



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MARIA ISABEL DOS SANTOS CAVALCANTI

**ESTUDO TEÓRICO-COMPUTACIONAL DA INTERAÇÃO DE
MICOTOXINAS COM NANOPORO PROTEICO**

Recife
2024

MARIA ISABEL DOS SANTOS CAVALCANTI

ESTUDO TEÓRICO-COMPUTACIONAL DA INTERAÇÃO DE MICOTOXINAS COM NANOPORO PROTEICO

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

Orientador: Prof. Dr. Claudio Gabriel Rodrigues

Co-orientador: Dr. Artur Alves da Silva

Recife
2024

MARIA ISABEL DOS SANTOS CAVALCANTI

ESTUDO TEÓRICO-COMPUTACIONAL DA INTERAÇÃO DE MICOTOXINAS COM NANOPORO PROTEICO

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

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Claudio Gabriel Rodrigues
UFPE/ Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Prof. Dr. Antônio Gomes de Castro Neto
UFPE/ Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Prof. Me. Jhonatan Deivs Barros Alves
UFRPE/ Departamento de Físico-Química

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois tudo o que vi, vivi e aprendi reafirmam para mim a Sua existência.

Meu sincero e profundo agradecimento ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio Gabriel Rodrigues, que acreditou e confiou em mim e me deu autonomia para desenvolver minhas habilidades. Ao meu coorientador, Dr. Artur Alves da Silva, que também é um grande amigo e me ensinou muitas coisas.

A toda a equipe do Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-Tronco – Dr. Oleg Krasilnikov (LBM-CT), Profa. Dijanah, que me iniciou na jornada científica com a mais genuína paciência (sério, obriga pela paciência), Profa. Lilyia, que desde o início me incentivou, me instigou a aprender mais e acreditou em mim, meus amigos de trabalho Túlio Queiroga, Wyndly Daniel, Prof. Dr. Janilson da Silva Júnior, Adja Maria, Arthur van Lauther, vocês todos colaboraram para o meu desenvolvimento na Universidade. Obrigada por todo suporte, pelas conversas, pelas trocas de conhecimento, pela abertura à construção de uma boa amizade.

Agradeço à FACEPE, que foi fundamental para minha entrada e permanência na equipe do LBM-CT.

A todos do Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Charles, que sempre chega antes de todos nós e abre o departamento, deixando os ambientes dos laboratórios sempre arejados e limpinhos, e cuidando de tudo antes de nós. Ao Secretário da Biofísica, Jorge, por toda a disponibilidade, paciência e simpatia. Ao Prof. Dr. Thiago de Salazar, pelas conversas produtivas durante o almoço, que sempre me instigaram e ampliaram as ideias. Nunca imaginei que fosse me tornar amiga de um professor.

Aos amigos e amigas da Universidade, Marília Raphaella, Micaela Evellin, Brenda Marques, Larissa Brito, Beatriz Oliveira, Ianka Lacerda, Daiane Fernanda, Caio Barros, Débora de Freitas, aos membros do Projeto de Extensão Conversa Sanguínea. Ao nosso amigo do bairro, Carlos Frey, que salvou este trabalho duas vezes.

Aos que compunham minha Banca Avaliadora, o Prof. Dr. Antônio Gomes de Castro Neto e o Prof. Me. Jhonatan Deivs Barros Alves, pela honra de aceitarem ao convite.

Não posso deixar de estender meus agradecimentos mais sinceros aos meus pais, Marcos Carneiro Cavalcanti e Anna Paula dos Santos Cavalcanti, que nas poucas condições sempre me incentivaram a amar os estudos, a leitura e me ensinaram desde cedo a ter autonomia. Aos meus tios e tias, pelo apoio e incentivo. Ao grande amor da minha vida, Willys Jathyles de Albuquerque Candido, que me fez reencontrar a esperança e me instigou a perseguir novamente o sonho de entrar na UFPE, que me apoiou, acreditou em mim e me acompanhou durante toda a jornada na formação em Biomedicina. À minha sogra, Elisaneide Carmo de Albuquerque, que sempre nos deu muito apoio e segue nos dando suporte. Amo vocês.

*“Tente mover o mundo – o primeiro passo será
mover a si mesmo.”*

Platão.

CAVALCANTI, Maria Isabel dos Santos. **Estudo teórico-computacional da interação de micotoxinas com nanoporo proteico**. 2024. 58. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

As micotoxinas (MTXs) são metabólitos secundários produzidos por fungos de diversas espécies. Estas tornaram-se um grande problema para a agroindústria, devido aos danos que causam a cultivos, animais e, conseqüentemente, à saúde humana. Tais substâncias desempenham mecanismos de toxicidade que implicam em comprometimento hepático, neurológico, renal e reprodutivo, além de terem efeito carcinogênico, a partir do seu contato com o organismo, seja por ingestão, inalação ou penetração cutânea. Dentre os métodos utilizados para a detecção de MTXs, o Biossensoriamento Estocástico tem apresentado resultados promissores, através do uso de uma α -toxina bacteriana com capacidade de formação de poros de membrana, ou nanoporo proteico (NP), que é dividido em três porções: copal, anelar e troncular. O bloqueio temporário do lúmen do NP de α -toxina, em sua região de estreitamento, localizada na porção anelar, por uma molécula-analito gera uma oscilação temporária na corrente elétrica, a qual, sendo observada em um determinado espaço de tempo, produz um padrão denominado de "impressão digital". Com o advento dos métodos de simulação computacional, tornou-se possível estudar a interação entre uma proteína (ou receptor) e um ligante, a partir de uma técnica *in silico* denominada Ancoragem Molecular (AM) ou *molecular docking*. Através desta ferramenta de análise teórica, é possível calcular as energias de interação e os modos de ligação na formação de um complexo receptor-ligante dentro de uma caixa com dimensões pré-definidas. Também é possível identificar de que maneira o ligante interage com a proteína, se por ligações de hidrogênio, pontes salinas ou outras, bem como avaliar como este ligante torciona para promover a formação deste complexo. Neste trabalho foi estudada a interação de Fumonisina B1, Toxina T2, Desoxinivalenol, Nivalenol e Ocratoxina A com um NP formado por α -hemolisina de *Staphylococcus aureus*, através do método de AM. As moléculas das MTXs foram obtidas a partir do banco de moléculas PubChem e o NP, a partir do *Protein Data Bank* (PDB). As coordenadas da caixa de análise foram definidas para a porção Troncular e a região de Estreitamento do NP. O *docking* foi realizado utilizando-se uma plataforma online e nacional, o DockThor, e um *software* internacional, o *Genetic Optimization for Ligand Docking* (GOLD). Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Discovery Studio Visualizer, a partir do qual é possível obter uma representação gráfica do complexo receptor-ligante, juntamente com seu perfil de interações intermoleculares. As ancoragens foram feitas em triplicata e foi calculada a Média Aritmética das pontuações geradas por ambas as plataformas. As médias das pontuações geradas pelo GOLD foram comparadas utilizando-se Análise de Variância (ANOVA). Os resultados demonstraram que as MTXs interagem com resíduos de aminoácidos específicos da região de estreitamento do NP, como LYS147, GLU111 e MET113, bem como os resíduos da porção troncular, SER141 e ASN139. Estas interações são mediadas principalmente por ligações de hidrogênio convencionais, ligações carbono-hidrogênio e interações alquila. Estes resultados corroboram com o que já foi descrito na literatura, bem como com o que já se observou experimentalmente com FB1 e OTA.

Palavras-chave: Ancoragem Molecular. α -toxina. Biossensoriamento. Simulações computacionais.

CAVALCANTI, Maria Isabel dos Santos. **Theoretical-computational study of the interaction of mycotoxins with protein nanopores**. 2024. 58. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

Mycotoxins (MTXs) are secondary metabolites produced by fungi of different species. This has become a major problem for the agroindustry, due to the damage it causes to cultivars, animals and, consequently, human health. Such substances carry out toxicity mechanisms that result in hepatic, neurological, renal and reproductive impairment, in addition to having a carcinogenic effect, through contact with the body, whether through invasion, inhalation or skin penetration. Among the methods used to detect MTXs, Stochastic Biosensing has shown promising results, through the use of a bacterial α -toxin with the capacity to form membrane pores, or protein nanopores (NP), which is divided into three portions: copal, ring and stem. The temporary blockage of the lumen of the α -toxin NP, in its narrowing region, located in the ring portion, by an analyte molecule generates a temporary oscillation in the electrical current, which, when observed over a certain period of time, produces a pattern called "fingerprint". With the advent of computational simulation methods, it became possible to study the interaction between a protein (or receptor) and a ligand, using an in silico technique called Molecular Anchoring (AM) or molecular docking. Using this theoretical analysis tool, it is possible to calculate the interaction energies and binding modes in the formation of a receptor-ligand complex within a box with pre-defined dimensions. It is also possible to identify how the ligand interacts with the protein, whether through oxygen bonds, salt bridges or others, as well as evaluate how this ligand twists to promote the formation of this complex. In this work, the interaction of Fumonisin B1, Toxin T2, Deoxynivalenol, Nivalenol and Ochratoxin A with a NP formed by α -hemolysin from *Staphylococcus aureus* was scientific, using the AM method. The MTX molecules were obtained from the PubChem molecule bank and NP from the Protein Data Bank (PDB). The coordinates of the analysis box were defined for the Trunk portion and the Narrowing region of the NP. Docking was carried out using an online and national platform, DockThor, and international software, Genetic Optimization for Ligand Docking (GOLD). The results were analyzed using the Discovery Studio Visualizer program, from which it is possible to obtain a graphical representation of the receptor-ligand complex, together with its profile of intermolecular interactions. The anchorings were done in triplicate and the Arithmetic Mean of the scores generated by both platforms was calculated. The mean scores generated by GOLD were compared using Analysis of Variance (ANOVA). The results demonstrated that MTXs interact with specific amino acid residues in the NP narrowing region, such as LYS147, GLU111 and MET113, as well as residues in the trunk portion, SER141 and ASN139. These interactions are mediated mainly by conventional hydrogen bonds, carbon-hydrogen bonds and alkyl interactions. These results corroborate what has already been described in the literature, as well as what has already been observed experimentally with FB1 and OTA.

Key words: Molecular Docking. α -toxin. Biosensing. Computer simulations.

LISTA DE ABREVIÇÕES

AFs	Aflatoxinas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATA	Aleucia Tóxica Alimentar
AG	Algoritmo Genético
AM	Ancoragem Molecular
DON	Desoxinivalenol
FB1	Fumonisina B1
FUMs	Fumonisinias
MTXs	Micotoxinas
NP	Nanoporo Proteico
NIV	Nivalenol
OTs	Ocratoxinas
OTA	Ocratoxina A
TCAAs	Ácidos Tricarbalílicos
TON2	Toxina T-2

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Limites Máximos Tolerados, internacionais, das micotoxinas, segundo a Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (EFSA), <i>Food and Drug Administration</i> (FDA) e a Comissão Europeia (EC).	17
Tabela 2.	Limites Máximos Tolerados, no Brasil, de micotoxinas em diversos grupos alimentares (grãos, cereais, milho, soja, café), segundo Normativa N N ^o 160, de 1 ^o de julho de 2022, ANVISA.	18
Tabela 3.	Coordenadas de origem das porções troncular e anelar da α -toxina.	31
Tabela 4.	Médias Aritméticas e Desvio Padrão dos valores de Fitness e S_{Hbond} de Fumonisina B1, Ocratoxina A, Desoxinivalenol, Toxina T2 e Nivalenol com a região de estreitamento do NP.	36
Tabela 5.	Médias Aritméticas e Desvio Padrão ($\bar{X} \pm SD$) dos valores de Fitness e S_{Hbond} de Fumonisina B1, Ocratoxina A, Desoxinivalenol, Toxina T2 e Nivalenol com a Porção Troncular do NP.	39
Tabela 6.	Valores de Energias para a região troncular.	41
Tabela 7.	Valores de Energias para a região anelar.	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema de formação da bicamada lipídica plana. Em A, a câmara de Teflon[®], dividida em dois lados (cis e trans) por uma partição do mesmo material, contendo um orifício central que comunica os dois lados. Em B e C, a formação da bicamada lipídica por meio do aumento da capacitância (aumento da onda quadrada). 19
- Figura 2. Comparação entre as estruturas de FB1 (à esquerda e em cima) e sua forma hidrolisada (à direita e em cima) com as estruturas de esfingosina (à esquerda e embaixo) e esfinganina (à direita e embaixo). 21
- Figura 3. Divisão dos tricotecenos em 4 grupos. 22
- Figura 4. Esquema de passo a passo para realização da ancoragem molecular. Em verde, sequência de procedimentos para obtenção e preparo das moléculas e, em roxo, sequência de procedimentos para obtenção e preparo das estruturas proteicas. 26
- Figura 5. A) Estruturas Moleculares das MTXs. B) Otimização no Avogadro 2.0. 28
- Figura 6. A) Estrutura cristalográfica da α -toxina e suas três porções: copal, anelar e troncular. B) Região de constrição (círculo preto indicado por seta). C) Proteína antes da remoção do solvente. D) Proteína após remoção do solvente. 30
- Figura 7. Perfis de interação de OTA, FB1, NIV, DON e TON2 com a região de estreitamento do NP. Dentro dos círculos, os resíduos de aminoácidos com os quais ocorrem as interações também apresentam letras, indicando a qual cadeia do NP pertencem. Cada cor de pontilhado representa um tipo de interação: alquila (em rosa), π -alquila (em rosa-claro), ligação de hidrogênio convencional (em verde), ligação carbono-hidrogênio (em verde-claro), enxofre-x (em amarelo). Os números ao lado dos tracejados indicam as distâncias das interações. 34
- Figura 8. Comparação entre as médias de *fitness* de cada MTXs na Porção Anelar. Teste Tukey ($p < 0.05$) 36
- Figura 9. Médias dos *Fitness* de Fumonisina B₁ (FB1), Ocratoxina A (OTA), Nivalenol (NIV), Desoxinivalenol (DON) e Toxina T-2 (TON2) na constrição do NP. As médias são estatisticamente diferentes. (ANOVA, $p = 0.05$). 36
- Figura 10. Perfis de interação de OTA, FB1, NIV, DON e TON2 com a porção troncular do NP. Dentro dos círculos, os resíduos de aminoácidos com os quais ocorrem as interações também apresentam letras, indicando a qual cadeia do NP pertencem. Cada cor de pontilhado representa um tipo de interação: ligação de hidrogênio convencional (em verde), ligação carbono-hidrogênio (em verde-claro), alquila (em rosa). Os números ao lado dos tracejados indicam as distâncias das interações. 37
- Figura 11. Comparação entre as médias de *fitness* de cada MTXs na Porção Troncular. Teste Tukey ($p < 0.05$). 39
- Figura 12. Médias dos *Fitness* de Fumonisina B₁ (FB1), Ocratoxina A (OTA), Nivalenol (NIV), Desoxinivalenol (DON) e Toxina T-2 40

(TON2) na região troncular. As médias são estatisticamente diferentes. (ANOVA, $p= 0.05$).

