina B₁). Todos esses valores estão em conformidade com as necessidades requeridas pelas agências de controle para a detecção e quantificação dessas substâncias;
- Por fim, o nanoporo da alfatoxina representa uma técnica promissora para caracterização de micotoxinas em soluções aquosas.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ALSHANNAQ, A.; YU, J. H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 6, p. 632, 2017.
- ANSARI, F.; POURJAFAR, H.; CHRISTENSEN, L. A study on the aflatoxin M1 rate and seasonal variation in pasteurized cow milk from northwestern Iran. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 191, n. 1, p. 6, 2018.
- ASAO, T. *et al.* Aflatoxins B and G. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 11, p. 1706–1707, 1963.
- AZRI, F. A. *et al.* Electrochemical immunosensor for detection of aflatoxin B 1 based on indirect competitive ELISA. **Toxins**, v. 10, n. 5, p. 1–13, 2018.
- AZZIZ-BAUMGARTNER, E. *et al.* Aflatoxin Investigative Group. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 12, p. 1779-83, 2005.
- BALENDRES, M. A. O.; KARLOVSKY, P.; CUMAGUN, C. J. R. Mycotoxigenic fungi and mycotoxins in agricultural crop commodities in the Philippines: A review. **Foods**, v. 8, n. 7, p. 1–12, 2019.
- BANERJEE, A. *et al.* Molecular bases of cyclodextrin adapter interactions with engineered protein nanopores. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 18, p. 8165-8170, 2010.
- BARAC, A. Mycotoxins and Human Disease. **Clinically Relevant Mycoses: A Practical Approach**, p. 213–225, 2019.
- BAYLEY, H.; CREMER, P. S. Stochastic sensors inspired by biology. **Nature**, v. 413, n. 13, p. 226–230, 2001.
- BENKERROUM, N. Chronic and Acute Toxicities of Aflatoxins: Mechanisms of Action. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 2, p. 423, 2020.
- BENNETT, J. W. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. **Mycopathologia**, v. 100, p. 3–5, 1987.
- BENNET, J. W.; MOORE, G. G. Mycotoxins. In SCHMIDT, T. M. (Org.). **Encyclopedia of Microbiology**. 4. ed. Elsevier, 2019. p. 267-273.
- BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497–516, 2003.

BRASIL. 2011. Resolução RDC n° 7, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União, 18/02/2011.

BRASIL. 2017. Resolução RDC n° 138, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União, 09/02/2017.

BHALLA, N. *et al.* Introduction to biosensors. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 1–8, 2016.

BHATTI, H. *et al.* Recent advances in biological nanopores for nanopore sequencing, sensing and comparison of functional variations in MspA mutants. **RSC Advances**, v. 11, p. 28996- 29014, 2021.

BIANCO, G. *et al.* Modulation of macrophage activity by aflatoxins B1 and B2 and their metabolites aflatoxins M₁ and M₂. **Toxicon**, v. 59, n. 6, p. 644–650, 2012.

BRADBURN, N.; COKER, R. D.; BLUNDEN, G. The aetiology of turkey “x” disease. **Phytochemistry**, v. 35, n. 3, p. 817, 1994.

CALADO, T.; VENÂNCIO, A.; ABRUNHOSA, L. Irradiation for mold and mycotoxin control: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 5, p. 1049-1061, 2014.

CARBALLO, D. *et al.* Dietary exposure assessment to mycotoxins through total diet studies. A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 128, n. March, p. 8–20, 2019.

CASTILLO, G. *et al.* Detection of aflatoxin B₁ by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform. **Food Control**, v. 52, n. 165, p. 9–18, 2015.

CHAUHAN, R. *et al.* Recent advances in mycotoxins detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 81, p. 532-545, 2016.

CHEN, X. *et al.* Nanopore Stochastic Sensing Based on Non-covalent Interactions. **Analytical Chemistry**, v. 93, p. 10974–10981, 2021.

DAMER, Bruce; DEAMER, David. The hot spring hypothesis for an origin of life. **Astrobiology**, v. 20, n. 4, p. 429-452, 2020.

DAOU, R. *et al.* Occurrence of aflatoxin M₁ in raw, pasteurized, UHT cows' milk, and dairy products in Lebanon. **Food Control**, v. 111, p. 107055, 2020.

DIEDERICHS, T. *et al.* Synthetic protein-conductive membrane nanopores built with DNA. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2019.

ESKOLA, M. *et al.* Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited ‘FAO estimate’ of 25%. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 16, p. 2773–2789, 2020.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins: Their implications for human and animal health. **Veterinary Quarterly**, v. 21, n. 4, p. 113–120, 1999.

FREIRE, L. *et al.* Influence of physical and chemical characteristics of wine grapes on the incidence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi in grapes and ochratoxin A in wines. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 181–190, 2017.

FRISVAD, J. C. *et al.* Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 93, p. 1-63, 2019.

FUNAKOSHI, K.; SUZUKI, H.; TAKEUCHI, S. Lipid bilayer formation by contacting monolayers in a microfluidic device for membrane protein analysis. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 24, p. 8169–8174, 2006.

GERMANO, P. M. L.; OLIVEIRA, C. A. F. De. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 417–424, 1997.

GIZACHEW, D. *et al.* Aflatoxin B₁ (AFB₁) production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on ground Nyjer seeds: The effect of water activity and temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 296, p. 8–13, 2019.

GORNALL, *et al.* Simple Reconstitution of Protein Pores in Nano Lipid Bilayers. **NANO Letters**, v. 11, n. 8, p. 3334–3340, 2011.

GRENIER, B.; APPLGATE, T. J. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: Meta-analysis of published experiments in animals. **Toxins**, v. 5, n. 2, p. 396–430, 2013.

GROOPMAN, J. D.; KENSLER, T. W.; WILD, C. P. Protective interventions to prevent aflatoxin-induced carcinogenesis in developing countries. **Annual Review of Public Health**, v. 29, p. 187–203, 2008.

GUAN, X. *et al.* Stochastic sensing of TNT with a genetically engineered pore. **ChemBioChem**, v. 6, n. 10, p. 1875–1881, 2005.

GUPTA, J. *et al.* Simultaneous detection of CMPA and PMPA, hydrolytes of soman and cyclosarin nerve agents, by nanopore analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 176, p. 625-631, 2013.

GU, L. Q. *et al.* Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. **Nature**, v. 398, p. 686–690, 1999.

GU, L. Q.; CHELEY, S.; BAYLEY, H. Prolonged Residence Time of a Noncovalent Molecular Adapter, β -Cyclodextrin, within the Lumen of Mutant α -Hemolysin Pores. **The Journal of General Physiology**, v. 118, n. 5, p. 481–494, 2001.

GUO, X. *et al.* Development of an ultrasensitive aptasensor for the detection of aflatoxin B₁. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 56, p. 340–344, 2014.

HU, Y. X. *et al.* Single molecule study of initial structural features on the amyloidosis process. **Chemical Communications**, v. 52, p. 5542-5545, 2016.

HUANG, P. *et al.* Development of an economic ultrafast liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for trace analysis of multiclass mycotoxins in *Polygonum multiflorum*. **Journal of Separation Science**, v. 42, n. 2, p. 491–500, 2019.

JETTANAJIT, A.; NHUJAK, T. Determination of Mycotoxins in Brown Rice Using QuEChERS Sample Preparation and UHPLC-MS-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 5, p. 720–729, 2016.

JEROME JEYAKUMAR, J. M., ZHANG, M., THIRUVENGADAM, M. Determination of mycotoxins by HPLC, LC-ESI-MS/MS, and MALDI-TOF MS in *Fusarium* species-infected sugarcane. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 98-110, 2018.

KAMLE, M. *et al.* Fumonisin: Impact on agriculture, food, and human health and their management strategies. **Toxins**, v. 11, n. 6, p. 328, 2019.

KAWANO, R. *et al.* Controlling the Translocation of Single-Stranded DNA through α -Hemolysin Ion Channels Using Viscosity. **Langmuir**, v. 25, n. 2, p. 1233–1237, 2009.

KASIANOWICZ, J. J. *et al.* Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 24, p. 13770-13773, 1996.

KASIANOWICZ, J. J. *et al.* Nanoscopic porous sensors. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 1, p. 736–766, 2008.

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.

KIBUGU, J. *et al.* Improved sample selection and preparation methods for sampling plans used to facilitate rapid and reliable estimation of aflatoxin in chicken feed. **Toxins**, v. 13, n. 3, p. 216, 2021.

KHOURY, A. E. EL; ATOUI, A. Ochratoxin a: General overview and actual molecular status. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 461–493, 2010.

KLICH, M. A. *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 6, p. 713–722, 2007.

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, n. 6, p. 1372–1378, 2000.

LEE, J. G. *et al.* Total diet studies as a tool for ensuring food safety. **Toxicological Research**, v. 31, n. 3, p. 221–226, 2015.

LI, M. *et al.* Composition design and medical application of liposomes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 164, p. 640–653, 2019.

LI, T. *et al.* An aptamer-assisted biological nanopore biosensor for ultra-sensitive detection of ochratoxin A with a portable single-molecule measuring instrument. **Talanta**, v. 248, p. 123619, 2022.

LI, X. *et al.* Multi-component immunochromatographic assay for simultaneous detection of aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone in agro-food. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 49, p. 426–432, 2013.

LIAO, Z. *et al.* Recent advances in microfluidic chip integrated electronic biosensors for multiplexed detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 121, p. 272–280, 2018.

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, 2010.

LOMBARD, M. J. Mycotoxin exposure and infant and young child growth in Africa: what do we know? **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 64, n. 2, p. 42–52, 2014.

LUPI, O.; TYRING, S. K.; MCGINNIS, M. R. Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, n. 6, p. 931–951, 2005.

MACHADO, D. C. *et al.* Effects of alkali and ammonium ions in the detection of poly(ethyleneglycol) by alpha-hemolysin nanopore sensor. **RSC Advances**, v. 6, n. 61, p. 56647–56655, 2016.

MARCHESE, S. *et al.* Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 1–19, 2018.