- Figura 13. Perfis de interação de OTA, FB1, NIV, DON e TON2 com a porção troncular do NP. Dentro dos círculos, os resíduos de aminoácidos com os quais ocorrem as interações também apresentam letras, indicando a qual cadeia do NP pertencem. Cada cor de pontilhado representa um tipo de interação: alquila (em rosa), ligação de hidrogênio convencional (em verde), ligação carbono-hidrogênio (em verde-claro). Os números ao lado dos tracejados indicam as distâncias das interações. 41
- Figura 14. Perfis de interação de OTA, FB1, NIV, DON e TON2 com a região de estreitamento do NP. Dentro dos círculos, os resíduos de aminoácidos com os quais ocorrem as interações também apresentam letras, indicando a qual cadeia do NP pertencem. Cada cor de pontilhado representa um tipo de interação: alquila (em rosa), π -alquila (em rosa-claro), ligação de hidrogênio convencional (em verde), ligação carbono-hidrogênio (em verde-claro), π -enxofre (em amarelo). Os números ao lado dos tracejados indicam as distâncias das interações. 43
- Figura 15. Médias das Energias Totais de Fumonisina B₁ (FB1), Ocratoxina A (OTA), Nivalenol (NIV), Desoxinivalenol (DON) e Toxina T-2 (TON2) na região troncular. As médias são estatisticamente diferentes. (ANOVA, $p= 0.05$). 44
- Figura 16. Comparação entre as médias de Energia Total de cada MTXs na Porção Troncular. Teste Tukey ($p < 0.05$). 45
- Figura 17. Representação Gráfica em 3D dos complexos MTXs-NP, na região de estreitamento, geradas a partir dos resultados do GOLD. 47
- Figura 18. Representação Gráfica em 3D dos complexos MTXs-NP, na região troncular, geradas a partir dos resultados do GOLD. 49
- Figura 19. Representação Gráfica em 3D dos complexos MTXs-NP, na região de estreitamento, geradas pelo DockThor. 50
- Figura 20. Representação Gráfica em 3D dos complexos MTXs-NP, na região troncular, geradas pelo DockThor. 51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Micotoxinas	16
2.2. Biossensoriamento Estocástico	18
2.3. Algumas Micotoxinas	20
2.3.1. Fumonisinias	20
2.3.2. Tricotecenos	22
2.3.3. Ocratoxina A	24
2.4. Ancoragem Molecular	25
3. OBJETIVOS	28
4. METODOLOGIA	29
4.1. Obtenção e Preparação das Moléculas de Micotoxinas	29
4.2. Obtenção e Preparação do Nanoporo Proteico	30
4.3. Cálculo das Coordenadas de Origem	31
4.4. Realização da Ancoragem Molecular	31
4.4.1. Genetic Optimization for Ligand Docking (GOLD)	32
4.4.2. DockThor	33
4.5. Análise dos Resultados	33
4.5.1. Representação Gráfica das Interações entre as MTXs e o NP	33
4.5.2. Estudo Estatístico	34
5. RESULTADOS	35
5.1. Resultados Obtidos Pelo GOLD	35
5.1.1. Interação das MTXs com a Região de Construção do NP	35
5.1.2. Interação das MTXs com a Porção Troncular	38
5.2. Resultados Obtidos pelo DockThor	41
5.2.1. Interação das MTXs com a Porção Troncular do NP	41
5.2.2. Interação das MTXs com a Região de Construção do NP	42
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

As Micotoxinas (MTXs) são produtos de metabolismo secundário de fungos de diversas espécies, capazes de desempenhar um papel tóxico ao entrar em contato com outros organismos, sejam plantas, animais ou seres humanos (JURASCHEK et al, 2022). A contaminação por estas substâncias resulta no desenvolvimento das “micotoxicoses” (LI et al, 1999; HOERR, 2020), uma série de doenças relacionada aos seus mais diversos mecanismos de patogênese.

Dentre as MTXs mais frequentemente encontradas, destacam-se a Fumonisina B₁ (FB1), a Ocratoxina A (OTA), o Desoxinivalenol (DON), o Nivalenol (NIV) e a Toxina-T2 (TON2), as quais têm alta prevalência e são extremamente tóxicas (QUINTELA, 2021). A FB1 esteve associada a um surto de Leucoencefalomalacia em equinos na África do Sul, por volta de 1970 (MARASAS et al, 1988). Houve registros de contaminação por TON2, na antiga União Soviética, devido à ocorrência de Aleucia Alimentar Tóxica (conhecida como ATA), além de casos de envenenamento na China, por volta de 1985, e na Índia, em 1987, por consumo de pão e cereais mofados, contaminados por DON, NIV e TON2 (SUBEDI, 2015; LI et al, 1999). Ademais, a OTA foi relacionada à Nefropatia Endêmica dos Balcãs, uma doença endêmica da Bulgária (CASTEGNARO ET AL, 2006).

Os principais métodos utilizados na detecção, identificação e quantificação de MTXs consistem na implementação de técnicas cromatográficas associadas a espectrometria de massas, tornando-se ferramentas de alta sensibilidade e especificidade, contudo dispendiosas e custosas (PEREIRA et al, 2014). Métodos emergentes no âmbito dos biossensores fornecem alternativas de baixo custo e alta sensibilidade na detecção dessa classe de moléculas (HERNANDEZ-VARGAS et al, 2018). Neste campo, a utilização de um biossensor proteico, formado por um nanoporo unitário em uma bicamada lipídica plana, denota ser capaz de detectar, identificar e quantificar diversos analitos, tornando-se uma ferramenta promissora na área (AGUIAR et al, 2015). O princípio de detecção é baseado em um sistema estocástico com a passagem e interação de forma aleatória dos

analitos pelo lúmen aquoso da estrutura proteica, observando-se oscilações discretas da corrente iônica, a ser captada por todo um aparato eletrônico (SILVA et al, 2024).

Com o advento das novas tecnologias, os modelos de simulação computacional se tornaram ferramentas bastante viáveis na triagem de moléculas, na elucidação de mecanismos de interação intermolecular, no estudo quântico de interações intermoleculares, no desenvolvimento de novos fármacos, ganhando cada vez mais o campo multidisciplinar (FU et al, 2018). O estudo dos mecanismos de interação molecular através da utilização dessas ferramentas computacionais, tem auxiliado na obtenção de informações do processo de interação de variados analitos com nanoporos proteicos unitários (SILVA JÚNIOR et al, 2019). A busca por essas elucidações oportuniza a aplicação de técnicas de ancoragem molecular, a fim de investigar modelos de interações, diminuir custos operacionais, fornecer robustez e suporte aos dados analisados (SABE et al, 2021).

Diante de todo o panorama exposto anteriormente, este trabalho traz um estudo teórico-computacional, através do método de ancoragem molecular, acerca da interação entre as MTX e o nanoporo proteico (NP) formado pela α -hemolisina de *Staphylococcus aureus*. Foram selecionadas a FB1, a OTA, o DON, o NIV e a TON2 com a finalidade de analisar e elucidar as principais interações entre essas substâncias e o NP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Contaminantes químicos são um grupo de compostos potencialmente tóxicos capazes de causar danos ao meio ambiente e, conseqüentemente, ao ser humano. Podem originar-se no solo, no ar, na água e em processos de industrialização e cultivo, podendo comprometer a produção e armazenamento de alimentos (RATHER et al, 2017; ZINI & GUTTERRES, 2021). Segundo a classificação da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), os contaminantes alimentares se distribuem em: (i) metais tóxicos, como arsênio, mercúrio, cádmio e chumbo; (ii) contaminantes industriais e ambientais, como óleos minerais, dioxinas e hidroximetilfurfural; (iii) substâncias orgânicas, como

ácido peracético, formaldeído e melamina; (iv) micotoxinas e biotoxinas, como teobromina, alcaloides, aflatoxinas e fumonisinas; (v) resíduos medicamentosos, como antibióticos, verde malaquita e coccidiostáticos; e outros contaminantes (EFSA, 2019; MAHER & NOWAK, 2022).

2.1. Micotoxinas

As micotoxinas (MTXs) consistem em um amplo conjunto de metabólitos secundários fúngicos capazes de desencadear uma série de mecanismos de toxicidade em plantas, animais e, impactando sobre a saúde humana (DEY et al, 2023; JURASCHEK et al, 2022). Dentre as principais espécies produtoras destas substâncias, destacam-se as pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* e *Claviceps*, a partir dos quais são produzidas moléculas como as Aflatoxinas (AFs), Fumonisinas (FUMs), Tricotecenos (TCTs), Ocratoxinas (OTs), entre outras (EL-SAYED et al, 2022). São divididas em grupos de acordo com sua complexidade molecular, suas propriedades físico-químicas, e sua produção depende de fatores específicos como temperatura, umidade relativa do ar, densidade da água, pH ideal, concentração de oxigênio e da composição do substrato onde se desenvolvem (TANIWAKI et al, 2019).

As MTXs tornaram-se objeto de estudo de extrema importância para o setor agrícola, já que muitos registros da presença destes compostos estão diretamente relacionados à criação, produção e armazenamento de *commodities*, das quais destacam-se milho, soja, amendoim, maçã, uva e café, cereais, grãos e rações, afetando também a saúde de aves, suínos e bovinos, já que estes podem contaminar-se a partir da ingestão de rações contaminadas, resultando em grande impacto econômico para a indústria agrícola (UDOMKUN et al, 2017; PRESTES et al, 2019; MAGNOLI et al, 2019). Segundo a Revisão Global de Micotoxinas da Selko, das 52 mil amostras de insumo coletadas, o percentual de contaminação foi de 31 a 69% para desoxinivalenol (DON), toxina T2 (TON2), zearalenona (ZEA), fumonisinas (FUMs), aflatoxinas (AFs) e ocratoxina A (OTA) (SELKO, 2023).

Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), cerca de 25% da produção agrícola global anual está contaminada por micotoxinas (MAGNOLI et al, 2019; JANIK et al, 2020). Para a Organização

Mundial da Saúde (OMS), contaminações por micotoxinas são inevitáveis, seja no processo de cultivo, colheita ou armazenamento. Portanto, várias estratégias de manejo são utilizadas a fim de reduzir os danos, além da adoção de normas para evitar que a produção de MTXs comprometa a produção agrícola (SCHLOSSER et al, 2020; TAN et al, 2023). No Tabela 1 estão indicados, de maneira resumida, os Limites Máximos Tolerados (LMTs) por organizações internacionais, como a FDA dos Estados Unidos, a Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (EFSA) e a Comissão Europeia (EC).

Tabela 1. Limites Máximos Tolerados, internacionais, das micotoxinas, segundo a Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (EFSA), *Food and Drug Administration* (FDA) e a Comissão Europeia (EC).

Micotoxinas	Limites Máximos Toleráveis	Organizações
Fumonisina B ₁	2 µg/ kg 2000-4000 µg/ kg 200-4000 µg/ kg	EFSA (TDI) US FDA EC
Ocratoxina A	5 ng/ kg não estabelecido 2-15 µg/ kg	EFSA (TDI) US FDA EC
Desoxinivalenol	1 µg/ kg 1000-1000 µg/ kg 200-1750 µg/ kg	EFSA (TDI) US FDA EC
Nivalenol	1.2 µg/ kg não estabelecido não estabelecido	EFSA (TDI) US FDA EC
Toxina T-2	100 ng/ kg não estabelecido 100 ng/ kg	EFSA (TDI) US FDA EC
Toxina HT-2	100 ng/ kg não estabelecido 250-1000 µg/ kg	EFSA (TDI) US FDA EC

Fonte: JURASCHEK et al (2022) e JANIK et al (2020).

O Brasil está entre os maiores produtores de *commodities* do mundo. Em 2021, o país liderou o 32% do mercado internacional, produzindo 3,4 milhões de toneladas de café. Além disso, a produção brasileira de frutas ocupou 5,4 % da produção mundial, com 58 milhões de toneladas, sendo o terceiro maior do planeta (EMBRAPA, 2022). Entretanto, da mesma maneira como as MTXs afetam a produção em outros países, também comprometem a produção agrícola brasileira que, por ocorrer em território tropical, fornece um ambiente bastante favorável ao desenvolvimento de fungos e, conseqüentemente, à produção de metabólitos secundários tóxicos. Na Tabela 2 estão listados resumidamente os (LMTs) no Brasil, segundo a Normativa Nº 160 da ANVISA,

formulada em 2022 (ANVISA, 2022). Não foram encontrados os LMTs para Toxina T-2 e o Nivalenol.

Tabela 2. Limites Máximos Tolerados, no Brasil, de micotoxinas em diversos grupos alimentares (grãos, cereais, milho, soja, café), segundo Normativa N N° 160, de 1° de julho de 2022, ANVISA.

Micotoxinas	Limite Máximo Tolerados (µg/ Kg)
Desoxinivalenol	200 - 2000
Fumonisinias B ₁ e B ₂	200 - 5000
Ocratoxina A	2 - 30
Toxina T-2	não encontrado
Nivalenol	não encontrado

É possível contaminar-se por estas toxinas através da exposição das vias aéreas, das mucosas gastrointestinais, ou seja, por ingestão, e por contato cutâneo, acarretando uma série de doenças que começam a se desenvolver no organismo por diversos mecanismos de toxicidade, as denominadas “micotoxicoses” (ZAIN et al, 2011). Os efeitos tóxicos relacionados às MTXs já foram bem descritos e relatados diversas vezes na literatura, os quais vão desde irritação de mucosas do trato digestório, até lesões renais e hepáticas, comprometimento neurológico e imunológico, reprodutivo, além de oncogênese (HAQUE et al, 2020). Os principais mecanismos de ação estão associados a inibição de proteínas, intervenção na expressão gênica, danos ao DNA, interferência em vias metabólicas e de ativação de inflamação, mecanismos de apoptose, estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (WU et al, 2014).