MARSOL-VALL, A. *et al.* A rapid gas chromatographic injection-port derivatization method for the tandem mass spectrometric determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices. **Journal of Chromatography A**, v. 1453, p. 99–104, 2016.

MEREUTA, L. *et al.* Quantitative Understanding of pH- and Salt-Mediated Conformational Folding of Histidine-Containing, β -Hairpin-like Peptides, through Single-Molecule Probing with Protein Nanopores. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, p. 13242–13256, 2014.

MISAWA, N.; OSAKI, T.; TAKEUCHI, S. Membrane protein-based biosensors. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 15, p. 20170952, 2018.

MUSCARELLA, M. *et al.* Simultaneous Determination of Aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in Foods and Feed Materials. **Microbial Toxins: Methods and Protocols**, p. 203–210, 2011a.

- MUSCARELLA, M. *et al.* Determination of fumonisins B1 and B2 in maize food products by a new analytical method based on high-performance liquid chromatography and fluorimetric detection with post-column derivatization. **Microbial Toxins: Methods and Protocols**, p. 187-194, 2011b.
- MONTAL, M.; MUELLER, P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, p. 3561–3566, 1972.
- NEŠIĆ K, HABSCHIED K, MASTANJEVIĆ K. Possibilities for the Biological Control of Mycotoxins in Food and Feed. **Toxins**, v 13, n. 3, p. 198, 2021.
- OANCEA, S.; STOIA, M. Mycotoxins: a review of toxicology, analytical methods and health risks. **Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology**, v. 12, n. 1, p. 19–36, 2008.
- PARK, J. *et al.* Nanopore based detection of *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores using aptamers and versatile DNA hairpins. **Nanoscale**, v. 10, n. 25, p. 11955-11961, 2018.
- PAVLOVIĆ, N. M. Balkan endemic nephropathy - Current status and future perspectives. **Clinical Kidney Journal**, v. 6, n. 3, p. 257–265, 2013.
- PEI, S. C. *et al.* Development of anti-zearalenone monoclonal antibody and detection of zearalenone in corn products from China by ELISA. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 65-70, 2013.
- PEREIRA, C.; CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Mycotoxins of Concern in Children and Infant Cereal Food at European Level: Incidence and Bioaccessibility. **Toxins**, v. 14, n.7, p. 488, 2022.
- PERERA, R. T. *et al.* Detection of benzo[a]pyrene-guanine adducts in single-stranded DNA using the α -hemolysin nanopore. **Nanotechnology**, v. 26, n. 7, p. 74002, 2015.
- PIETSCHMANN, J. *et al.* Sensitive aflatoxin B1 detection using nanoparticle-based competitive magnetic immunodetection. **Toxins**, v. 12, n. 5, p. 1–15, 2020.
- PINTON, P. *et al.* Deoxynivalenol impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression of claudin-4 through a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. **Journal of Nutrition**, v. 140, n. 11, p. 1956–1962, 2010.
- PITT, J. I.; J. MILLER, D. A Concise History of Mycotoxin Research. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 33, p. 7021-7033. 2017
- PRABOWO, B. A. *et al.* The challenges of developing biosensors for clinical assessment: A review. **Chemosensors**, v. 9, n. 11, p. 299, 2021.

PRANDINI, A. *et al.* On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 5, p. 984–991, 2009.

PRESTES, I. D. *et al.* Fungi and mycotoxins in corn grains and their consequences. **Scientia Agropecuaria**, v. 10, n. 4, p. 559–570, 2019

PROBST, C.; NJAPAU, H.; COTTY, P. J. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: Identification of the causal agent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2762–2764, 2007.

RAMAKRISHNA, N.; MEHAN, V. K. Direct and indirect competitive monoclonal antibody- based ELISA of Aflatoxin B₁ in groundnut. **Mycotoxin Research**, v. 9, n. 1, p. 53-63, 1993.

REITER, E., ZENTEK, J., RAZZAZI, E. Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed. **Mol Nutr Food Res**. v. 53, n. 4, p. 508-524, 2009.

ROBENS, J. F.; RICHARD, J. L. Aflatoxins in animal and human health. Reviews of **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 127, p. 69–94, 1992.

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. 8207–8211, 2007.

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. **Transporte de moléculas orgânicas através de poros nanoscópicos unitários**. Tese (doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

RODRIGUES C. G. *et al.* Hofmeister effect in confined spaces: halogen ions and single molecule detection. **Biophysical Journal**, v. 100, n. 12, p. 2929-35, 2011.

ROSENSTEIN, J. K. *et al.* Integrated nanopore sensing platform with sub-microsecond temporal resolution. **Nature Methods**, v. 9, n. 5, p. 487-492, 2012.

SAHA, S. C. *et al.* Scalable micro-cavity bilayer lipid membrane arrays for parallel ion channel recording. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 199, p. 76–82, 2014.

SAHA, S. C. *et al.* Screening ion-channel ligand interactions with passive pumping in a microfluidic bilayer lipid membrane chip. **Biomicrofluidics**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2015.

SHEPHARD, G. S. Determination of mycotoxins in human foods. **Chemical Society Reviews**, v. 37, p. 2468–2477, 2008.

- SILVA, I. M. M. *et al.* Incidence and Levels of Aflatoxin M₁ in Artisanal and Manufactured Cheese in Pernambuco State, Brazil. **Toxins**, v 15, n. 3, p. 182, 2023.
- SILVA JÚNIOR, J. J. *et al.* Alpha-hemolysin nanopore allows discrimination of the microcystins variants. **RSC Advances**, v. 9, n. 26, p. 14683–14691, 2019.
- SIPOS, P. *et al.* Physical and Chemical Methods for Reduction in Aflatoxin Content of Feed and Food. **Toxins**, v. 13, n. 3, p. 204, 2021.
- SOLHAUG, A.; ERIKSEN, G. S.; HOLME, J. A. Mechanisms of Action and Toxicity of the Mycotoxin Alternariol: A Review. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 119, n. 6, p. 533–539, 2016.
- SONG, L. *et al.* Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. **Science**, v. 274, n. 5294, p. 1859–1866, 1996.
- SONG, S. *et al.* Development and application of salting-out assisted liquid / liquid extraction for multi-mycotoxin biomarkers analysis in pig urine with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 111–120, 2013.
- STUDER, A. *et al.* Formation of individual protein channels in lipid bilayers suspended in nanopores. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 325–331, 2009.
- TAGHIZADEH, *et al.* Occurrence of mycotoxins in rice consumed by Iranians: a probabilistic assessment of risk to health. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**. v. 37, n. 2, p. 342-354, 2020.
- TANIWAKI, M. H. *et al.* Understanding Mycotoxin Contamination Across the Food Chain in Brazil: Challenges and Opportunities. **Toxins**, v. 11, n. 7, p. 411, 2019.
- TIAN, *et al.* Highly sensitive α -hemolysin nanopore detection of MUC1 based on 3D DNA walker. **Analytica Chimica Acta**, v. 1223, p. 340193, 2022.
- THEVENOT, D. R. *et al.* Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification (Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 12, p. 2333–2348, 1999.
- TURNER, N. W. *et al.* Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009-2014). **Analytica Chimica Acta**, v. 901, p. 12–33, 2015.
- ÜLGER, T. G. *et al.* Genotoxic effects of mycotoxins. **Toxicon**, v. 185, p. 104-113, 2020.
- ULHUQ, F. R.; MARIANO, G. Bacterial pore-forming toxins. **Microbiology**, v. 168, n. 3, 2022.
- WANG, G. *et al.* Nanopore stochastic detection: diversity, sensitivity, and beyond. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 12, p. 2867–2877, 2013.

WANG, M. *et al.* A single-step solid phase extraction for the simultaneous determination of 8 mycotoxins in fruits by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1429, p. 22–29, 2016.

WANG, S. *et al.* Retarded Translocation of Nucleic Acids through α -Hemolysin Nanopore in the Presence of a Calcium Flux. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 12, n. 24, p. 26926-26935, 2020.

WANG, Y. *et al.* Simultaneous and rapid detection of six different mycotoxins using an immunochip. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 34, n. 1, p. 44–50, 2012.

WANUNU, M. *et al.* Electrostatic focusing of unlabelled DNA into nanoscale pores using a salt gradient. **Nature Nanotechnology**, v. 5, n. 2, p. 160-5, 2010.

WEI, K., YAO, F., KANG, X. F. Single-molecule porphyrin-metal ion interaction and sensing application. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 109, p. 272-278, 2018.

WU, F.; GROOPMAN, J. D.; PESTKA, J. J. Public health impacts of foodborne mycotoxins. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 5, p. 351–372, 2014.

YAMASHITA, D. *et al.* Molecular basis of transmembrane beta-barrel formation of staphylococcal pore-forming toxins. **Nature Communications**, v. 5, n. 4897, 2014.

YANG H. *et al.* Development and optimization of a method based on dispersive solid phase extraction followed by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high-resolution mass spectrometry for simultaneous determination of 30 mycotoxins in Citrus products. **Journal of Separation Science**, v. 45, n. 23, p. 4158-4166, 2022.

YANG, C.; SONG, G.; LIM, W. Effects of mycotoxin-contaminated feed on farm animals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 389, 122087, 2020.

YOU, L. *et al.* Mycotoxins and cellular senescence: the impact of oxidative stress, hypoxia, and immunosuppression. **Arch Toxicol.** v. 97, n. 2, p. 393-404, 2023.

ZENG, T. *et al.* Detection of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in DNA via host-guest interactions inside α -hemolysin nanopores. **Chemical Science**, v. 6, n. 10, p. 5628– 5634, 2015.

APÊNDICE A – Alphatoxin Nanopore Detection of Aflatoxin, Ochratoxin and Fumonisin in Aqueous Solution.