Há, atualmente, uma ampla gama de métodos de detecção de MTXs, a maioria deles envolvendo Cromatografia e Espectrometria, dos quais pode-se aqui destacar: Cromatografia em Camada Delgada (CCD); a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que pode ser acoplada a Detectores por Fluorescência (DF), Ultravioleta (UV), Arranjos de Diodo (DAD) ou Espectrometria de Massas (EM); a Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Captura de Elétron (DCE), Detector por Ionização de Chama (DIC), Detecção Seletiva de Massa (SM); Ensaio de Imuno-absorção Enzimática (ELISA) (JANIK, 2021; ALSHANNAQ, 2017).

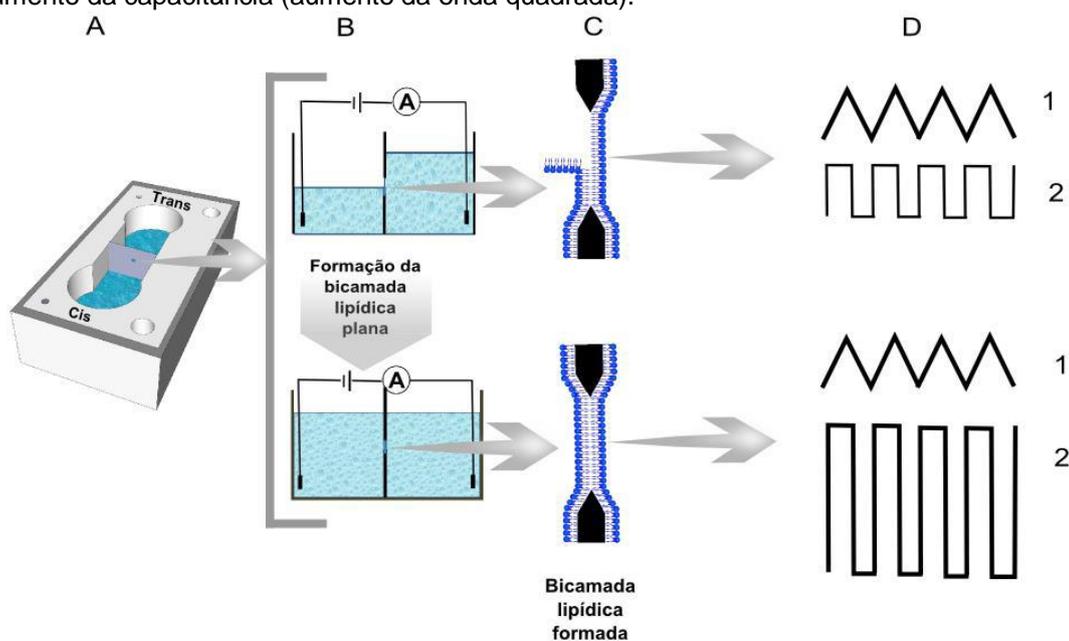
2.2. Biossensoriamento Estocástico

Um método bastante promissor para a detecção, identificação e

quantificação de substâncias é o Biossensoriamento Estocástico, que consiste na utilização de um nanoporo proteico (NP) unitário inserido em uma bicamada lipídica plana, a qual é banhada em solução eletrolítica (AGUIAR et al, 2015; SILVA et al, 2024). A formação da bicamada lipídica se dá como demonstrado na Figura 1, onde é adicionado um lipídeo em ambos os lados da câmara, com a solução abaixo do orifício. Quando a solução eletrolítica nos dois lados sobe até cobrir o orifício, é observado o aumento da capacitância (onda quadrada), indicando que as duas lâminas lipídicas foram formadas.

Mergulhados nesta solução estão dois eletrodos de prata-cloreto de prata, cada um em um lado (Cis e Trans) de uma câmara de Teflon[®], que conectam o sistema a uma Gaiola de Faraday, acoplada a um conjunto de amplificador de sinal e filtro, que enviam sinais de corrente iônica para um computador, onde as informações ficam armazenadas. A detecção da molécula se dá a partir do bloqueio parcial de corrente iônica do NP, onde se observa a oscilação da onda quadrada, em pequenos intervalos de tempo. O padrão de bloqueios observado ao longo de uma série temporal define uma “impressão digital” da molécula, permitindo assim, sua identificação (SILVA JÚNIOR et al, 2019).

Figura 1. Esquema de formação da bicamada lipídica plana. Em A, a câmara de Teflon[®], dividida em dois lados (cis e trans) por uma partição do mesmo material, contendo um orifício central que comunica os dois lados. Em B e C, a formação da bicamada lipídica por meio do aumento da capacitância (aumento da onda quadrada).



Fonte: SILVA-JÚNIOR, 2017.

2.3. Algumas classes de Micotoxinas

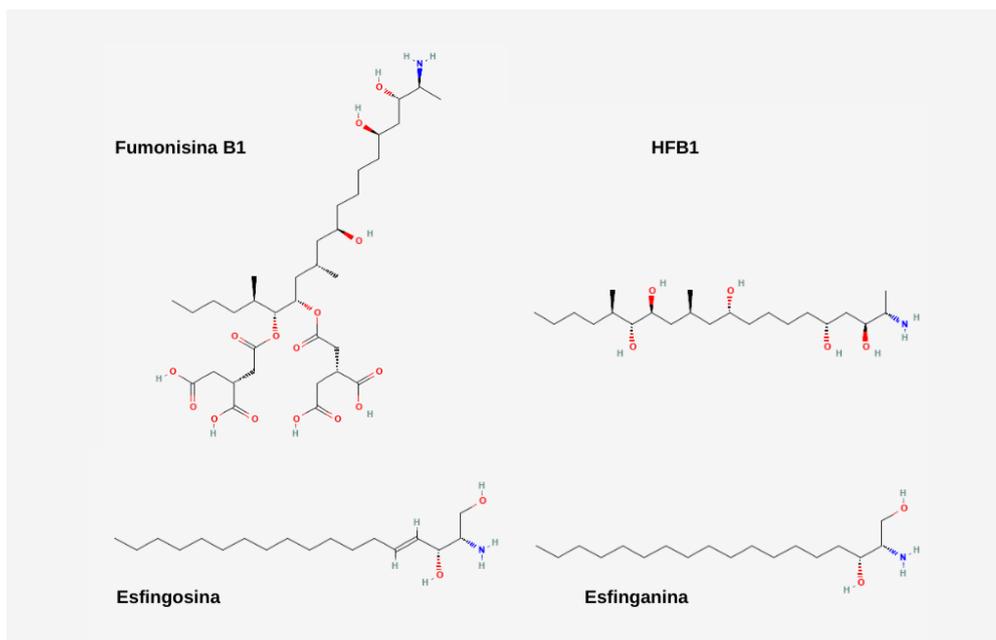
Neste trabalho foram abordadas apenas as micotoxinas selecionadas para realização da ancoragem: as fumonisinas, os tricotecenos e as ocratoxinas. Visando elucidar os resultados experimentais observados em SILVA et al (2023), foram selecionadas a fumonisina B₁ e a ocratoxina A. Como ainda não foram realizados experimentos de biossensoriamento com os tricotecenos, mas foram selecionados os de maior incidência: desoxinivalenol, toxina T-2 e nivalenol.

2.3.1. Fumonisinas

Fumonisinas (FUMs) são um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por fungos do gênero *Fusarium*, composto por cerca de 28 análogos, tais como FA1, FA2, FA3, PHFA3a, PHFA3b, HFA3, FAK1, FBK1, FB1, Iso-FB1, PHFB1a, PHFB1b, HFB1, FB2, FB3, FB4, FB5, FC1, N-acetyl-FC1, Iso-FC1, N-acetyl-iso-FC1, OH-FC1, N-acetyl-OH-FC1, FC3, FC4, FP1, FP2, FP3 sendo a Fumonisina B₁ (FB1) a mais tóxica e mais abundante (DELLAFIORA et al, 2018). Os principais registros do fungo produtor desta substância estão associados à produção de cereais e milho, podendo levar ao desenvolvimento de estresse oxidativo, defeitos no sistema reprodutivo e comprometimento neurológico, a partir da interferência na síntese de lipídios (CHEN et al, 2021).

A FB1 é um aminopoliol que apresenta estrutura molecular formada por 20 carbonos com grupos metil nas posições 12 e 16, e 2 grupos de propano-1,2,3-tricarboxílico, ou ácidos tricarboxílicos (TCAs) esterificados nos grupamentos hidroxílicos das posições 14 e 15, formando assim, uma estrutura semelhante a de um lipídio (QIN et al, 2017; KIM et al, 2006). Na Figura 2 estão representadas as estruturas moleculares da FB1, seguida de sua forma hidrolizada (HFB1), onde há perda dos TCAs, tornando-a semelhante à esfingosina e à esfinganina, precursoras da ceramida.

Figura 2. Comparação entre as estruturas de FB1 (à esquerda e em cima) e sua forma hidrolizada (à direita e em cima) com as estruturas de esfingosina (à esquerda e embaixo) e esfinganina (à direita e embaixo).



Fonte: Elaborado pela autora.

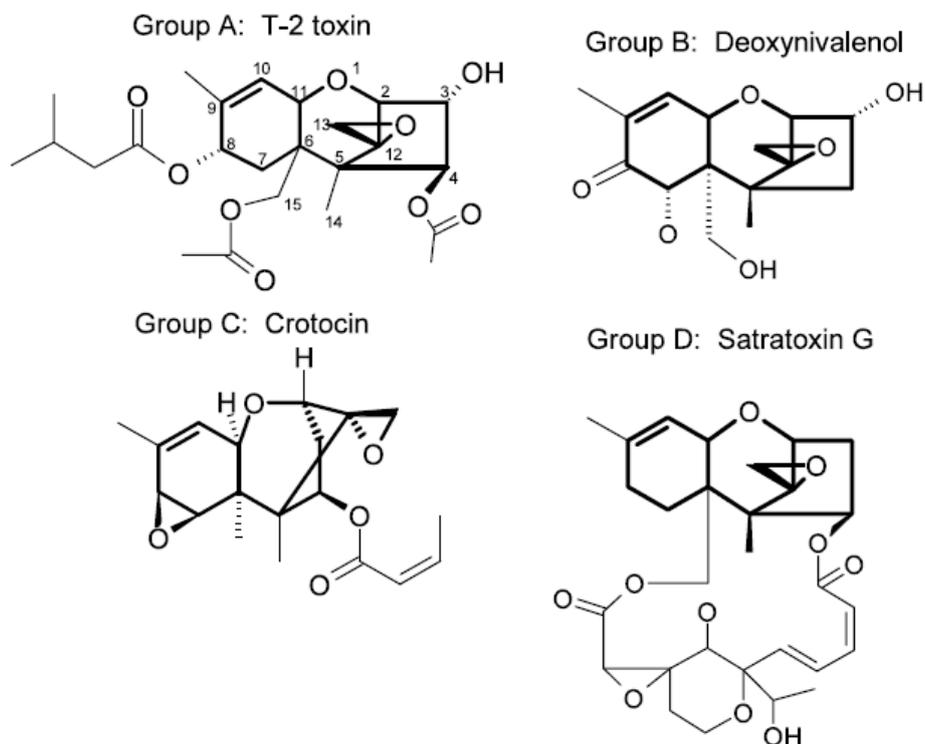
Estas semelhanças fazem com que as fumonisinas tenham um mecanismo citotóxico bastante específico, além dos demais observados nas MTXs, ao interferir na produção de esfingolipídios e ceramida, comprometendo a formação da bainha de mielina em neurônios e a formação da membrana celular de células vegetais (KUMAGAI & HANADA, 2019). Em 1988, um grupo de pesquisadores sul-africanos identificou e caracterizou a estrutura da FB1, comparando-a e classificando-a como uma toxina análoga à esfingosina e esfinganina, que têm sido usadas como marcadores para exposição à FB1 (ZHENG et al, 2020).

2.3.2. Tricotecenos

Tricotecenos (TCTs) são produzidos por fungos do gênero *Fusarium*, classificados como sesquiterpenos cíclicos e distribuídos em grupos de terpenoides simples e de terpenoides macrocíclicos, caracterizados pela presença de anéis epóxidos, com capacidade de desencadear vários mecanismos de toxicidade (FOROUND et al, 2019). Existem cerca de 150 compostos relatados e estão distribuídos em 4 grupos, como pode-se ver na Figura 2: os do grupo A não apresentam grupamento carbonila no C-8, por exemplo, a Toxina T2; já no grupo B, os compostos apresentam carbonila em C-8, como se observa no Desoxinivalenol, por exemplo; o grupo C é caracterizado pela adição de mais um anel epóxido em C-7,8 ou C-9,10; e os compostos do

grupo D apresentam um anel macrocíclico entre as posições 4 e 15 (SUDAKIN, 2003).

Figura 3. Divisão dos tricotecenos em 4 grupos.



Fonte: Sudakin (2003).

O Desoxinivalenol (DON), também conhecido como vomitoxina (TIAN et al, 2016), apresenta nomenclatura, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), (1R,2R,3S,7R,9R,10R,12S) -3,10-dihidroxi-2-(hidroximetil) -1,5-dimetilespiro [8-oxatriciclo [7.2.1.0^{2,7}] dodec-5-eno-12,2'-oxirano] -4-ona. É produzido por fungos como *Fusarium graminearum* e outras espécies, e está associado a uma doença denominada *Fusarium Head Blight* (FHB), que afeta espículas de trigo (SOBROVA et al, 2010; TIAN et al, 2016; OSBORNE et al, 2007). Consiste em uma substância incolor, solúvel em água e solventes polares orgânicos e pode resistir a temperaturas entre 150 e 170°C. A contaminação por DON pode causar sintomas semelhantes a anorexia, mediados por indução de hormônios da saciedade e citocinas pró-inflamatórias, além de episódios de vômito, dores de cabeça, tonturas, diarreia, dor abdominal, chegando a causar presença de sangue nas fezes, em casos mais graves (EFSA et al, 2017; LI et

al, 2022).