Article

Alphatoxin Nanopore Detection of Aflatoxin, Ochratoxin and Fumonisin in Aqueous Solution

Artur Alves Rodrigues da Silva ^{1,2}, Janilson José da Silva Júnior ³, Maria Isabel dos Santos Cavalcanti ³, Dijannah Cota Machado ³, Paloma Lys Medeiros ³ and Cláudio Gabriel Rodrigues ^{2,3,*}

¹ Education and Health Center, Federal University of Campina Grande, Rua Aprígio Veloso, 882, Universitário, Campina Grande 58429-900, Brazil

² Postgraduate Program in Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife 50670-901, Brazil

³ Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife 50670-901, Brazil

* Correspondence: claudio.rodrigues@ufpe.br; Tel.: +55-81-2126-8535

Abstract: Mycotoxins are toxic and carcinogenic metabolites produced by groups of filamentous fungi that colonize food crops. Aflatoxin B₁ (AFB₁), ochratoxin A (OTA) and fumonisin B₁ (FB₁) are among the most relevant agricultural mycotoxins, as they can induce various toxic processes in humans and animals. To detect AFB₁, OTA and FB₁ in the most varied matrices, chromatographic and immunological methods are primarily used; however, these techniques are time-consuming and expensive. In this study, we demonstrate that unitary alphatoxin nanopore can be used to detect and differentiate these mycotoxins in aqueous solution. The presence of AFB₁, OTA or FB₁ inside the nanopore induces reversible blockage of the ionic current flowing through the nanopore, with distinct characteristics of blockage that are unique to each of the three toxins. The process of discrimination is based on the residual current ratio calculation and analysis of the residence time of each mycotoxin inside the unitary nanopore. Using a single alphatoxin nanopore, the mycotoxins could be detected at the nanomolar level, indicating that alphatoxin nanopore is a promising molecular tool for discriminatory analysis of mycotoxins in aqueous solution.

Keywords: alphatoxin; aflatoxin; stochastic sensing; ochratoxin; fumonisin; biosensor; nanopore

Key Contribution: The unitary alphatoxin nanopore enables discriminatory analysis of mycotoxins in aqueous solution.



Citation: Silva, A.A.R.d.; Silva Júnior, J.J.d.; Cavalcanti, M.I.d.S.; Machado, D.C.; Medeiros, P.L.; Rodrigues, C.G. Alphatoxin Nanopore Detection of Aflatoxin, Ochratoxin and Fumonisin in Aqueous Solution. *Toxins* **2023**, *15*, 183. <https://doi.org/10.3390/toxins15030183>

Received: 28 January 2023

Revised: 23 February 2023

Accepted: 26 February 2023

Published: 28 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The growth of filamentous fungal species in varied foods and animal feeds results in the production of metabolic substances that, when ingested, can be toxic to humans and animals. These substances are termed mycotoxins, and the toxification process is referred to as mycotoxicosis [1–3]. Certain environmental conditions, such as regarding temperature and humidity, are favorable to fungal growth; there is a higher incidence of fungal growth in countries with tropical climates. In particular, species of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* produce some of the most studied mycotoxins groups, namely, aflatoxins, ochratoxins and fumonisins [1–7]. Aflatoxin B₁ (AFB₁) is the most studied due to its high toxicity and wide presence in food; according to the International Cancer Research Agency, this toxin is a group 1 carcinogenic substance [8,9]. This makes AFB₁ a significant object of scientific interest in the identification of toxicological pathways for humans and the development of new analytical tools to detect its presence in food crops [10]. Ochratoxins are metabolic products of *Aspergillus* species and some strains of *Penicillium*, and ochratoxin A (OTA) is prevalent in foods [7,11]. Among the homologs of more than

15 fumonisins that are already known, fumonisin B₁ (FB₁) is the most abundant and represents the greatest health danger [12]. Brazil is one of the largest grain producers in the world, with studies reporting the presence of these three mycotoxins in many economically important food crops. In particular, studies regarding OTA and FB₁ report the contamination of two of Brazil's main exports: coffee and corn [13–15]. The risks of exposure to these classes of toxins are due to difficulty controlling their growth in grains as a result of the natural growth of fungi under certain conditions of humidity and temperature during the pre-harvest phase in addition to the toxins' post-harvest stability and resilience against chemicals, thermal factors and physical treatments [16,17]. Several regulatory bodies, such as the United States Food and Drug Administration (FDA), the World Health Organization (WHO), the Food Agriculture Organization (FAO) and the European Food Safety Authority (EFSA), set strict regulatory guidelines for major mycotoxins in food and animal feed; such guidelines are currently applied by approximately 100 countries [18]. The objective of these regulations is to ensure food safety by avoiding the possible carcinogenic effects indicated by studies that result from the chronic consumption of foods with a high mycotoxin content in addition to surges of food poisoning, with such consumption having been previously identified as the cause of death of hundreds of people in Kenya [19–23]. For the detection and identification of mycotoxins in food and feed, sampling is initially performed, followed by extraction, cleaning and the application techniques that facilitate the detection and quantification of these toxins [24,25]. The methods currently applied in laboratory routines have been validated for this process and include high performance liquid chromatography with fluorimetric detection (HPLC-FLD) [26], liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS) [27,28], matrix-assisted laser mass ionization/desorption spectrometry (MALDI-TOF) [29] and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [30–32]. It is important to emphasize that these conventional methods have a competent detection range and in many cases are multianalytical [29,31]. Chromatography techniques are versatile because they can be used with a variety of detectors. In this way, most matrices, such as corn, coffee, milk and others, can be analyzed to efficiently and sensitively determine the mycotoxin content in these foods in the nano- to picomolar range [24–29]. ELISA-based immunoassays are efficiently used, commercial kits for mycotoxins are available and they are simpler techniques; however, they still suffer from incubation steps and cross-reactions [30–32]. Such chromatographic and immunological methods are primarily used to detect AFB₁, OTA, and FB₁, but are time-consuming and expensive.

Therefore, several studies have sought new methodologies to overcome the drawbacks of the techniques currently applied in identification of these toxins in foods [33,34]. In this context, stochastic biosensors, such as the single alphatoxin protein nanopore, represent a sensitive and low-cost alternative, with the molecular recognition capacity to detect, identify, characterize and quantify single analytes [35]. Stochastic biosensing relies on the observation of individual interactions events between analyte molecules and a single bioreceptor. The interaction between the analyte and the unitary nanopore induces blockage events in the ionic current. The time series formed by these blockage events generates a digital signature that allows the identification and quantification of the analyte [36].

Alphatoxin is an exotoxin with molecular mass of 33.2 kDa produced by *Staphylococcus aureus*, and it forms a heptameric pore that is currently considered the model protein nanopore for the detection of analytes in aqueous solution due to its functional versatility, reproducibility and sensitivity [37,38]. Unitary alphatoxin nanopore is used as a sensing tool in the study of analytes such as nucleotides [39–41], polymers [42], peptides and small organic molecules [43–47]. Recently, its advantages in the detection and differentiation of the microcystins, a class of toxins produced by marine algae, were demonstrated [48]. It was also recently demonstrated that aptamers can be used to increase unitary alphatoxin nanopore sensitivity, allowing ultra-sensitive detection of ochratoxin A in corn samples [49]. However, using aptamers increases the cost and complexity of the detection system, limiting its use to the laboratory environment. Another strategy used to improve the detection capability of nanopore-based systems is to increase the salt gradient. Increasing the saline

gradient induces electrostatic focusing resulting in an increase in the capture rate of the deoxyribonucleic acid and peptide capture [50,51]. In this study, we demonstrate that single alphatoxin nanopore can be used for the detection and differentiation of the mycotoxins ochratoxin A, aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in a solution with of high potassium chloride concentration and absence of a saline gradient.

2. Results and Discussion

2.1. Mycotoxins Induce Reversible and Characteristic Blockage of Ionic Current in Single Alphatoxin Nanopore

Previous studies denote the ability of nanopores to detect toxins in aqueous solutions. For example, the conductance fluctuation analysis and determination of the all-points histograms allowed the detection and differentiation of microcystin variants by the single alphatoxin nanopore [48]. Here, we performed a residual current and dwell time analysis and demonstrated that the unitary alphatoxin nanopore is able to detect and discriminate three mycotoxins in solution with high KCl concentration.

Voltage-clamp conditions were used to investigate the interaction of individual mycotoxins molecules with a single alphatoxin nanopore. In a 4 M KCl solution (pH 7.5) and a transmembrane potential of 40 mV, the unitary alphatoxin nanopore presents a constant current of approximately 150 pA and 4 nS conductance; these parameter values are in agreement with those reported in several previous studies [42,48,52,53]. Adding ochratoxin A, aflatoxin B₁ or fumonisin B₁ to the KCl solution in the trans side of unitary alphatoxin nanopore resulted in reversible and characteristic blockage events of the ionic current. A representative single nanopore ionic current profiles for interaction of the alphatoxin nanopore with the ochratoxin A, aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ are shown in Figure 1A,D,G, respectively. Note that blockage events are indicated by dashed black rectangles. Figure 1B,E,H shows the blockage events can be observed as fluctuation discrete in the ionic current. This behavior is similar to that reported in studies of other analytes, indicating that this nanopore can be used in mycotoxin detection [48,49]. Figure 1C,F,I depicts the respective histograms of dwell times for the ochratoxin A, aflatoxin B₁ and fumonisin B₁. Mean dwell time values (τ_{off}) and mean interevent interval values (τ_{on}) were obtained from the dwell histograms, and the interevent histograms were fitted to single exponential functions [54,55].

Blockage events were characterized based on the mean dwell time (τ_{off}) and residual current ratio (I/I_0 ; I denotes the magnitude of current decrease, and I_0 denotes open nanopore current) [54,55]. Analysis of ionic current tracings reveal the presence of three I/I_0 and τ_{off} values for each of the mycotoxins: ochratoxin A, $I/I_0 = 0.15 \pm 0.001$, 0.0311 ± 0.006 ms ($n = 3$), respectively; aflatoxin B₁, $I/I_0 = 0.326 \pm 0.025$, 0.059 ± 0.007 ms ($n = 3$), respectively; and fumonisin B₁, $I/I_0 = 0.443 \pm 0.025$, 0.0996 ± 0.011 ms ($n = 3$), respectively (Figures 1 and 2).

The capacity of the single alphatoxin nanopore can be used in directly detecting these mycotoxins, reinforcing the potential to use this nanopore for analyzing small molecules, as demonstrated in previous studies [43–47].