A Toxina T2 (TON2) é uma das MTXs mais tóxicas, produzida por várias espécies de *Fusarium*, como *Fusarium verticillioides*, por exemplo, facilmente encontrados em territórios de clima quente. É um sesquiterpenoide tetracíclico que apresenta dois anéis epóxidos, denominada, segundo a IUPAC, como [(1S,2R,4S,7R,9R,10R,11S,12S) -11-acetiloxi-2-(acetiloximetil) -10-hidroxi-1,5-dimetilespiro [8-oxatriciclo [7.2.1.0^{2,7}] dodec-5-eno-12,2'-oxirano] -4-il] 3-metilbutanoato (ADHIKARI, 2017, LI et al, 2022). É insolúvel em água, mas se solubiliza em solventes polares orgânicos, resistente a altas temperaturas e até mesmo autoclavagem. Entre as principais patologias relacionadas à contaminação por Toxina T2, vale destacar a Aleucia Tóxica Alimentar (ATA), caracterizada pelo desenvolvimento de sintomas como náusea, vômito, diarreia, inflamação na mucosa gástrica e intestinal, tendo como principal aspecto hematológico a leucopenia severa, acompanhada de anemia, relatada pela primeira vez em 1940 na União Soviética (LUTSKY, 1981).

Nivalenol, ou 12,13-epóxi-3,4,7,15-tetrahidroxitricotec-9-en-8-ona, segundo a IUPAC, é produzido por várias espécies de *Fusarium* e pertence ao grupo B dos tricotecenos. Sua estrutura é semelhante à do Desoxinivalenol (KUMAR et al, 2022). Os relatos de envenenamento por tricotecenos, na China, no período entre 1989 e 1991, são associados a diversos distúrbios gastrointestinais, inclusive por contaminação conjunta de DON, TON2 e NIV (LI et al, 1999).

2.3.3. Ocratoxina A

Denominada quimicamente como Ácido (2S) -2-[[[(3R) -5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-3,4-dihidroisocumarina-7-carbonil] amino] -3-fenilproanoico pela IUPAC, a Ocratoxina A (OTA) é um membro da família das isocumarinas, derivado de fenilalanina (KŐSZEGLI & POÓR, 2016). Trata-se de um ácido orgânico fraco, que em pH alcalino pode ser solúvel em bicarbonato de sódio. Em pH neutro a ácido, pode se solubilizar em solventes polares, como clorofórmio e metanol. Quando em pH ácido, apresenta fluorescência verde, e em pH alcalino, apresenta fluorescência azul (OLIVEIRA et al, 2019; EL-KHOURY & ATOUI, 2010).

O tempo de meia-vida ($T_{1/2}$) da OTA é de aproximadamente um mês na corrente sanguínea. Liga-se à albumina sérica, após a ingestão, posteriormente se distribuindo para outros órgãos, como fígado, rins, cérebro e tecidos muscular e adiposo (KÓSZEGI & POÓR, 2016; AGARWAL et al, 2020). Diversos mecanismos de toxicidade são observados após a contaminação por esta substância, como a produção de EROs, indução de estresse oxidativo, inibição de síntese proteica, danos ao DNA, desregulação da expressão gênica e interferências em vias metabólicas que envolvem a fenilalanina (KHANEGHAH et al, 2019).

O primeiro registro da OTA foi em 1965, em uma cultura de *Aspergillus ochraceus*, embora também tenha sido observada sua produção por fungos de outras espécies de *Aspergillus* e por espécies do gênero *Penicillium* (VAN DER MERWE et al, 1965). Há cerca de 7 estruturas de Ocratoxinas descritas na literatura: a Ocratoxina A (OTA), objeto de estudo deste trabalho, Ocratoxina B (OTB), Ocratoxina C (OTC), OTA metil-éster, OTB metil-éster, OTB etil-éster, 4-hidroxi OTA, Ocratoxina- α e Ocratoxina- β (LIANG et al, 2015).

2.4. Ancoragem Molecular

Os métodos computacionais de simulação tornaram-se uma ferramenta *in silico* cada vez mais usual como um estudo complementar, pois permite que se explorem propriedades físico-químicas de diversas moléculas, além de estudar suas interações com diferentes proteínas. Inicialmente desenvolvidos para desenho de medicamentos auxiliado por computador, os modelos computacionais ganharam maior espaço, sendo também aplicados à Engenharia de Materiais, à Edição Genética e Ciência Alimentar, por exemplo (YU et al, 2023). Entre os principais métodos de simulação, têm-se a Dinâmica Molecular, o Cálculo Químico Quântico e a Ancoragem Molecular (AM), que foi utilizada neste trabalho e será mais bem explicada a seguir.

A AM é uma tecnologia que foi desenvolvida com base no modelo “chave-fechadura”, onde um ligante pode interagir com uma proteína diretamente em seu sítio de ação, a partir da identificação dos modos de ligação entre uma molécula e seu receptor. Os parâmetros essenciais para definir os modos de ligação são os algoritmos de pesquisa e as funções de pontuação utilizadas por

cada software. Entre os algoritmos mais aplicados, destaca-se o de pesquisa aleatória, que é representado pelo algoritmo genético (GA) e explora os graus de liberdade do ligante no espaço de análise (LEÃO, 2022). Os GAs são baseados na Teoria da Evolução de Darwin, a partir da seleção natural, e tornaram-se ferramentas fundamentais para resolução de problemas de busca e otimização (MAGALHÃES et al, 2004).

A afinidade entre um ligante e um receptor é calculada a partir de uma função de pontuação, a qual baseia-se em método empírico, apresentando pouca acurácia (GUEDES et al, 2020). As funções de pontuação de cada software são variações da função de Energia Livre de Gibbs (equação 1). Mais adiante, as funções dos programas utilizados neste trabalho serão melhor explicadas.

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (1)$$

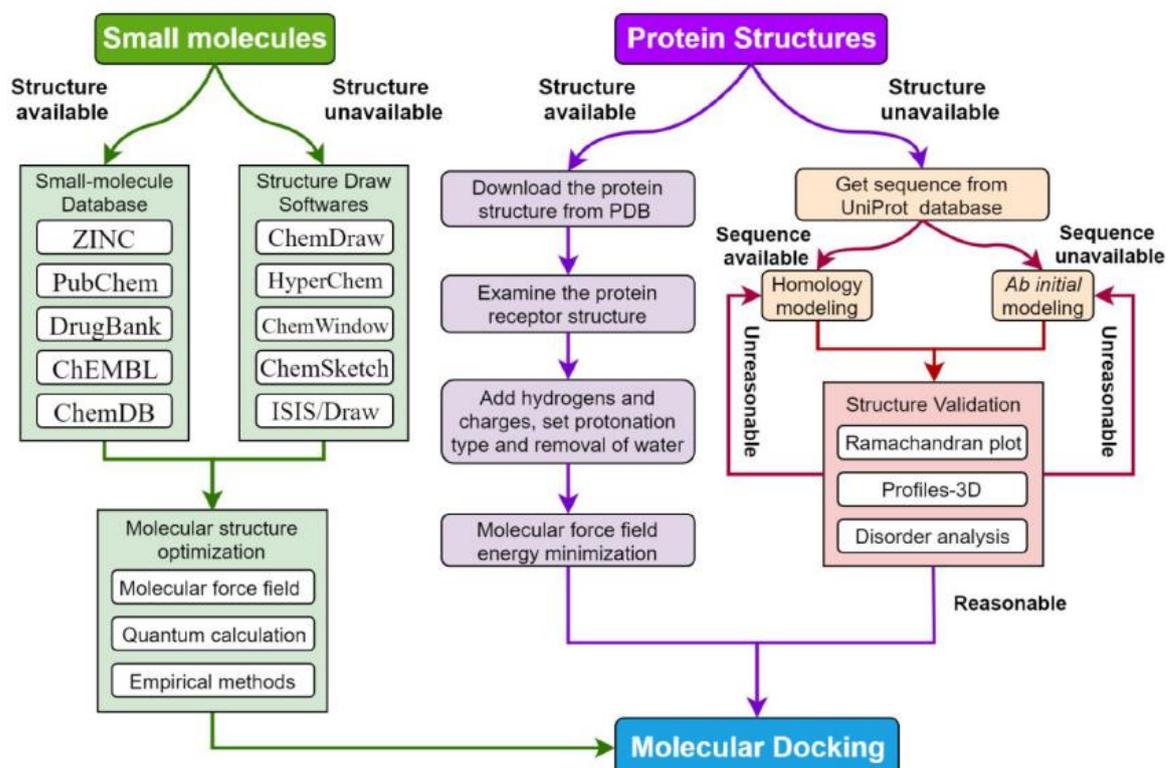
Esta função é aplicada quando Temperatura e Pressão são constantes.

Onde:

- a) ΔH representa a variação de entalpia do sistema;
- b) ΔS representa a variação de entropia do sistema;
- c) T é uma variável de temperatura constante.

Na Figura 4, de YU et al (2023) estão esquematizados todos os procedimentos para a realização do *docking*. Inicialmente as estruturas moleculares são obtidas, seja por meio de plataformas de desenho de moléculas ou bancos de dados de moléculas, como o DrugBank, por exemplo. Após a obtenção, é realizada a minimização de energia ou otimização da estrutura, utilizando-se um campo de força, como o *Merck molecular force field* (MMFF94) (HALGREN, 1996). Posteriormente, a estrutura proteica é obtida a partir de um banco de dados de proteínas ou por meio de modelagem, quando a estrutura não está disponível. São removidos solventes e ligantes, adicionam-se cargas e definem-se estados de protonação. Finalmente, depois de preparadas as estruturas, estas são submetidas à ancoragem propriamente dita.

Figura 4. Esquema de passo a passo para realização da ancoragem molecular. Em verde, seqüência de procedimentos para obtenção e preparo das moléculas e, em roxo, seqüência de procedimentos para obtenção e preparo das estruturas proteicas.



Fonte: YU et al, *J. Agric. Food Chem*, 2023.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Estudar a interação de micotoxinas com o nanoporo proteico unitário formado pela α -hemolisina de *Staphylococcus aureus*, por meio de ancoragem molecular.

3.2. Objetivos Específicos

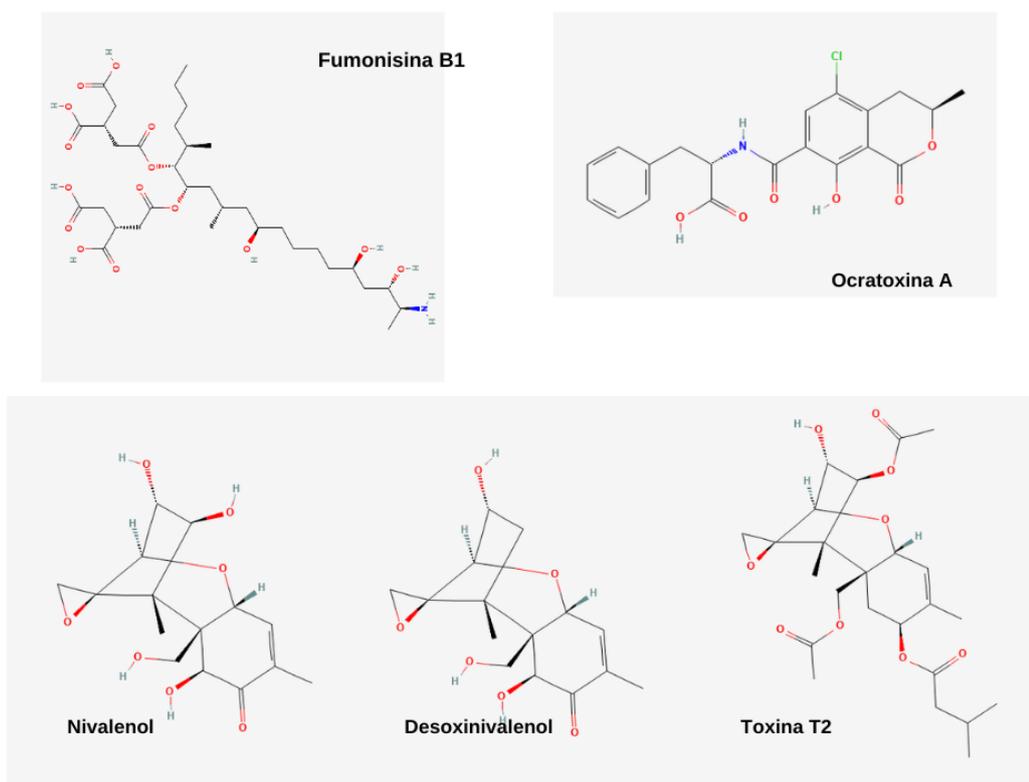
- Realizar a AM entre as MTXs e as Regiões anelar e troncular no NPA, em triplicata, no Software GOLD e DockThor;
- Determinar e comparar as Energias de Interação entre as MTXs e as duas regiões do NPA, a partir dos resultados obtidos pelo DockThor;
- Determinar e comparar as Energias de Interação entre as MTXs e as duas regiões do NPA, a partir dos resultados obtidos pelo GOLD;
- Determinar e comparar os modos de ligação e os perfis de interação das MTXs e do NPA, a partir dos resultados do DockThor e do GOLD.