Furthermore, simultaneous addition of three mycotoxins to the solution in the trans side of the unitary alphatoxin nanopore (at concentrations of 10 μ M for OTA or AFB₁ and 3.5 μ M for FB₁) induced three distinct patterns of ionic current blockage (Figure 3A). The amplitude of these three blockage profiles is similar, as can be seen in Figures 1 and 2. Therefore, the single alphatoxin nanopore facilitates differentiating between these mycotoxins when simultaneously present in aqueous solution. The discrimination process is based on the calculation of the residual current ratio and the residence time of each mycotoxin in the unitary alphatoxin nanopore (Figure 3B).

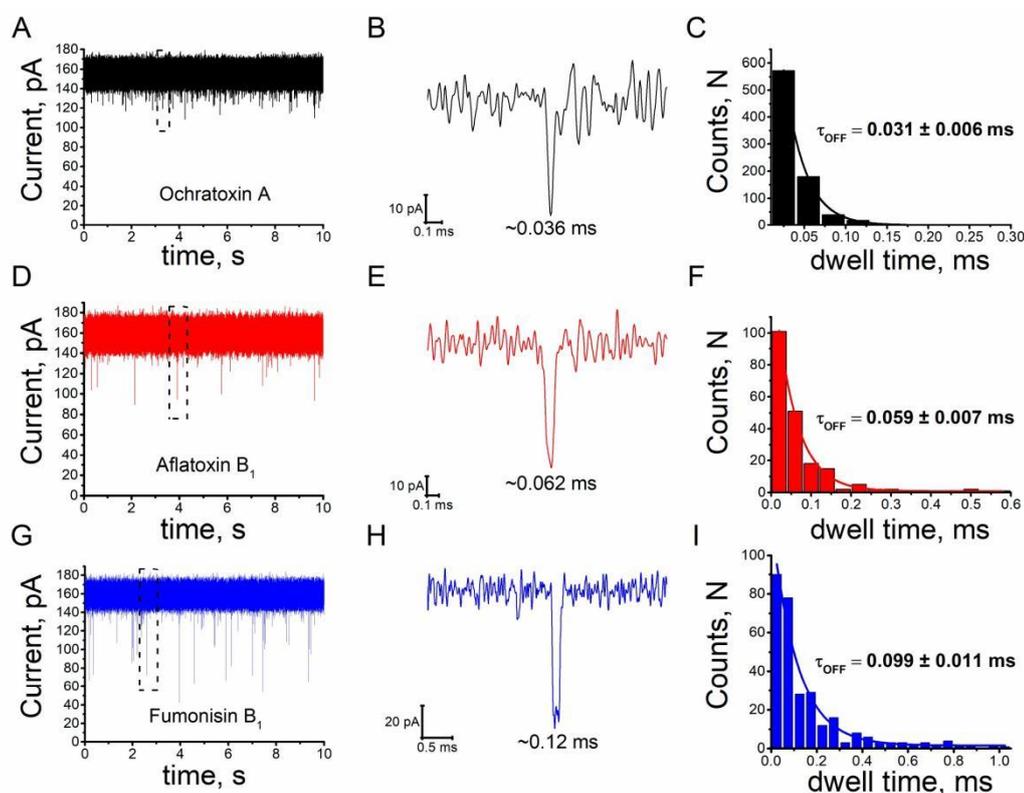


Figure 1. Unitary alphatoxin nanopore detection of mycotoxins. Representative single nanopore ionic current trace for interaction of the alphatoxin nanopore with the mycotoxin (A) ochratoxin A, (D) aflatoxin B₁ and (G) fumonisins B₁. Black dashed rectangles indicate blockage events. Representative ionic current blockage events for interaction of the single alphatoxin nanopore with the mycotoxin (B) ochratoxin A, (E) aflatoxin B₁ and (H) fumonisins B₁. Representative dwell time histograms for interaction of the single alphatoxin nanopore with the mycotoxin (C) ochratoxin A, (F) aflatoxin B₁ and (I) fumonisins B₁. The solid black, red and blue lines indicated fitting of single exponential functions. Experimental conditions: transmembrane potential of 40 mV, solution (4 M KCl, Tris-HCl 5 mM, pH 7.5). Mycotoxin concentrations: 3.5 μM (OTA, AFB₁ and FB₁).

Analysis of the ionic current tracings obtained from the single alphatoxin nanopore in the simultaneous presence of the three mycotoxins resulted in the following (I/I_0) and τ_{off} values: 0.145 ± 0.021 , 0.028 ± 0.004 ms ($n = 3$) for OTA; 0.364 ± 0.005 , 0.061 ± 0.007 ms ($n = 3$) for AFB₁; and 0.476 ± 0.002 , 0.095 ± 0.006 ms ($n = 3$) for FB₁. These values are in accordance with the results obtained for the single alphatoxin nanopore in the presence of only one type of mycotoxin (Figures 1 and 2).

These results, together with recent studies demonstrating that unitary alphatoxin nanopore detection can be used to discriminate between microcystins, reinforce the concept of using this nanopore as a potential molecular tool for the discrimination of mycotoxins in aqueous solution [48].

Figure 4 demonstrates the residence times of mycotoxins in the single alphatoxin nanopore. There were no differences between the values of the mycotoxins' residence times in the nanopore when in the presence of only one type of mycotoxin or in the presence

of a mixture of mycotoxins (Figure 4). Therefore, the unique residence time for each type of mycotoxin in the unitary alphatoxin nanopore allows for their identification and serves as a second discriminant for multivariate analysis of these toxin classes in aqueous media [48,56,57].

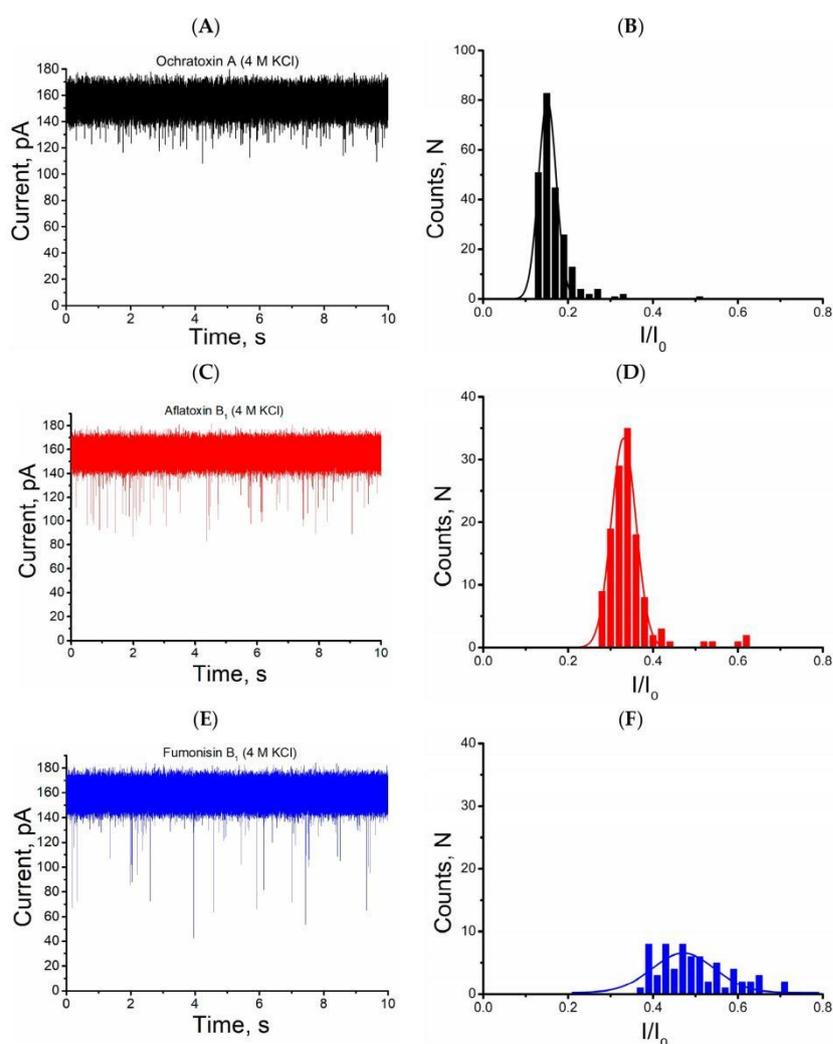


Figure 2. Single alphatoxin nanopore detection of mycotoxins. Representative single nanopore ionic current trace for interaction of the alphatoxin nanopore with mycotoxin (A) ochratoxin A, (C) aflatoxin B₁ and (E) fumonisin B₁ (D). Histograms of normalized blockage current (I/I_0) of mycotoxins (B) ochratoxin A, (D) aflatoxin B₁ and (F) fumonisin B₁. The solid black, red, and blue lines are Gaussian fit to the histograms of ochratoxin A, aflatoxin B₁ and fumonisin B₁, respectively. Experimental conditions: transmembrane potential of 40 mV, solution (4 M KCl, Tris-HCl 5 mM, pH 7.5), Mycotoxin concentrations: 3.5 μ M OTA, 10 μ M AFB₁ and 3.5 μ M FB₁.

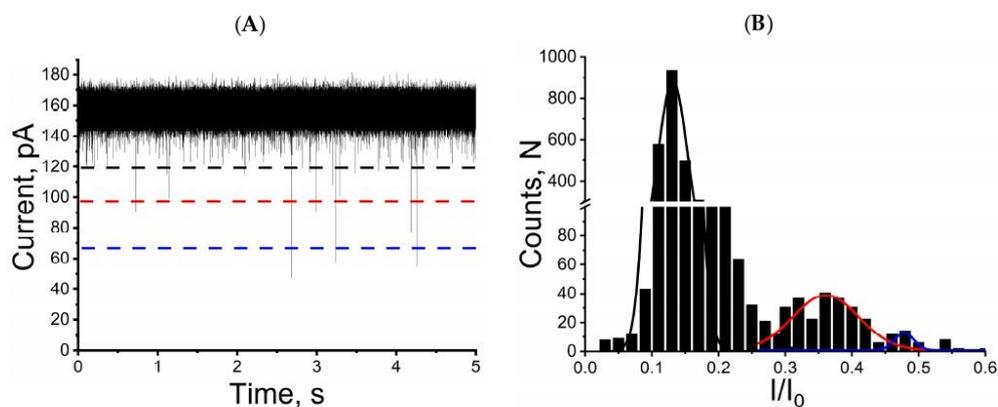


Figure 3. Unitary alphatoxin nanopore detection can differentiate between mycotoxins in aqueous solution. (A) Representative single nanopore ionic current trace of mycotoxins in mixture interacting with alphatoxin nanopore. The horizontal dashed black, red and blue lines indicate the blockage amplitudes of ochratoxin A, aflatoxin B₁ and fumonisin B₁, respectively. (B) Histograms of normalized blockage current (I/I_0) of mycotoxins mix (ochratoxin A, aflatoxin B₁ and fumonisin B₁). The solid black, red and blue lines are Gaussian fit to the histograms of ochratoxin A, aflatoxin B₁ and fumonisin B₁, respectively. Experimental conditions: transmembrane potential of 40 mV, solution (4 M KCl, Tris-HCl 5 mM, pH 7.5). Mycotoxin concentrations: 10 μ M OTA or AFB₁ and 3.5 μ M FB₁.

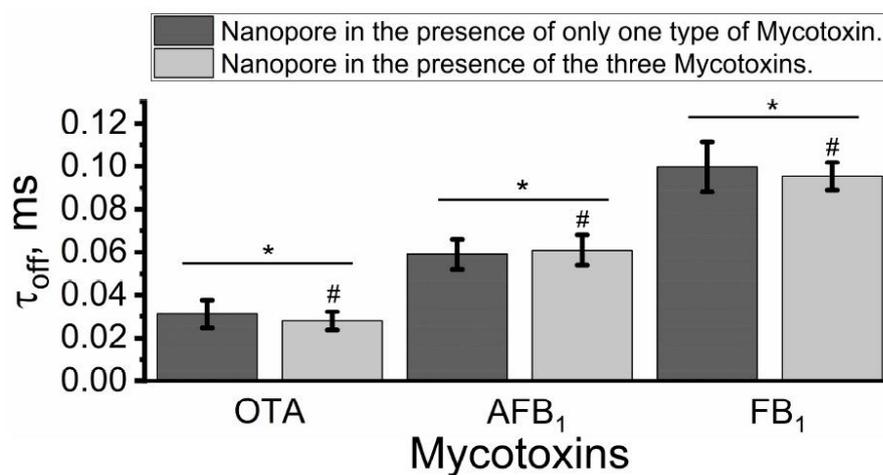


Figure 4. Residence time is a discriminant for multivariate analysis of mycotoxins in aqueous solution. Experimental conditions: transmembrane potential of 40 mV, solution (4 M KCl, Tris-HCl 5 mM, pH 7.5), and 3.5 μ M OTA, AFB₁ and FB₁, alone or in mixture. Values represent mean \pm S.D. of three independent experiments. # Indicates that residence time in the nanopore is not statistically different when in the presence of only one type of mycotoxin. Student's *t*-test, $p > 0.05$. * Data are statistically different for each type of mycotoxin. ANOVA, $p < 0.05$.

2.2. Augmentation of the Salt Concentration Increases the Frequency of Ionic Current Blockage in the Unitary Alpha-toxin Nanopore

Recent studies have updated methodologies to improve the electrophysiological measurements generated from biosensors that use synthetic or biological nanopores. Changes in the saline concentration or the making of concentration gradients on the experimental solution are ways to improve the sensitivity of these biosensors [50–55]. Among these studies, some used the first approach, demonstrating that the detection capacity and sensitivity of the nanopore can be strongly influenced not only by the composition of the ionic solution, but also by the action of solutions with high ionic concentration [48,53].

In this case, Figure 5 illustrates typical single nanopore ionic current traces of the aflatoxin B₁ interaction with alpha-toxin nanopore; with larger blockage frequency values for 4 M KCl solution, indicating that increasing the potassium chloride concentration from 1 to 4 M increases the frequency of ionic current blockage events by approximately five times. Previous data and the results of this work clearly demonstrate that increasing the salt concentration enhances the capability of stochastic detection using protein pores, such as the alpha-toxin nanopore [53,58]. Other studies have demonstrated that an increasing salt gradient favorably influences the capture of molecules with residual charge (DNA, for example) via the protein or synthetic nanopore, but only if the analyte is placed where the salt concentration is lowest. This behavior is due to electrostatic focusing [50,51]. Our results were obtained from independent experiments carried out with symmetric KCl solutions, that is, at concentrations of 1 M or 4 M of KCl on both sides of the single alpha-toxin nanopore, therefore, we do not have the presence of a saline gradient. Thus, the increase in the frequency of ionic current blocking events denoted here is probably due to the salting-out effect, as already reported in previous studies [42,52,53,57].

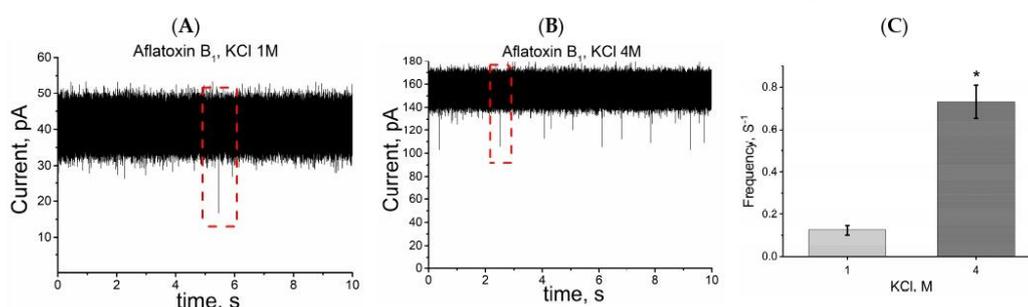


Figure 5. Higher KCl concentration increases the frequency of blockage events induced by mycotoxins. Representative single nanopore ionic current trace of AFB₁ interaction with the alpha-toxin nanopore in KCl at (A) 1 M and (B) 4 M. (C) Increased frequency of blockage events caused by KCl concentration. Experimental conditions: transmembrane potential of 40 mV, 1 M or 4 M KCl and 5 mM Tris, pH 7.5, and 3.5 μ M AFB₁. Red dashed rectangles indicate blockage events. * Data are statistically different from results for 1 M KCl. Student's *t*-test, $p < 0.05$.

2.3. Sensitivity of the Unitary Alpha-toxin Nanopore to Mycotoxins

The search for alternative and promising tools for mycotoxin detection results in the expansion of studies in the field of analysis [29–34]. Studies denote the emergence and advancement of methodologies based on biosensors (mainly immunosensors) used to detect this class of toxins [59,60]. Application of the single alpha-toxin nanopore as a recognition element has shown satisfactory results in the stochastic sensing of toxins in aqueous solution [48]. Their properties of high sensitivity, low detection limit values and high dynamic range values indicate that sensors based on the unitary alpha-toxin nanopore have beneficial characteristics for the detection of single molecules [35,37,42,61]. Gold-standard techniques are constantly being updated with dynamic range in the nano to

picomolar order [28]. The amplitudes between the highest and lowest concentrations in which analytes can be discriminated represents the dynamic range of a sensor [62,63]. A recent study used mycotoxin-specific aptamers to demonstrate use of the single alphatoxin nanopore in detecting ochratoxin A at levels recommended by control agencies [49]. In this study, the increase in KCl concentration allowed use of the single alphatoxin nanopore in discriminating and detecting the studied mycotoxins at the nanomolar level. The dynamic range was estimated at approximately 0.71 to 15 nM for ochratoxin A and aflatoxin B₁ and, 0.71 to 3500 nM for fumonisin B₁ (Figures 6 and S1).

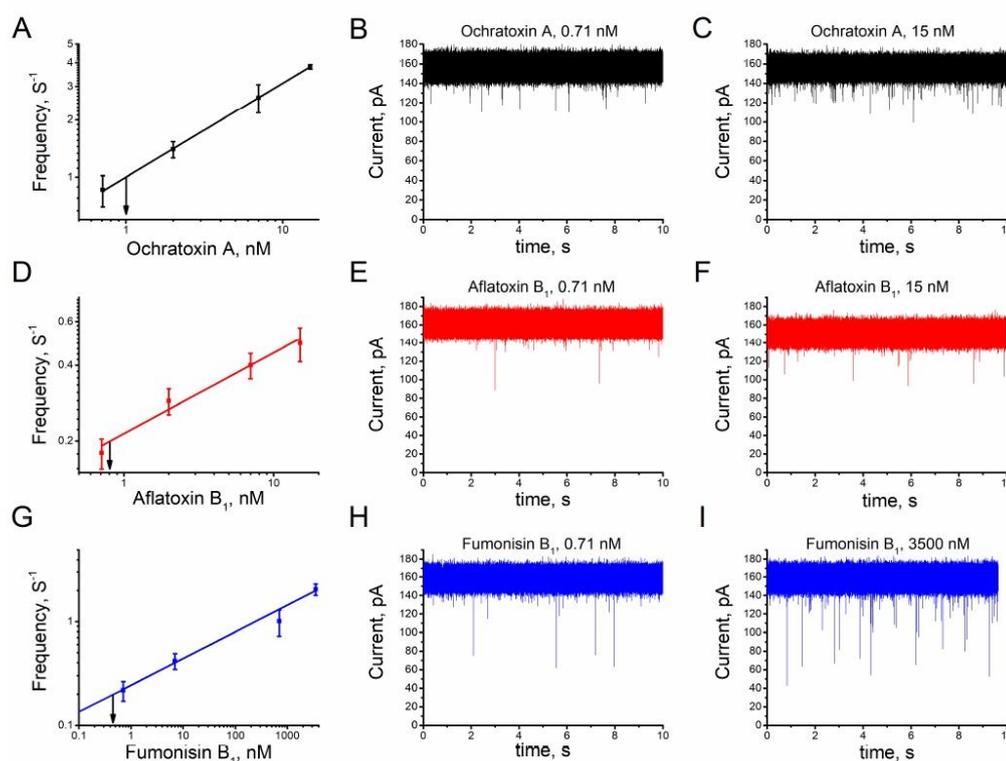


Figure 6. The relationship between frequency of blockage events and mycotoxin concentrations. Calibration curves of the unitary alphatoxin nanopore to mycotoxins: (A) vertical arrows indicate the background equivalent ochratoxin A concentration at an event frequency of 1 Hz; and (D,G) vertical arrows indicate the background equivalent aflatoxin B₁ or fumonisin B₁ concentration at an event frequency of 0.2 Hz. Representative single nanopore ionic current interaction of alphatoxin nanopore with mycotoxins (B) ochratoxin A, 0.71 nM; (E) aflatoxin B₁, 0.71 nM; (H) fumonisin B₁, 0.71 nM; (C) ochratoxin A, 15 nM; (F) aflatoxin B₁, 15 nM; and (I) fumonisin B₁, 3500 nM. Experimental conditions: transmembrane potential of 40 mV, solution (4 M KCl, 5 mM Tris–HCl, pH 7.5).