4. METODOLOGIA

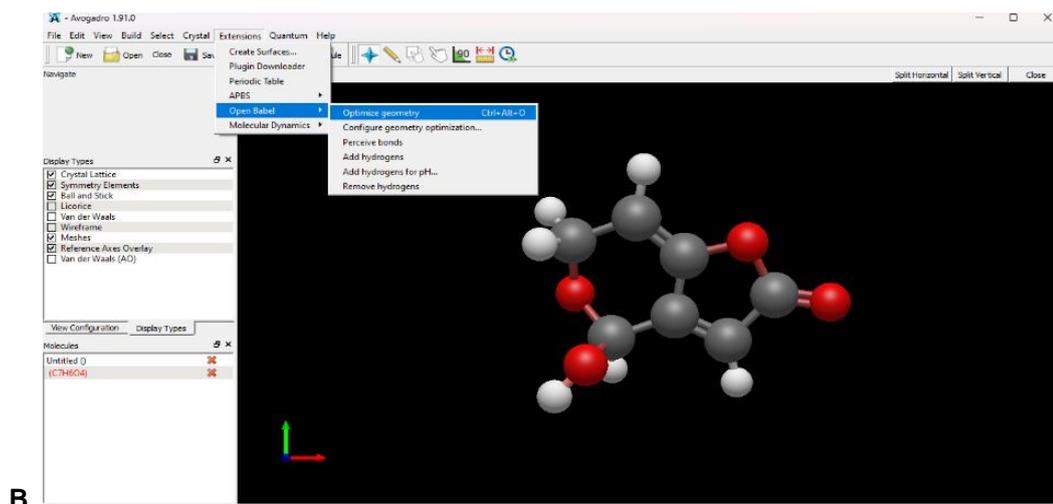
4.1. Obtenção e Preparação das Moléculas de Micotoxinas

A partir do banco de moléculas PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), foram obtidas as estruturas (Figura 5a) de Ocratoxina A (CID: 442530), Desoxinivalenol (CID: 40024), Nivalenol (CID: 5284433), Toxina T2 (CID: 5284461), em 3D. As Fumonisinias B1 (CID: 2733487), foram encontradas em 2D e posteriormente convertidas em formato 3D no software Avogadro v. 2.0. As moléculas foram otimizadas, ou seja, sofreram um processo de minimização de energia e otimização geométrica, com o software Avogadro v. 2.0 (Figura 5b).

Figura 5. A) Estruturas Moleculares das MTXs. B) Otimização no Avogadro 2.0.



A.



B.

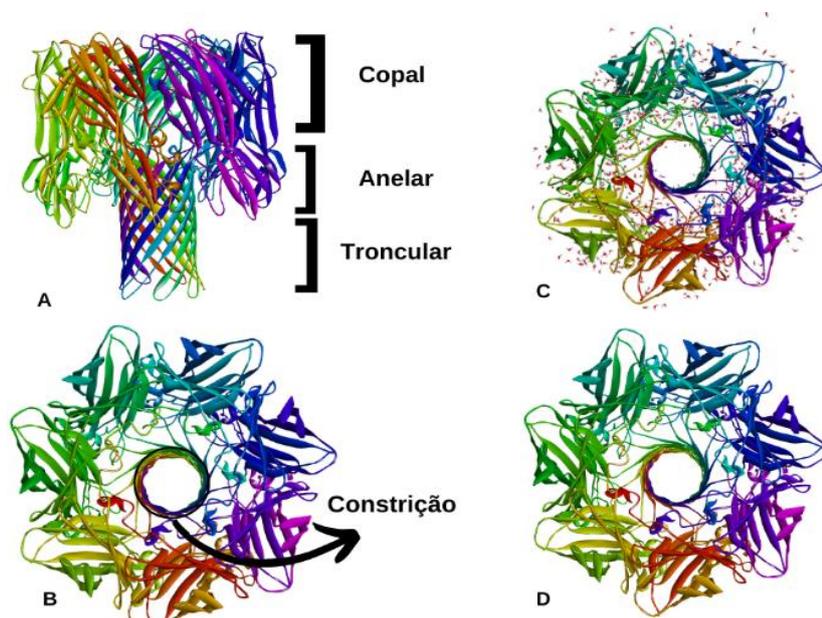
Fonte: A. PubChem. B. Elaborado pela autora.

4.2. Obtenção e Preparação do Nanoporo Proteico

A α -hemolisina é uma exotoxina de 33 kDa, capaz de se oligomerizar e formar poros de membrana. Na forma heptamérica, a estrutura é dividida em três porções (Figura 6a) uma porção copal, composta por fitas β -sanduíches presas entre si por travas de grupamento amino, uma porção anelar, que realiza a comunicação com a membrana celular e onde fica localizada a região de constrição (Figura 6b), e uma porção troncular formada por fitas β -barril (SONG et al., 1996).

Neste trabalho foi utilizada a estrutura cristalográfica heptamérica da α -hemolisina produzida por *Staphylococcus aureus* (Figura 6), a qual foi retirada do *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), sob código 7AHL, sendo realizada, também, a remoção do solvente no *Discovery Studio Visualizer* (VISUALIZER, 2005), como mostra a Figura 6 c e d. O pH da proteína foi ajustado para 7.4, semelhante às condições experimentais.

Figura 6. A) Estrutura cristalográfica da α -toxina e suas três porções: Copal, Anelar e Troncular. B) Região de Constrição (círculo preto indicado por seta). C) Proteína antes da remoção do solvente. D) Proteína após remoção do solvente.



Fonte: Imagem elaborada pela autora.

4.3. Cálculo das Coordenadas de Origem

As coordenadas de origem consistem em um conjunto de coordenadas (X, Y e Z) que servem para determinar a localização central de uma área de análise, geralmente do sítio de ação de uma proteína (FREITAS, 2022). É necessário, primeiro identificar regiões da proteína que são sensíveis a um ligante. Baseando-se nas porções anelar e troncular do NPA, foram calculadas as coordenadas atômicas dos resíduos de aminoácidos centrais de cada região, de maneira a delimitar o lúmen do NPA. Estas coordenadas estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Coordenadas de origem das porções troncular e anelar da α -toxina (Adaptado de FREITAS, 2022.)

Regiões da α -toxina	Resíduos de Aminoácidos	Coordenadas (X; Y; Z)
ANELAR	LYS 147	39,188; 32,857; 31,429
TRONCULAR	GLY 137	19,407; 32,851; 13,438

4.4. Realização da Ancoragem Molecular

4.4.1. Genetic Optimization for Ligand Docking (GOLD)

Genetic Optimization for Ligand Docking (GOLD) é uma ferramenta robusta, bastante utilizada na área de simulações computacionais, e consiste na utilização de algoritmo genético para realizar o *docking* ou “ancoragem” de ligantes em proteínas-alvo, baseando-se na orientação e posição da molécula em relação ao sítio ativo da proteína (JONES, et al, 1997). Este *software* permite o encaixe de ligantes flexíveis ao sítio ativo, além de também permitir a flexibilização da proteína, com excelente desempenho, e foi desenvolvido pelo *Cambridge Crystallographic Data Centre* (CCDC).

O algoritmo genético do GOLD utiliza uma abordagem evolutiva, na qual uma população inicial de conformações do ligante é gerada aleatoriamente, sendo otimizada subsequentemente, com base em sua conformação mais favorável energeticamente. Uma das características desta ferramenta de simulação, é apresentar uma variedade de funções de cálculo, sendo estas funções: GoldScore, ChemScore, ChemPLP, ASP (KORB et al, 2009).

A função GoldScore (equação 2) usa um método único para colocar o ligante no sítio de ligação baseado em pontos de ajuste; ele adiciona pontos de ajuste aos grupos de ligação de hidrogênio na proteína e no ligante e mapeia os pontos aceitadores do ligante nos pontos doadores da proteína e vice-versa.

$$GOLD\ Fitness = S_{hb_ext} + S_{vdw_ext} + S_{hb_int} + S_{vdw_int} \quad (2)$$

Onde:

- a) S_{hb_Ext} é a pontuação de ligação de hidrogênio ligante-proteína;
- b) S_{vdw_ext} é a pontuação de van der Waals do ligante-proteína;
- c) S_{hb_int} é a contribuição para o Fitness devido às ligações de hidrogênio intramoleculares no ligante. Este termo está desligado em todos os cálculos apresentados neste trabalho (este é o padrão GOLD, e geralmente dá os melhores resultados);
- d) S_{vdw_int} é a contribuição devido à tensão intramolecular no ligante.

Além disso, o GOLD gera pontos de encaixe hidrofóbico na cavidade da proteína nos quais os grupos ligantes CH são mapeados (VERDONK, et al.,

2003). GOLD utiliza um algoritmo genético (GA) no qual os seguintes parâmetros são modificados/otimizados:

- a) diedros de ligações rotativas de ligantes;
- b) geometrias de anéis de ligantes (invertendo os cantos dos anéis);
- c) diedros de grupos OH e grupos NH₃⁺;
- d) os mapeamentos dos pontos de encaixe (isto é, a posição do ligante no sítio de ligação).

4.4.2. DockThor

O DockThor é uma plataforma nacional, desenvolvida pelo Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), capaz de realizar simulações de interação de proteínas com diversos tipos de ligantes e calcular, de maneira eficiente, as rodadas de ancoragem molecular. Assim como o GOLD, esta plataforma utiliza um algoritmo genético não-geracional, denominado “de estado estacionário”, ou seja, somente as conformações com aptidão irão sofrer mutação e reprodução cruzada para gerar a próxima população (MAGALHÃES et al, 2004).

A função de pontuação utilizada pelo DockThor, DockTscore (equação 3) está representada a seguir:

$$\Delta G_{binding} = C_0 + C_1 \Delta G_{vdW} + C_2 \Delta G_{hbond} + C_3 \Delta G_{entropy} \quad (3)$$

Onde:

- a) c_i são os coeficientes de ponderação dos respectivos termos ΔG_i ;
- b) ΔG_{vdW} é um potencial de van der Waals;
- c) ΔG_{hbond} é um termo específico que representa ligações de hidrogênio;
- d) $\Delta G_{entropy}$ está relacionado à perda entrópica do ligante após a ligação.

4.5. Análise dos Resultados

4.5.1. Representação das interações entre as MTXs e o NP

Para analisar dos resultados foi utilizado o software *Discovery Studio Visualizer*, no qual serão geradas as representações gráficas em 3D dos

complexos receptor-ligante das MTXs e do NPA, bem como o diagrama em 2D das interações intermoleculares (VISUALIZER, 2005).

4.5.2. Estudo Estatístico

As simulações foram realizadas em triplicata e calculada a Média Aritmética e Desvio Padrão das pontuações de cada MTXs. As médias das pontuações foram comparadas utilizando-se Teste Tukey e foi realizada Análise de Variância (ANOVA), sendo utilizado um $p= 0.05$, para validação dos resultados.

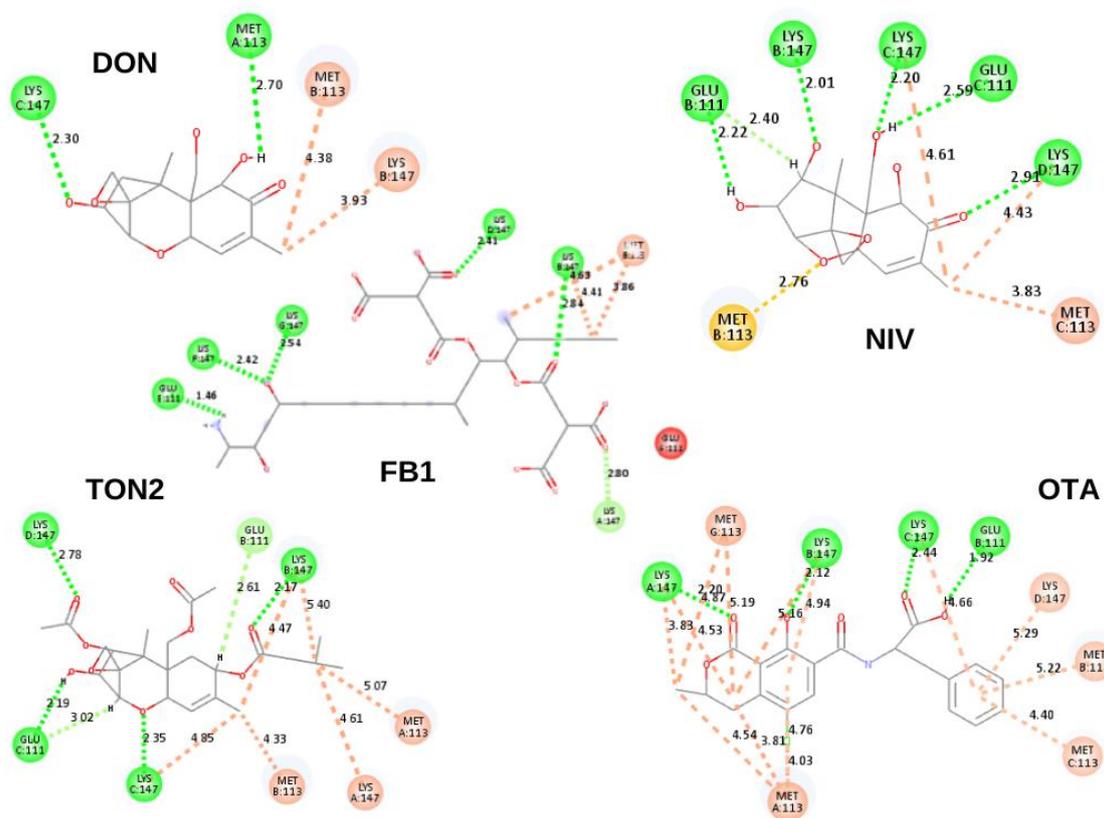
5. RESULTADOS

5.1. Resultados Obtidos Pelo GOLD

5.1.1. Interação das MTXs com a Região de Construção do NP

Na Figura 7 estão esquematizados os perfis de interação das MTXs com a região de estreitamento da porção anelar do NP. DON apresentou 2 ligações convencionais de hidrogênio, sendo 1 com LYS147 e 1 com MET113, e 2 interações alquila, sendo 1 com LYS 147 e 1 com MET113. FB1 apresentou 1 ligação carbono-hidrogênio com LYS147, 3 interações alquila, das quais 2 foram com MET113 e 1 com LYS147, e 5 ligações convencionais de hidrogênio, das quais 4 foram com LYS147 e 1 com GLU111. NIV apresentou 5 ligações de hidrogênio convencionais, sendo 3 com LYS147 e 2 com GLU111, 3 interações alquila, sendo 2 com LYS147 e 1 com MET113, 1 ligação carbono-hidrogênio com GLU111 e 1 interação enxofre-X com MET113. TON2 apresentou 4 ligações de hidrogênio convencionais, das quais 3 foram com LYS147 e 1 com GLU111, 2 ligações carbono-hidrogênio com GLU111, e 6 interações alquila, sendo 2 com MET113 e 4 com LYS147. OTA apresentou 6 interações π -alquila, das quais 3 foram com LYS147 e 3 com MET113, 8 interações alquila, sendo 5 com MET113 e 3 com LYS147, e 4 ligações convencionais de hidrogênio, sendo 3 com LYS147 e 1 com GLU111.