The slope value of the calibration curve of a sensor indicates its sensitivity [62]. Therefore, the slope of the calibration curve was calculated to determine the sensitivity of the single alphatoxin nanopore for each mycotoxin. The single alphatoxin nanopore sensitivity values (nM s⁻¹) are 0.148 ± 0.001 (ochratoxin A), 0.09 ± 0.010 (aflatoxin B₁) and 0.257 ± 0.016 (fumonisin B₁) (Figure 6). The frequency of blockage events increases linearly with the mycotoxin concentration (Figure 6). Therefore, it was possible to determine the concentration of mycotoxins in solution using the unitary alphatoxin nanopore; the

dependence between the frequency of blockage events and the mycotoxin concentration was used to calculate the detection limit. The detection limit is the lowest analyte concentration value detectable by the single alphatoxin nanopore for a certain frequency value of ionic current blocking events [52,53]. Figure 6 shows the ability of the nanopore to detect mycotoxins in aqueous solution (assessment at practical 0.2 Hz of events), estimated at 0.8 nM for aflatoxin B₁ (Figure 6D) and 0.45 nM for fumonisin B₁ (Figure 6C). Likewise, adopting a 1 Hz frequency, it was possible to estimate the limit detection of the ochratoxin A as approximately 1.0 nM (Figure 6A). This value is within the 0.3 to 16 nM range of the maximum allowable levels for this class of toxins in food [59].

It is important that strategies are underway for the development of portable instrumentation [49] and microfluidic systems [44] that will allow the use of detection systems to advance based on the applicability of biosensors. Given the success of the alphatoxin nanopore biosensor, it is important to expand the technique for detecting new compounds and evaluate parameters that improve the stability and sensitivity of these analysis [44,48–50,53,54]. Previous studies show the usefulness of the alphatoxin nanopore biosensor in combination with aptamers in the analysis of ochratoxin A from corn samples [49]. The sensitivity values of the technique were in the range of 1.69 pM under the experimental conditions proposed in the study, allowing the analysis of real samples with concentrations starting from 0.2 nM OTA [49]. The use of aptamers combined to the alphatoxin nanopore has also been used for the detection of other chemical substances, such as cocaine [44]. However, this type of analysis is limited to the specificity of the aptamer and also makes the technique more laborious [44,49]. Other new techniques based on the applicability of chemiluminescence immunosensors and competitive magnetic immunodetection provide quite satisfactory detection limits for AFB₁ in the order of picomolar [34,60]. Therefore, it is necessary to find alternatives to the use of aptamers and antibodies, since the use of these techniques for mycotoxins analysis requires more steps and costs. We present here the perspective of the alphatoxin biosensor for the detection and discrimination of mycotoxins representing the three main groups of fungi (AFB₁, OTA, and FB₁). The values of 0.8 nM (AFB₁), 0.45 nM (FB₁) and 1 nM (OTA) obtained in this study are lower than those recommended by legislation for different foods [59]. Studies carried out for the detection of other toxins, such as microcystins, have already demonstrated the capacity of the biosensor for multianalytical detection in the absence of molecular adapters [48]. This shows that the alphatoxin nanopore biosensor is able to be used in the future for the analysis of samples extracted from food.

In addition, the method presented in this study considerably simplifies assay procedures and reduces analysis time compared with standard methods, as it is not necessary to mark, modify or conjugate the mycotoxins with other types of molecules (aptamers or antibodies, for example) or nanoparticles. Additionally, the capacity of unitary alphatoxin nanopore to detect mycotoxins can be improved using several strategies, such as changing the ionic composition of the lipid membrane bathing solution and application of a saline gradient.

3. Conclusions

In this study, we demonstrate that increasing the KCl concentration in solution causes an increase in the frequency of blockage of the ionic current induced by the presence of mycotoxins in aqueous lumen of the single alphatoxin nanopore. Consequently, the stochastic sensing capacity of unitary alphatoxin nanopore is improved, enabling the discrimination of three relevant agricultural mycotoxins: ochratoxin A, aflatoxin B₁ and fumonisin B₁. In addition, the sensitivity is increased, allowing a single alphatoxin nanopore to be used in the detection of these mycotoxins at the nanomolar level, which is comparable to the standard techniques used for quantification of these molecules. Finally, its ability to detect and discriminate mycotoxins at a nanomolar level indicates that the unitary alphatoxin nanopore is a promising molecular tool for discriminatory analysis of mycotoxins in aqueous solution.

4. Materials and Methods

4.1. Materials and Chemicals

Wild type alphatoxin from *Staphylococcus aureus* was purchased from Calbiochem (Madison, WI, USA); 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) was acquired from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA); and 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris) and citric acid were acquired from Fluka (Buchs, Switzerland). High quality (>99.99%) potassium chloride, n-hexane, and solution analytical standards of aflatoxin B₁, ochratoxin A and fumonisin B₁ were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). High-purity water was prepared using a Milli-Q Plus purification system (Billerica, MA, USA). All chemicals and solvents were of analytical grade and used as received.

4.2. Planar Lipid Bilayer Formation, Insertion of Single Alphatoxin Nanopore and Data Analysis

All experiments to obtain the solvent-free planar bilayer lipid membranes with a capacitance of 40 pF were performed using the lipid monolayer apposition technique and DPhPC in hexane at 25 ± 1 °C, as previously described [52,64]. The lipid bilayers were mounted in the orifice (diameter of approximately 50 μ m) a Teflon film serving as a divider for two Teflon hemi-chambers. The membrane bathing solution was composed of 1 M KCl or 4 M KCl and 5 mM Tris–HCl buffered to pH 7.5. We chose to use mainly high concentrations of KCl in each Teflon hemi-chamber, since previous studies have demonstrated improvements in the detection capacity of the single alphatoxin nanopore [48,53]. If not mentioned specially, the applied transmembrane potential was 40 mV. After membrane formation, approximately 0.5 μ L of alphatoxin stock solution (0.07 mg/mL) was added to the bath solution on the cis side of the experimental hemi-chamber for a final concentration of approximately 2 ng/mL, an amount sufficient to promote the incorporation of a single alphatoxin nanopore. The Ochratoxin A, Aflatoxin B₁, and Fumonisin B₁ were added to the trans side of the hemi-chamber, from stock solutions at concentrations ranging from 1 mM to 1 nM.

An Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) in voltage-clamp mode was used to measure the current travelling through the lipid bilayer membrane. Transmembrane potential was sustained using Ag/AgCl electrodes in 3 M KCl 2% agarose bridges montaged in standard 200 μ L pipette tips. Currents were acquired using an Axopatch 200B amplifier with a Bessel filter at 10 kHz and sampled at 50 kHz using an IBM computer connected to Digidata 1440 A (Molecular Devices, San Jose, CA USA).

Analysis of the single nanopore ionic current traces and determination of the sojourn time, amplitude and frequency of blockage events and kinetic constants of mycotoxin–nanopore interactions were performed as reported in previous studies [45,46]. Briefly, the characteristic time, τ_{on} , was obtained from the collected time intervals between the end of one blockage event and the onset of the next. The residence time, τ_{off} , was obtained from the collected duration time of blockage events. Finally, Clampfit 10.7 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) was used to analyze single nanopore ionic current trace, and Origin 8.1 (Origin, Version 8.1. OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) was used to generate histograms and for plotting and curve fitting.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/toxins15030183/s1>, Figure S1. Calibration curves of the unitary alphatoxin nanopore and current traces (OTA and AFB₁).

Author Contributions: Conceptualization, A.A.R.d.S. and C.G.R.; methodology, A.A.R.d.S. and M.I.d.S.C.; formal analysis, A.A.R.d.S.; investigation, A.A.R.d.S.; resources, A.A.R.d.S., D.C.M. and C.G.R.; data curation, A.A.R.d.S.; writing—original draft preparation, A.A.R.d.S.; writing—review and editing, D.C.M., P.L.M. and C.G.R.; visualization, A.A.R.d.S., J.J.d.S.J., D.C.M. and C.G.R.; supervision, J.J.d.S.J., D.C.M. and C.G.R.; project administration, J.J.d.S.J., D.C.M. and C.G.R.; funding acquisition, C.G.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grant 313538/2019-0.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors dedicate this work to Oleg Vladimirovich Krasilnikov (in memoriam).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Karlovsky, P.; Suman, M.; Berthiller, F.; De Meester, J.; Eisenbrand, G.; Perrin, I.; Oswald, I.P.; Speijers, G.; Chiodini, A.; Recker, T.; et al. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Res.* **2016**, *32*, 179–205. [CrossRef] [PubMed]
- Wu, F.; Groopman, J.D.; Pestka, J.J. Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2014**, *5*, 351–372. [CrossRef] [PubMed]
- Bennett, J.W. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. *Mycopathologia* **1987**, *100*, 3–5. [CrossRef] [PubMed]
- Bennett, J.W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 497–516. [CrossRef]
- Alshannaq, A.; Yu, J.H. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2017**, *14*, 632. [CrossRef]
- Carballo, D.; Tolosa, J.; Ferrer, E.; Berrada, H. Dietary exposure assessment to mycotoxins through total diet studies. A review. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *128*, 8–20. [CrossRef]
- Frisvad, J.C.; Hubka, V.; Ezekiel, C.N.; Hong, S.B.; Nováková, A.; Chen, A.J.; Arzanlou, M.; Larsen, T.O.; Sklenár, F.; Mahakam-CHANAKUL, W.; et al. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Stud. Mycol.* **2018**, *91*, 37–59. [CrossRef]
- Klich, M.A. *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin. *Mol. Plant Pathol.* **2007**, *8*, 713–722. [CrossRef]
- Marchese, S.; Polo, A.; Ariano, A.; Velotto, S.; Costantini, S.; Severino, L. Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. *Toxins* **2018**, *10*, 214. [CrossRef]
- Jallow, A.; Xie, H.; Tang, X.; Qi, Z.; Li, P. Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2021**, *20*, 2332–2381. [CrossRef]
- El Khoury, A.; Atoui, A. Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. *Toxins* **2010**, *2*, 461–493. [CrossRef] [PubMed]
- Kamle, M.; Mahato, D.K.; Devi, S.; Lee, K.E.; Kang, S.G.; Kumar, P. Fumonisin: Impact on Agriculture, Food, and Human Health and their Management Strategies. *Toxins* **2019**, *11*, 328. [CrossRef] [PubMed]
- Taniwaki, M.H.; Pitt, J.I.; Copetti, M.V.; Teixeira, A.A.; Iamanaka, B.T. Understanding Mycotoxin Contamination Across the Food Chain in Brazil: Challenges and Opportunities. *Toxins* **2019**, *11*, 411. [CrossRef] [PubMed]
- Franco, L.T.; Petta, T.; Rottinghaus, G.E.; Bordin, K.; Gomes, G.A.; Oliveira, C.A.F. Co-occurrence of mycotoxins in maize food and maize-based feed from small-scale farms in Brazil: A pilot study. *Mycotoxin Res.* **2019**, *35*, 65–73. [CrossRef]
- Scussel, V.M.; Savi, G.D.; Costas, L.L.; Xavier, J.J.; Manfio, D.; Bittencourt, K.O.; Aguiar, K.; Stein, S.M. Fumonisin in corn (*Zea mays* L.) from Southern Brazil. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* **2014**, *7*, 151–155. [CrossRef]
- De Boever, M.; Di Mavungu, J.D.; Landschoo, S.; Audenaert, K.; Eeckhout, M.; Maene, P.; De Saeger, S. Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products. *World Mycotoxin J.* **2012**, *5*, 207–219. [CrossRef]
- Eskola, M.; Kos, G.; Elliott, C.T.; Hajšlová, J.; Mayar, S.; Krska, R. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited ‘FAO estimate’ of 25. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 2773–2789. [CrossRef]
- Lee, H.J.; Ryu, D. Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Cereals and Cereal-Derived Food Products: Public Health Perspectives of Their Co-occurrence. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 7034–7051. [CrossRef]
- Probst, C.; Njapau, H.; Cotty, P.J. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: Identification of the causal agent. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 2762–2764. [CrossRef]
- Barac, A. Mycotoxins and human disease. In *Clinically Relevant Mycoses*; Springer: Cham, Switzerland, 2019; pp. 213–225. [CrossRef]
- Lombard, M.J. Mycotoxin exposure and infant and young child growth in Africa: What do we know? *Ann. Nutr. Metab.* **2014**, *64*, 42–52. [CrossRef]
- Pavlović, N.M. Balkan endemic nephropathy-current status and future perspectives. *Clin. Kidney J.* **2013**, *6*, 257–265. [CrossRef] [PubMed]
- Prandini, A.; Tansini, G.; Sigolo, S.; Filippi, L.; Laporta, M.; Piva, G. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 984–991. [CrossRef] [PubMed]
- Song, S.; Ediage, E.N.; Wu, A.; De Saeger, S. Development and application of salting-out assisted liquid/liquid extraction for multi-mycotoxin biomarkers analysis in pig urine with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1292*, 111–120. [CrossRef] [PubMed]

25. Turner, N.W.; Bramhmbhatt, H.; Szabo-Vezse, M.; Poma, A.; Coker, R.; Piletsky, S.A. Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014). *Anal. Chim. Acta* **2015**, *901*, 12–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Muscarella, M.; Magro, S.L.; Nardiello, D.; Palermo, C.; Centonze, D. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in maize food products by a new analytical method based on high-performance liquid chromatography and fluorimetric detection with post-column derivatization. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *739*, 187–194. [[CrossRef](#)]
27. Li, X.; Li, H.; Ma, W.; Guo, Z.; Li, X.; Li, X.; Zhang, Q. Determination of patulin in apple juice by single-drop liquid-liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* **2018**, *257*, 1–6. [[CrossRef](#)]
28. Huang, P.; Liu, Q.; Wang, J.; Ma, Z.; Lu, J.; Kong, W. Development of an economic ultrafast liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for trace analysis of multiclass mycotoxins in *Polygonum multiflorum*. *J. Sep. Sci.* **2019**, *42*, 491–500. [[CrossRef](#)]
29. Blechová, P.; Havlová, P.; Gajdosová, D.; Havel, J. New possibilities of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry to analyze barley malt quality. Highly sensitive detection of mycotoxins. *Environ. Toxicol.* **2006**, *21*, 403–408. [[CrossRef](#)]
30. Piermarini, S.; Micheli, L.; Ammida, N.H.; Palleschi, G.; Moscone, D. Electrochemical immunosensor array using a 96-well screen-printed microplate for aflatoxin B₁ detection. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1434–1440. [[CrossRef](#)]
31. Wang, Y.; Liu, N.; Ning, B.; Liu, M.; Lv, Z.; Sun, Z.; Peng, Y.; Chen, C.; Li, J.; Gao, Z. Simultaneous and rapid detection of six different mycotoxins using an immunochip. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *34*, 44–50. [[CrossRef](#)]
32. Azri, F.A.; Sukor, R.; Selamat, J.; Abu Bakar, F.; Yusof, N.A.; Hajian, R. Electrochemical Immunosensor for Detection of Aflatoxin B₁ Based on Indirect Competitive ELISA. *Toxins* **2018**, *10*, 196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Guo, X.; Wen, F.; Zheng, N.; Luo, Q.; Wang, H.; Wang, H.; Li, S.; Wang, J. Development of an ultrasensitive aptasensor for the detection of aflatoxin B₁. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *56*, 340–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Pietschmann, J.; Spiegel, H.; Krause, H.J.; Schillberg, S.; Schröper, F. Sensitive Aflatoxin B₁ Detection Using Nanoparticle-Based Competitive Magnetic Immunodetection. *Toxins* **2020**, *12*, 337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bayley, H.; Cremer, P.S. Stochastic sensors inspired by biology. *Nature* **2001**, *413*, 226–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Aguiar, J.P.; Júnior, J.J.S.; Machado, D.C.; Melo, M.C.A.; Rodrigues, C.G. Stochastic biosensing by a single protein nanopore in the development of analytical tools. *Quim. Nova* **2015**, *38*, 817–827. [[CrossRef](#)]
37. Wang, G.; Wang, L.; Han, Y.; Zhou, S.; Guan, X. Nanopore stochastic detection: Diversity, sensitivity, and beyond. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2867–2877. [[CrossRef](#)]
38. Gurnev, P.A.; Nestorovich, E.M. Channel-Forming Bacterial Toxins in Biosensing and Macromolecule Delivery. *Toxins* **2014**, *6*, 2483–2540. [[CrossRef](#)]
39. Ying, Y.L.; Li, D.W.; Liu, Y.; Dey, S.K.; Kraatz, H.B.; Long, Y.T. Recognizing the translocation signals of individual peptide-oligonucleotide conjugates using an α -hemolysin nanopore. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8784–8786. [[CrossRef](#)]
40. Movileanu, L.; Schmittschmitt, J.P.; Scholtz, J.M.; Bayley, H. Interactions of peptides with a protein pore. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1030–1045. [[CrossRef](#)]
41. Mereuta, L.; Asandei, A.; Schiopu, I.; Park, Y.; Luchian, T. Nanopore-Assisted, Sequence-Specific Detection, and Single-Molecule Hybridization Analysis of Short, Single-Stranded DNAs. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 8630–8637. [[CrossRef](#)]
42. Rodrigues, C.G.; Machado, D.C.; Chevtchenko, S.F.; Krasilnikov, O.V. Mechanism of KCl enhancement in detection of nonionic polymers by nanopore sensors. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 5186–5192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Liu, A.; Zhao, Q.; Guan, X. Stochastic nanopore sensors for the detection of terrorist agents: Current status and challenges. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *675*, 106–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kawano, R.; Osaki, T.; Sasaki, H.; Takinoue, M.; Yoshizawa, S.; Takeuchi, S. Rapid detection of a cocaine-binding aptamer using biological nanopores on a chip. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8474–8477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Guan, X.; Gu, L.Q.; Cheley, S.; Braha, O.; Bayley, H. Stochastic sensing of TNT with a genetically engineered pore. *ChemBiochem* **2005**, *6*, 1875–1881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Hu, Y.X.; Ying, Y.L.; Gu, Z.; Cao, C.; Yan, B.Y.; Wang, H.F.; Long, Y.T. Single molecule study of initial structural features on the amyloidosis process. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 5542–5545. [[CrossRef](#)]
47. Gupta, J.; Zhao, Q.; Wang, G.; Kang, X.; Guan, X. Simultaneous detection of CMPA and PMPA, hydrolytes of soman and cyclosarin nerve agents, by nanopore analysis. *Sens. Actuators B Chem.* **2013**, *176*, 625–631. [[CrossRef](#)]
48. Júnior, J.J.S.; Soares, T.A.; Pol-Fachin, L.; Machado, D.C.; Rusu, V.H.; Aguiar, J.P.; Rodrigues, C.G. Alpha-hemolysin nanopore allows discrimination of the microcystins variants. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 14683–14691. [[CrossRef](#)]
49. Li, T.; Su, Z.; Li, Y.; Xi, L.; Li, G. An aptamer-assisted biological nanopore biosensor for ultra-sensitive detection of ochratoxin A with a portable single-molecule measuring instrument. *Talanta* **2022**, *248*, 123619. [[CrossRef](#)]
50. Meni Wanunu, M.; Morrison, W.; Rabin, Y.; Grosberg, A.Y.; Meller, A. Electrostatic focusing of unlabelled DNA into nanoscale pores using a salt gradient. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 160–165. [[CrossRef](#)]
51. Mereuta, L.; Asandei, A.; Ho Seo, C.; Park, Y.; Luchian, T. Quantitative Understanding of pH- and Salt-Mediated Conformational Folding of Histidine-Containing, β -Hairpin-like Peptides, through Single-Molecule Probing with Protein Nanopores. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 13242–13256. [[CrossRef](#)]
52. Rodrigues, C.G.; Machado, D.C.; da Silva, A.M.; Júnior, J.J.; Krasilnikov, O.V. Hofmeister effect in confined spaces: Halogen ions and single molecule detection. *Biophys. J.* **2011**, *100*, 2929–2935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Machado, D.C.; Júnior, J.J.S.; Melo, M.C.A.; Silva, A.M.B.; Fontes, A.; Rodrigues, C.G. Effects of alkali and ammonium ions in the detection of poly(ethyleneglycol) by alpha-hemolysin nanopore sensor. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 56647–56655. [[CrossRef](#)]
54. Wei, K.; Yao, F.; Kang, X.F. Single-molecule porphyrin-metal ion interaction and sensing application. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *109*, 272–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Wang, S.; Wang, Y.; Yan, S.; Du, X.; Zhang, P.; Chen, H.Y.; Huang, S. Retarded Translocation of Nucleic Acids through α -Hemolysin Nanopore in the Presence of a Calcium Flux. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 26926–26935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Gu, L.Q.; Braha, O.; Conlan, S.; Cheley, S.; Bayley, H. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature* **1999**, *398*, 686–690. [[CrossRef](#)]
57. Robertson, J.W.; Rodrigues, C.G.; Stanford, V.M.; Rubinson, K.A.; Krasilnikov, O.V.; Kasianowicz, J.J. Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 8207–8211. [[CrossRef](#)]
58. 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. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *97*, 018301. [[CrossRef](#)]
59. Castillo, G.; Spinella, K.; Poturnayová, A.; Šnejdárková, M.; Mosiello, L.; Hianik, T. Detection of aflatoxin B1 by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform. *Food Control.* **2015**, *52*, 9–18. [[CrossRef](#)]
60. Jiang, F.; Li, P.; Zong, C.; Yang, H. Surface-plasmon-coupled chemiluminescence amplification of silver nanoparticles modified immunosensor for high-throughput ultrasensitive detection of multiple mycotoxins. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1114*, 58–65. [[CrossRef](#)]
61. Bayley, H.; Braha, O.; Gu, L.Q. Stochastic sensing with protein pores. *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 139–142. [[CrossRef](#)]
62. Thévenot, D.R.; Toth, K.; Durst, R.A.; Wilson, G.S. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 121–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Visser, E.W.; van Ijzendoorn, L.J.; Prins, M.W. Particle Motion Analysis Reveals Nanoscale Bond Characteristics and Enhances Dynamic Range for Biosensing. *ACS Nano* **2016**, *10*, 3093–3101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Montal, M.; Mueller, P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1972**, *69*, 3561–3566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