Figura 7. Perfis de interação de OTA, FB1, NIV, DON e TON2 com a região de estreitamento do NP. Dentro dos círculos, os resíduos de aminoácidos com os quais ocorrem as interações também apresentam letras, indicando a qual cadeia do NP pertencem. Cada cor de pontilhado representa um tipo de interação: alquila (em rosa), π -alquila (em rosa-claro), ligação de hidrogênio convencional (em verde), ligação carbono-hidrogênio (em verde-claro), enxofre-x (em amarelo). Os números ao lado dos tracejados indicam as distâncias das interações.



Elaborada pela autora

Na Tabela 4 constam os valores de média aritmética e desvio padrão ($\bar{X} \pm SD$) dos Fitness, S_{Hbond} das MTXs com a região de construção do NP. Novamente, FB1 apresentou maior pontuação, seguida de OTA, TON2, NIV e DON. O aumento do desvio padrão pode indicar sua instabilidade ao interagir com esta região. Como se observa na Figura 7, TON2 e NIV apresentaram mais interações envolvendo hidrogênio, o que resultou no maior de S_{Hbond} para ambos.

Tabela 4. Médias Aritméticas e Desvio Padrão dos valores de Fitness e S_{Hbond} de Fumonisina B1, Ocratoxina A, Desoxinivalenol, Toxina T2 e Nivalenol com a região de estreitamento do NP (ANOVA. $p=0.05$).

	Fitness	S_{Hbond}
FB1	86.62 ± 10.65	14.47 ± 9.6
OTA	56.37 ± 1.61	11.4 ± 1.12
DON	36.12 ± 1.14	14.81 ± 5.3
TON2	54.57 ± 0.20	16.03 ± 0.34
NIV	39.37 ± 0.6	17.32 ± 0.13

Na Figura 8 estão representados os resultados do Teste Tukey ($p < 0.05$), no qual cada média de *Fitness* das MTXs foi comparada individualmente. É

possível observar que há uma diferença estatisticamente significativa entre as médias, exceto quando se comparou NIV-DON, e OTA-TON2. A diferença foi ainda maior quando a comparação foi NIV-FB1 e DON-FB1.

Figura 8. Comparação entre as médias de *fitness* de cada MTXs na Porção Anelar. Teste Tukey ($p < 0.05$)

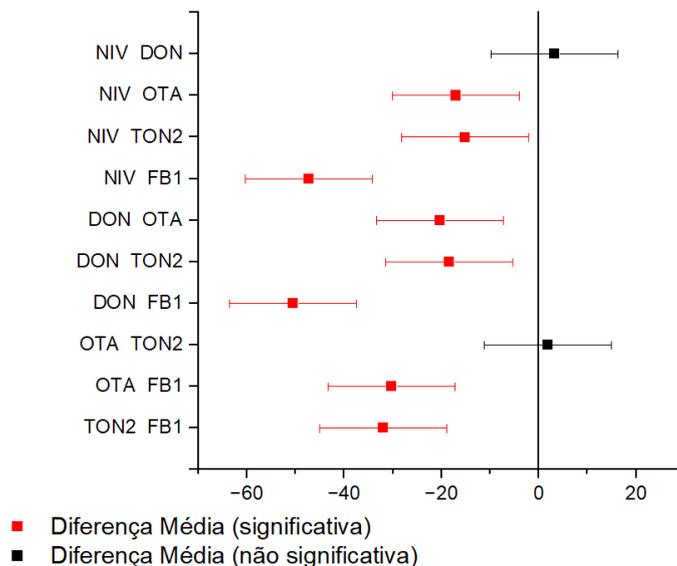
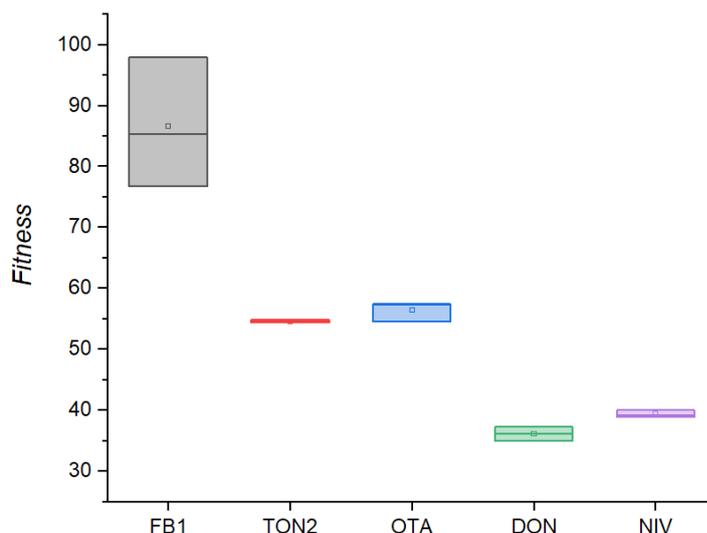


Imagem elaborada pela autora.

Uma análise ANOVA foi realizada, com o objetivo de comparar as médias de Fitness das MTXs. Os resultados estão dispostos no gráfico da Figura 9, no qual as médias diferem significativamente entre si. Embora observe-se que as médias de TON2 e OTA, e DON e NIV sejam respectivamente próximas, ao compará-las entre si e com FB1, elas diferem estatisticamente em grau significativo.

Figura 9. Médias dos *Fitness* de Fumonisina B₁ (FB1), Ocratoxina A (OTA), Nivalenol (NIV), Desoxinivalenol (DON) e Toxina T-2 (TON2) na constrição do NP. As médias são estatisticamente diferentes. (ANOVA, $p = 0.05$).

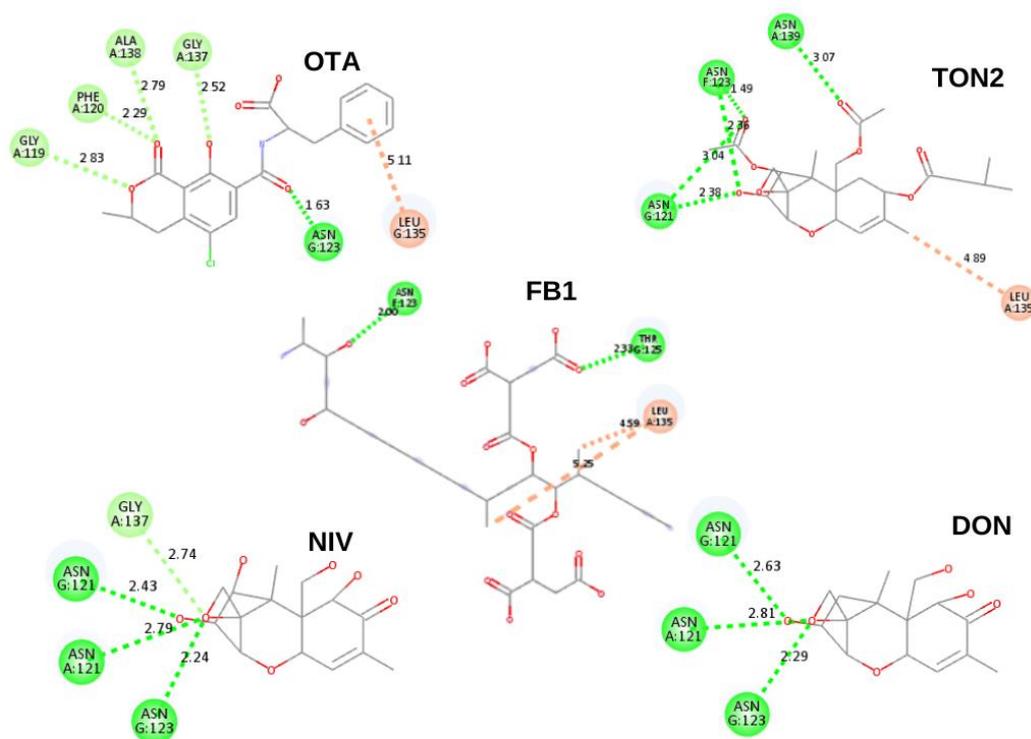


Elaborada pela autora.

5.1.2. Interação das Micotoxinas com a Porção Troncular

Na Figura 10 estão apresentados os perfis de interação de cada MTX com a porção troncular do NP. OTA apresentou 4 ligações carbono-hidrogênio, sendo 1 com GLY119, 1 com GLY137, 1 ALA138 e 1 com PHE120, 1 ligação de hidrogênio convencional com ASN123, e 1 interação alquila com LEU135. TON2 apresentou 5 ligações convencionais de hidrogênio, das quais 2 foram com ASN123, 2 com ASN121 e 1 com ASN139, e 1 interação alquila com LEU135. FB1 apresentou 2 ligações convencionais de hidrogênio, sendo 1 com ASN123 e 1 com THR125, além de 1 interação alquil com LEU135. NIV apresentou 1 ligação carbono-hidrogênio com GLY137, e 3 ligações convencionais de hidrogênio, sendo 2 com ASN121 e 1 com ASN123. DON apresentou apenas 3 ligações de hidrogênio convencionais, das quais 2 são com ASN121 e 1 com ASN123.

Figura 10. Perfis de interação de OTA, FB1, NIV, DON e TON2 com a porção troncular do NP. Dentro dos círculos, os resíduos de aminoácidos com os quais ocorrem as interações também apresentam letras, indicando a qual cadeia do NP pertencem. Cada cor de pontilhado representa um tipo de interação: ligação de hidrogênio convencional (em verde), ligação carbono-hidrogênio (em verde-claro), alquila (em rosa). Os números ao lado dos tracejados indicam as distâncias das interações.



Elaborada pela autora.

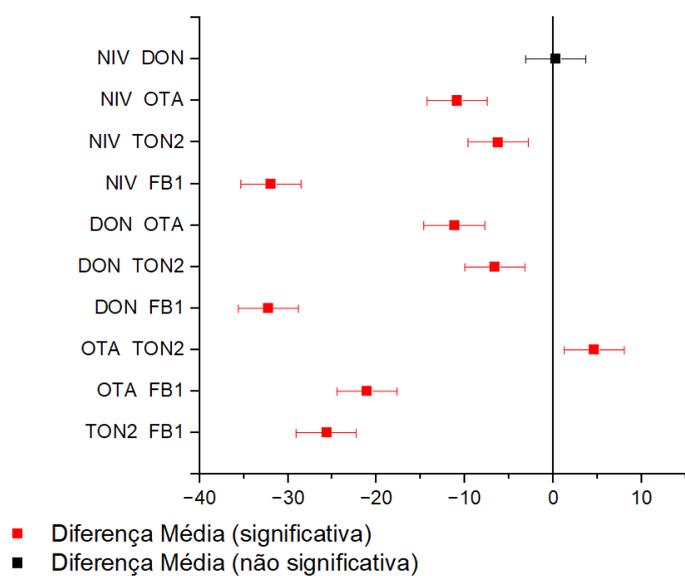
Na Tabela 5 constam os valores de média aritmética e desvio padrão ($\bar{X} \pm SD$) dos Fitness, SHbond das conformações em primeira colocação no ranking gerado pelo próprio software. Para gerar o ranking, o GOLD considera a conformação com maior Fitness. Como é possível observar, FB1 apresentou maior pontuação, seguida de OTA, TON2, NIV e DON.

Tabela 5. Médias Aritméticas e Desvio Padrão ($\bar{X} \pm SD$) dos valores de Fitness e S_{Hbond} de Fumonisina B1, Ocratoxina A, Desoxinivalenol, Toxina T2 e Nivalenol com a Porção Troncular do NP (ANOVA. $p=0.05$).

	Fitness	S_{Hbond}
FB1	61.69 \pm 2.46	1.54 \pm 1.26
OTA	40.63 \pm 0.51	1.12 \pm 0.25
DON	29.44 \pm 0.21	1.63 \pm 0.2
TON2	36.03 \pm 1.28	0.96 \pm 1.13
NIV	29.76 \pm 0.2	1.59 \pm 0.1

Na Figura 11 estão representadas as médias, comparadas por Teste Tukey ($p < 0.05$). Novamente observa-se uma diferença estatisticamente significativa, exceto para NIV-DON.

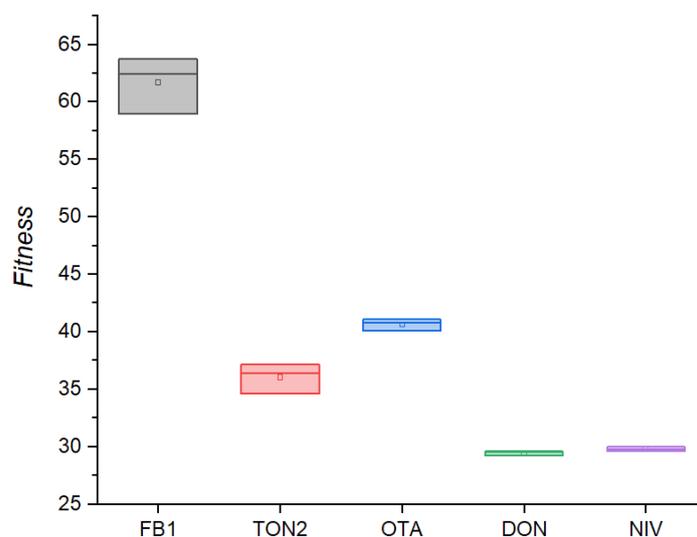
Figura 11. Comparação entre as médias de *fitness* de cada MTXs na Porção Troncular. Teste Tukey ($p < 0.05$).



Elaborada pela autora.

No gráfico da Figura 12 pode-se observar que as médias foram significativamente diferentes quando se comparou DON, TON2, NIV e OTA com FB1, que continua apresentando maior Fitness.

Figura 12. Médias dos *Fitness* de Fumonissina B₁ (FB1), Ocratoxina A (OTA), Nivalenol (NIV), Desoxinivalenol (DON) e Toxina T-2 (TON2) na região troncular. As médias são estatisticamente diferentes. (ANOVA, $p=0.05$).



Fonte: Elaborada pela própria autora.

5.2. Resultados Obtidos pelo DockThor

5.2.1. Interação das MTXs com a Porção Troncular do NP

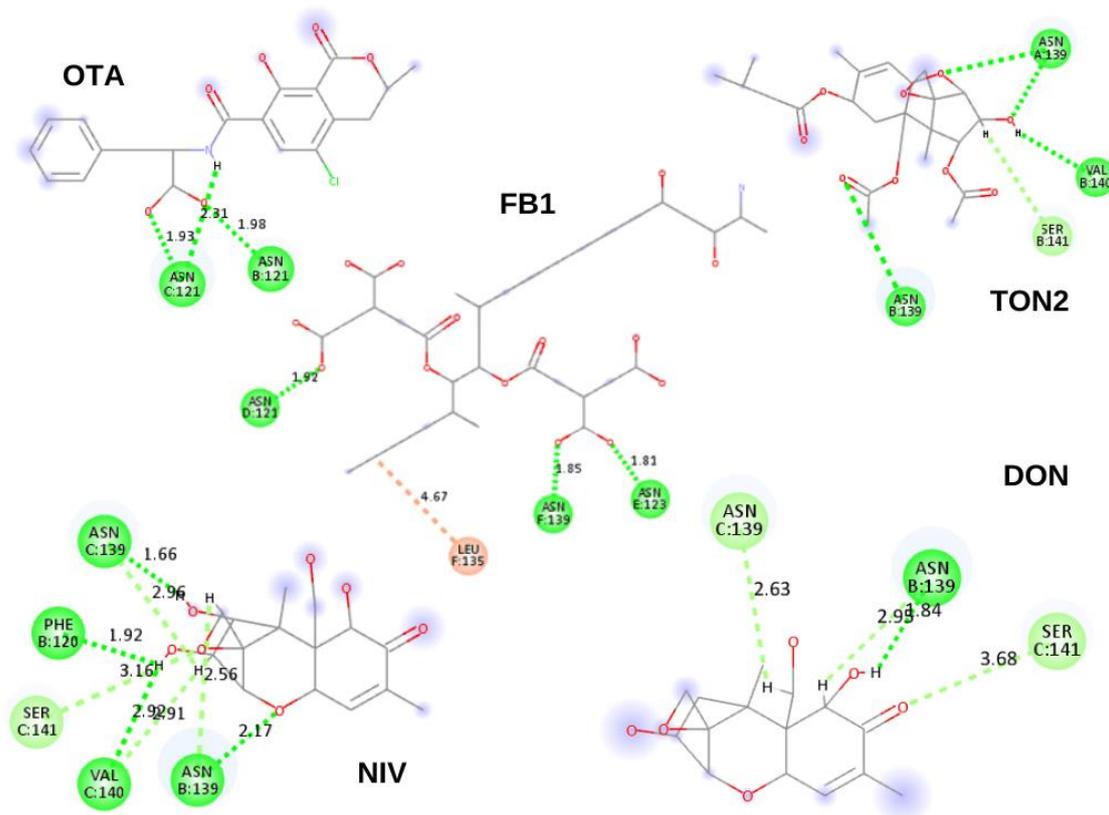
Na Tabela 6 constam os valores de Afinidade e Energia Total das MTXs com a porção troncular do NP. OTA manteve-se com o maior valor de Energia Total, seguida por NIV, FB1, DON e TON2, a qual apresentou menor valor de Afinidade, seguida por FB1, NIV, OTA e DON. Não foi possível realizar teste estatístico, pois os valores não apresentaram variação de desvio padrão.

Tabela 6. Valores de Energias para a região troncular.

	Afinidade	Energia Total
FB1	-7.434	31.961
OTA	-7.129	51.634
DON	-7.005	31.910
TON2	-7.651	26.245
NIV	-7.266	35.988

Na Figura 13 estão apresentadas as interações entre cada MTXs e a porção troncular do NP. OTA apresentou apenas 3 ligações de hidrogênio convencionais com ASN121. TON2 apresentou 4 ligações convencionais de hidrogênio, sendo 3 com ASN139 e 1 com VAL140, além de uma ligação carbono-hidrogênio com SER141. FB1 apresentou 3 ligações convencionais de hidrogênio, sendo 1 com ASN121, 1 com ASN123 e 1 com ASN139, além de 1 interação π -alquila com LEU135. NIV, que obteve maior número de interações, apresentou 4 ligações de hidrogênio, sendo 2 com ASN139, 1 com VAL140 e 1 PHE120, e 4 ligações carbono-hidrogênio, sendo 2 com ASN139, 1 com SER141 e 1 com VAL140. DON apresentou 3 ligações carbono-hidrogênio, sendo 2 com ASN139 e 1 com SER141, além de 1 ligação de hidrogênio com ASN139.

Figura 13. Perfis de interação de OTA, FB1, NIV, DON e TON2 com a porção troncular do NP. Dentro dos círculos, os resíduos de aminoácidos com os quais ocorrem as interações também apresentam letras, indicando a qual cadeia do NP pertencem. Cada cor de pontilhado representa um tipo de interação: alquila (em rosa), ligação de hidrogênio convencional (em verde), ligação carbono-hidrogênio (em verde-claro). Os números ao lado dos tracejados indicam as distâncias das interações.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.2. Interação das MTXs com a Região de Construção do NP

Na Tabela 7 constam os valores de média aritmética e desvio padrão ($\bar{X} \pm SD$) dos Afinitade e Energia Total das MTXs com a região de construção do NP. No DockThor, as conformações são ranqueadas de acordo com a Afinitade mais negativa, ou seja, quanto mais negativo, maior a Afinitade. FB1 apresentou maior valor de Afinitade e menor Energia Total, seguida de OTA, TON2, NIV e DON. Como pode-se observar, OTA tem maior valor de Energia Total.

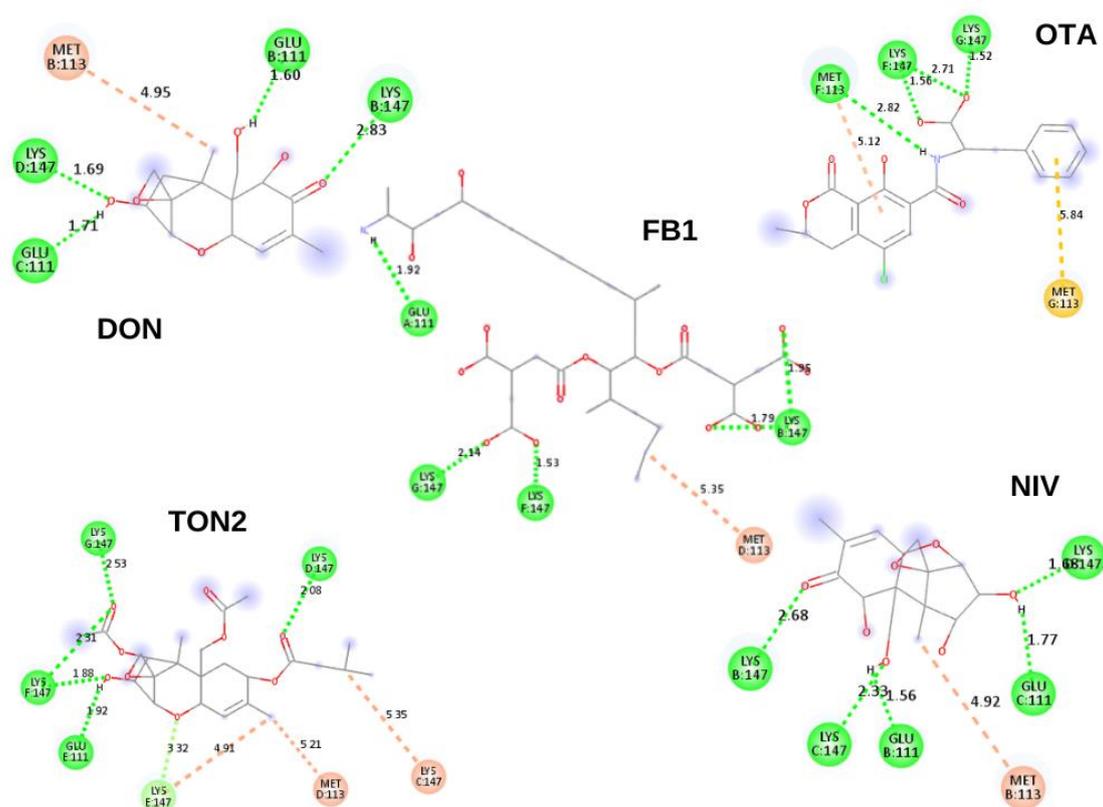
Tabela 7. Valores de Energias para a região anelar.

	Afinitade	Energia Total
FB1	-6.75 \pm 0.47	14.51 \pm 2.75
OTA	-6.54 \pm 0.49	42.74 \pm 1.09
DON	-6.36 \pm 0.01	24.12 \pm 0.18
TON2	-6.51 \pm 0.11	20.81 \pm 0.27
NIV	-6.37 \pm 0.01	28.80 \pm 0.42

Na Figura 14 estão esquematizados os perfis de interação de cada MTX com a região de construção, na porção anelar do NP. DON apresentou 4 ligações

convencionais de hidrogênio, sendo 2 com GLU111 e 2 com LYS147, e 1 interação alquila com MET113. OTA apresentou 3 ligações convencionais de hidrogênio, sendo 2 com LYS147 e 1 com MET113, 1 interação π -alquila com MET113, e 1 interação π -enxofre com MET113. FB1 apresentou 5 ligações convencionais de hidrogênio, das quais 4 foram com LYS147 e 1 com GLU111, além de 1 interação π -alquila com MET113. NIV também apresentou 5 ligações de hidrogênio convencionais, sendo 3 com LYS 147 e 2 com GLU111, além de 1 interação π -alquila com MET113. TON2 apresentou também 5 ligações de hidrogênio convencionais, das quais 4 ocorreram com LYS147 e 1 com GLU111, além de 1 ligação carbono-hidrogênio com LYS147, e 3 interações π -alquila, sendo 2 com LYS147 e 1 com MET113

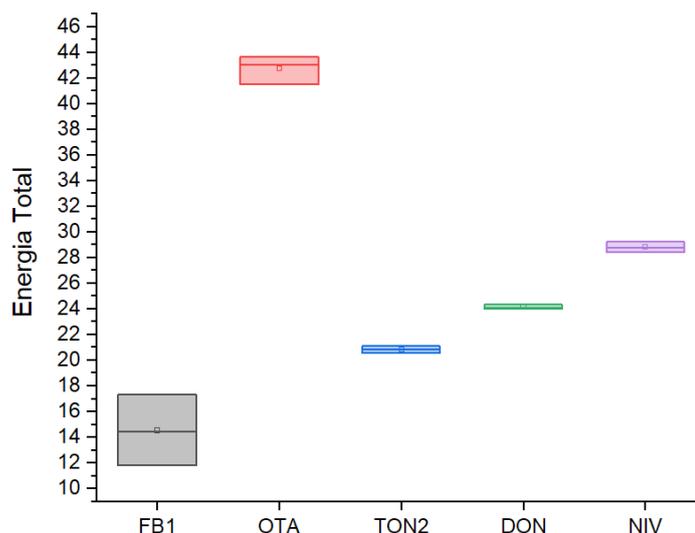
Figura 14. Perfis de interação de OTA, FB1, NIV, DON e TON2 com a região de estreitamento do NP. Dentro dos círculos, os resíduos de aminoácidos com os quais ocorrem as interações também apresentam letras, indicando a qual cadeia do NP pertencem. Cada cor de pontilhado representa um tipo de interação: alquila (em rosa), π -alquila (em rosa-claro), ligação de hidrogênio convencional (em verde), ligação carbono-hidrogênio (em verde-claro), π -enxofre (em amarelo). Os números ao lado dos tracejados indicam as distâncias das interações.



Elaborado pela autora.

A Figura 15 apresenta um gráfico, onde pode-se observar a comparação entre as médias de Energia Total das MTXs, por meio de ANOVA. Aqui fica clara a diferença entre as médias de OTA, FB1 e as demais MTXs. As médias foram significativamente diferentes, em relação a OTA.

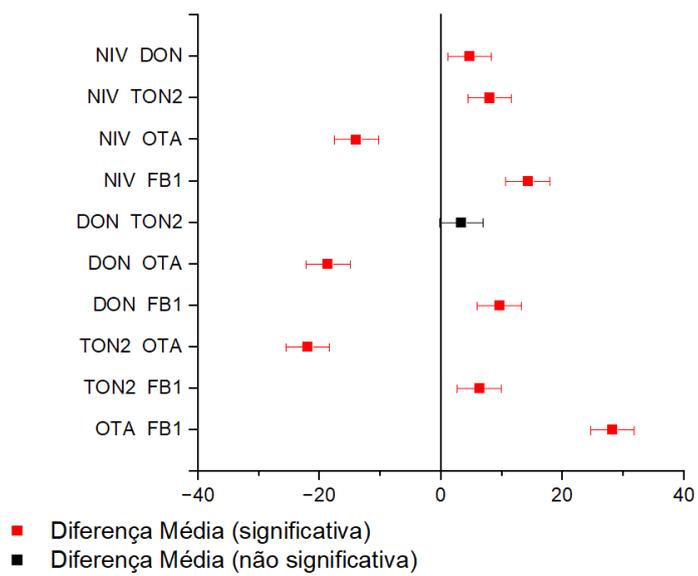
Figura 15. Médias das Energias Totais de Fumonisina B₁ (FB1), Ocratoxina A (OTA), Nivalenol (NIV), Desoxinivalenol (DON) e Toxina T-2 (TON2) na região troncular. As médias são estatisticamente diferentes. (ANOVA, $p= 0.05$).



Elaborada pela autora

Na Figura 16 está disposta a comparação entre as médias de Energia Total de cada MTXs. Com exceção de DON-TON2, as médias diferem a um nível significativo estatisticamente.

Figura 16. Comparação entre as médias de Energia Total de cada MTXs na Porção Troncular. Teste Tukey ($p < 0.05$).



Elaborada pela autora.