APÊNDICE B – Material Suplementar do artigo: Alphatoxin Nanopore Detection of Aflatoxin, Ochratoxin and Fumonisin in Aqueous Solution.

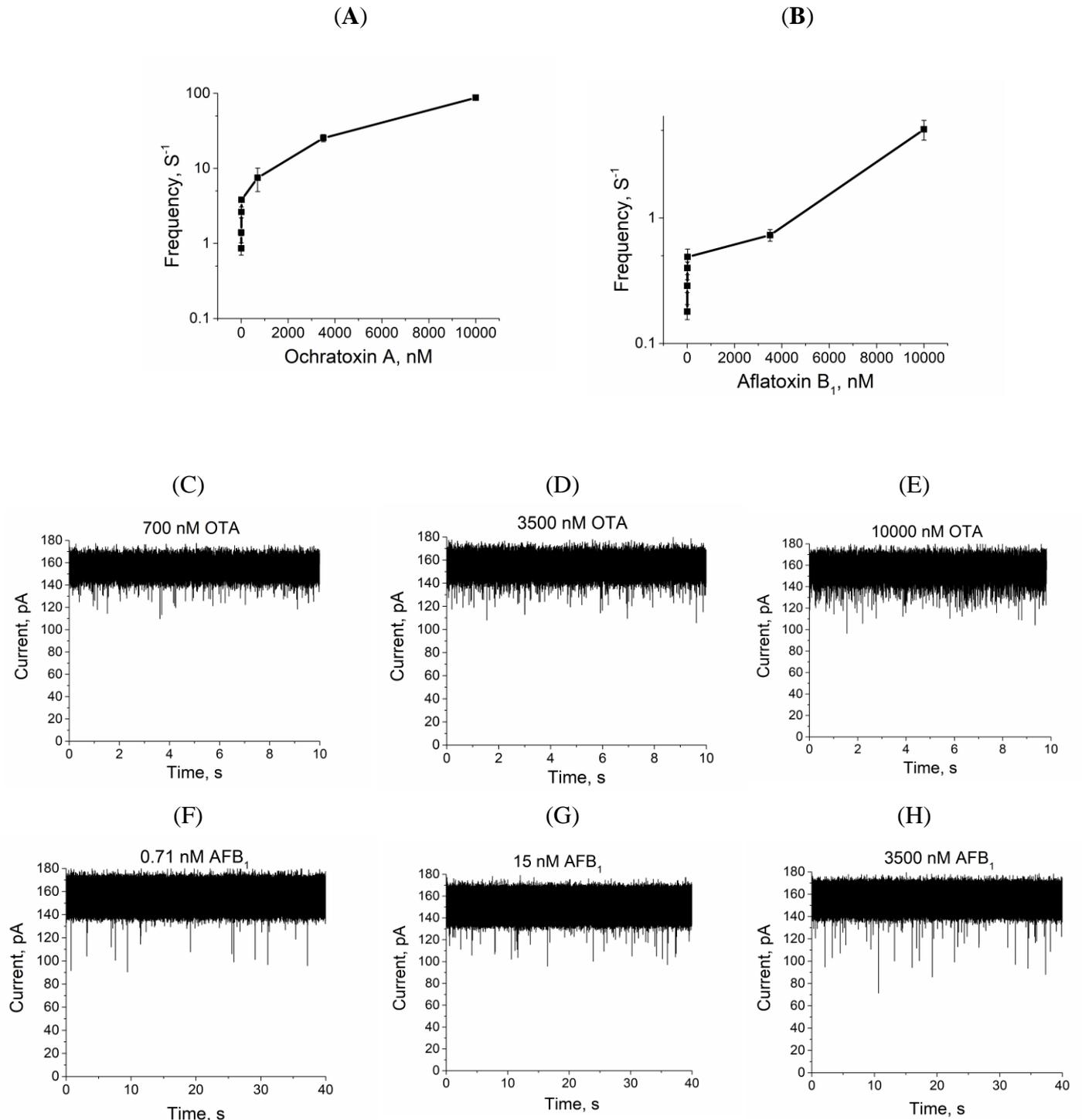


Figure S1. Calibration curves of the unitary alphatoxin nanopore and current traces (OTA and AFB₁).

Calibration curve equivalent ochratoxin A (A) and aflatoxin B₁ (B) concentration in ratio event frequency. Alphatoxin nanopore current traces of OTA in high concentrations in calibration curve (C-E). Alphatoxin nanopore current traces of AFB₁ at different concentrations in the calibration curve, the analysis time was increased to better show the variation of concentration in ratio event frequency (F-H).

ANEXO A – Resumo publicado na 51ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) 46º Congresso Brasileiro de Sociedade de Biofísica (SBBf)/ Lafefs

D.43 - Conformational and Energetic Analysis by Molecular Docking of Mycotoxins with α -Hemolysin Protein Nanopore

Maria Isabel dos Santos Cavalcanti¹, Débora Brígida Moura de Freitas¹, Catarina Victoria Nascimento de Oliveira¹, Artur Alves Rodrigues da Silva¹, Claudio Gabriel Rodrigues¹

¹Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco (Pernambuco, Brasil)

INTRODUCTION: Mycotoxins (MTXs) are toxic secondary metabolites produced by fungi of the phylum *Ascomycota*. They are able to affect specimens of food crops, impacting the health of animals due to contamination of grains and cereals, as well as human health, causing mycotoxicosis. The techniques for detecting, quantifying and discriminating these toxins are time-consuming and expensive. **OBJECTIVES:** In this research, a predictive analysis of MTXs interaction with a protein nanopore of α -hemolysin (PN) from *Staphylococcus aureus* was performed through a receptor-ligand molecular docking. **MATERIALS AND METHODS:** The analyzed ligands were ochratoxin A (OTA) and fumonisins B1 (FB1), B2 (FB2) and B3 (FB3), obtained from PubChem. The energy was minimized by Avogadro 1.1.3. Furthermore, the crystallographic structure of α -hemolysin PN was obtained from the Protein Data Bank (PDB), code 7AHL, and the solvent removed. The molecular docking was performed using DockThor and GOLD (in duplicate), both with the same PN coordinates (Å): 39,188, 32,853 and 31,429 for X, Y and Z. The results were analyzed in Discovery Studio Visualizer, generating a graphic representation of the receptor-ligand in addition to a 2D diagram of interactions. **DISCUSSION AND RESULTS:** The DockThor results showed affinity scores (Kcal/mol) of -6,288, -6,786, -7,289 and -7,156 for OTA, FB1, FB2 and FB3, respectively. It also displays many hydrogen interactions for all molecules, beyond pi-sulfur, alkyl, salt bridges and charge attraction interactions. The average of the GOLDScore Fitness (Kcal/mol) results were: 32.1 (OTA), -61.36 (FB1), -62.02 (FB2) and -38.93 (FB3) with less hydrogen interactions. **CONCLUSION:** Mycotoxins anchor in the constriction region of the α -hemolysin nanopore forming molecular complexes stabilized mainly by hydrogen interactions.

Keywords: molecular docking, mycotoxins, α -hemolysin

Supported by: FACEPE