6. DISCUSSÃO

Os resíduos de aminoácidos específicos das porções troncular e anelar já foram bem descritos na literatura. SONG et al (1996) explicou que os resíduos que compõem a constrição do NP de α -hemolisina são GLU111, MET113 e LYS147, os quais foram observados nas interações de todas as MTXs trabalhadas aqui. Ele ainda acrescenta que o domínio troncular é formado por resíduos que vão desde LYS110 até TYR148 e que as β -fitas que dão forma à região β -barril começam com LYS110 e vão até TYR118. Aqui observaram-se ASN121, ASN123, ASN139, SER141, PHE120 e VAL140, além de LEU135, entre os resíduos que aparecem interagindo com as MTXs na porção troncular.

Os resultados encontrados para a região de constrição corroboram com o que foi relatado por TEIXEIRA et al (2021), que avaliou a inibição da atividade da α -hemolisina com uso de Tamoxifen, e MELO et al (2016), que estudou complexos isatina-Schiff cobre (II) com o objetivo de inibição da atividade da α -hemolisina. Em ambos os trabalhos foram relatadas interações com LYS147, GLU111 e MET113, por meio de ancoragem molecular.

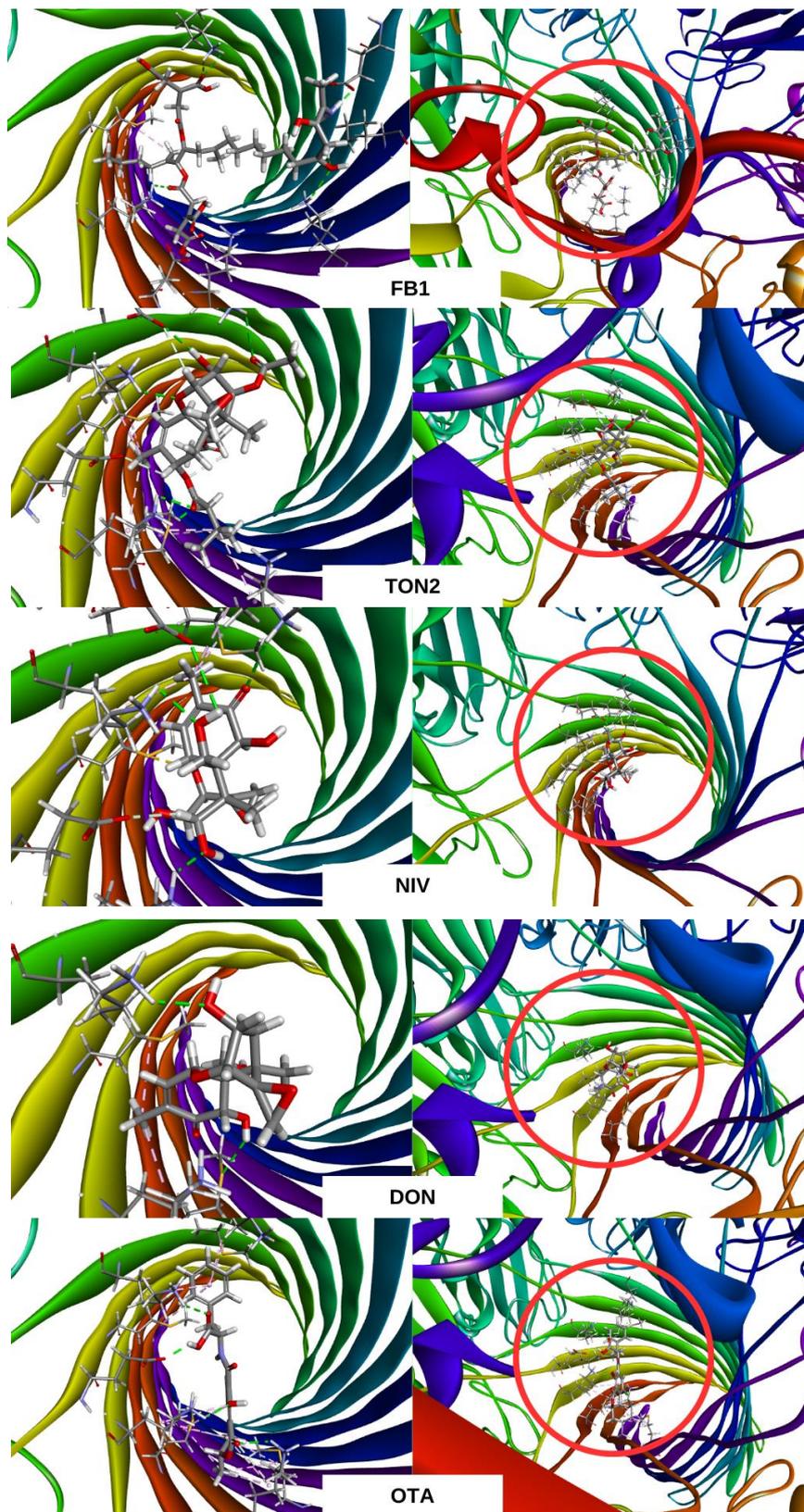
O trabalho de SILVA JÚNIOR (2019) calculou o mapa de potencial eletrostático das porções do NP. A avaliação computacional das interações, em conjunto com os dados das forças eletrostáticas, pode auxiliar na elucidação dos processos de interação analito-NP. SILVA et al (2023) discute melhor o padrão de bloqueios de OTA e FB1, na plataforma experimental com o NP e, de acordo com os resultados obtidos aqui, por meio da ancoragem, as prováveis regiões de interação são as que foram descritas neste trabalho, tendo em vista que as moléculas-analito são adicionadas ao lado TRANS da câmara experimental, onde fica posicionada a porção troncular do NP.

A despeito do que se observou nos resultados de FB1 com o NP e seu alto valor de desvio padrão, DELLAFIORA et al (2018) destacou que a presença dos TCAs na estrutura de FB1 podem causar interferências estéricas, como foi observado em seu trabalho, que tinha como objetivo avaliar a interação desta micotoxina com proteínas de síntese lipídica, como o transportador de ceramida (CERT). Neste trabalho, o grupo explicou que os TCAs podem causar interferências hidrofóbicas, resultando em perturbações no bolsão proteico.

Estas afirmações podem justificar a instabilidade na interação da FB1 frente ao NP.

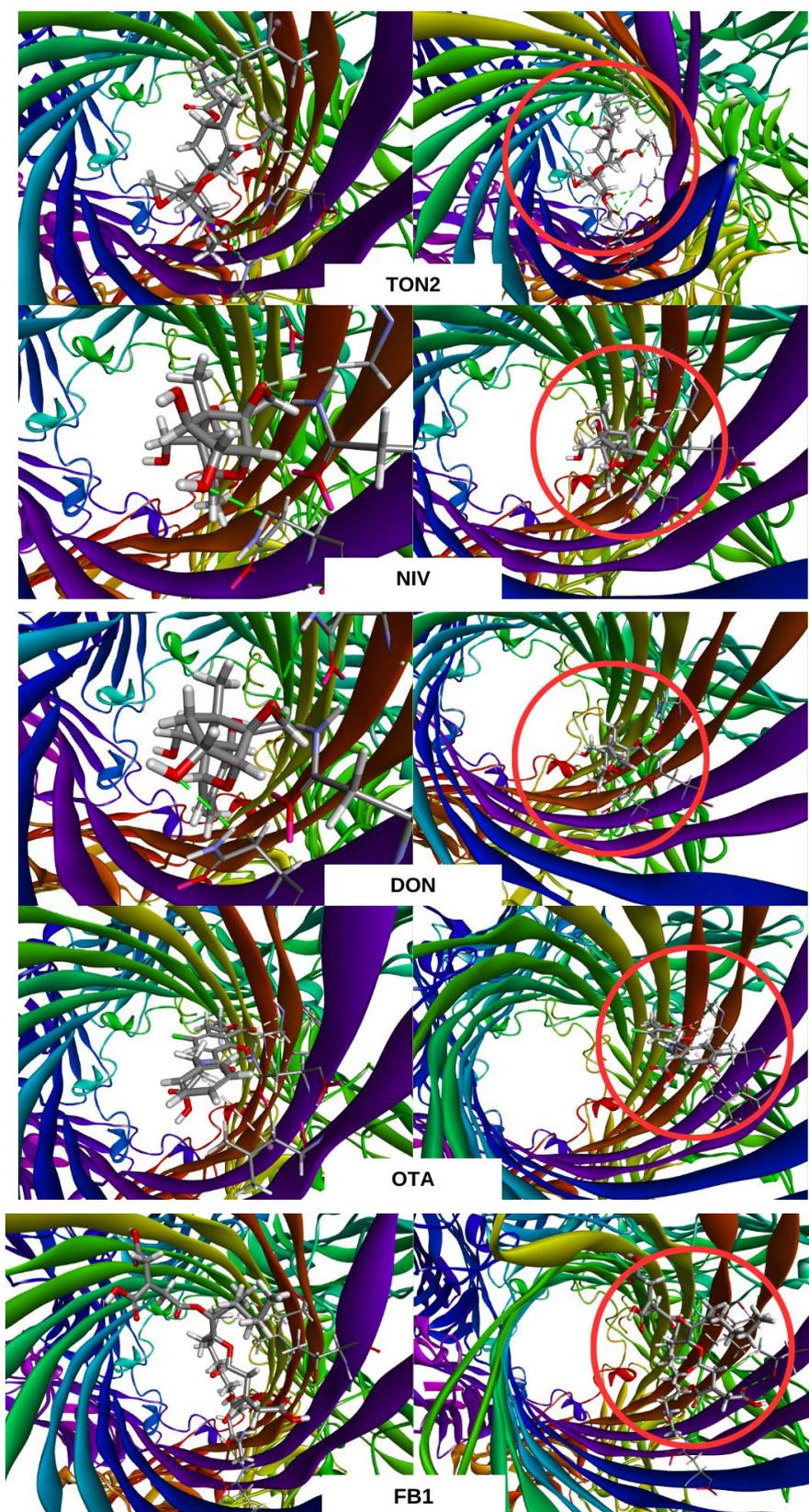
Como se observa nas Figuras 17 e 18, todas as poses das MTXs ficaram localizadas exatamente nas regiões de estreitamento e porção troncular, respectivamente. A FB1 ocupou o centro do NP, enquanto as demais ficaram posicionadas mais à margem do lúmen. O mesmo se observa nas Figuras 19 e 20, geradas a partir dos resultados do DockThor.

Figura 17. Representação Gráfica em 3D dos complexos MTXs-NP, na região de estreitamento, geradas a partir dos resultados do GOLD.



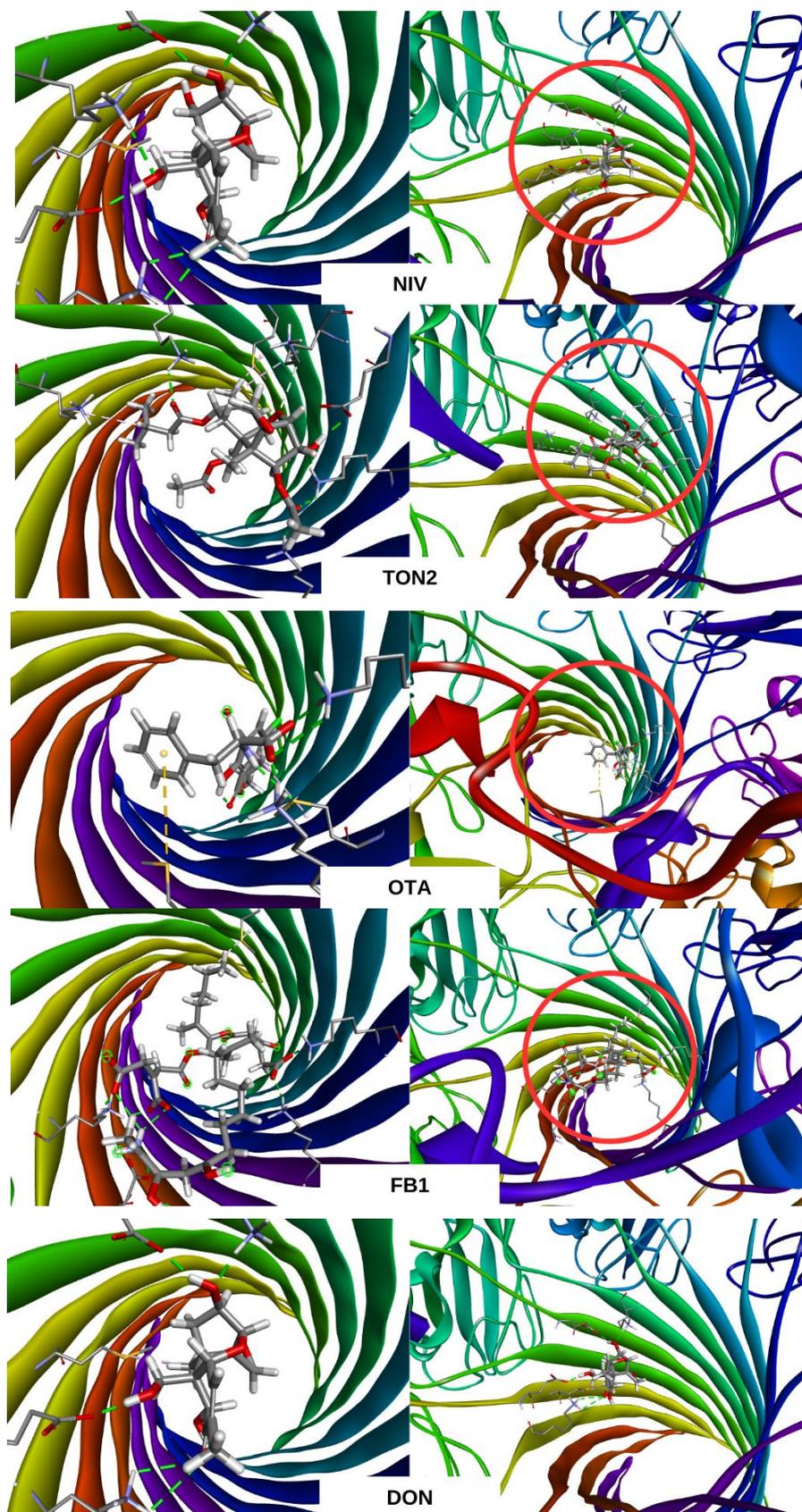
Fonte: elaborada pela autora.

Figura 18. Representação Gráfica em 3D dos complexos MTXs-NP, na região troncular, geradas a partir dos resultados do GOLD.



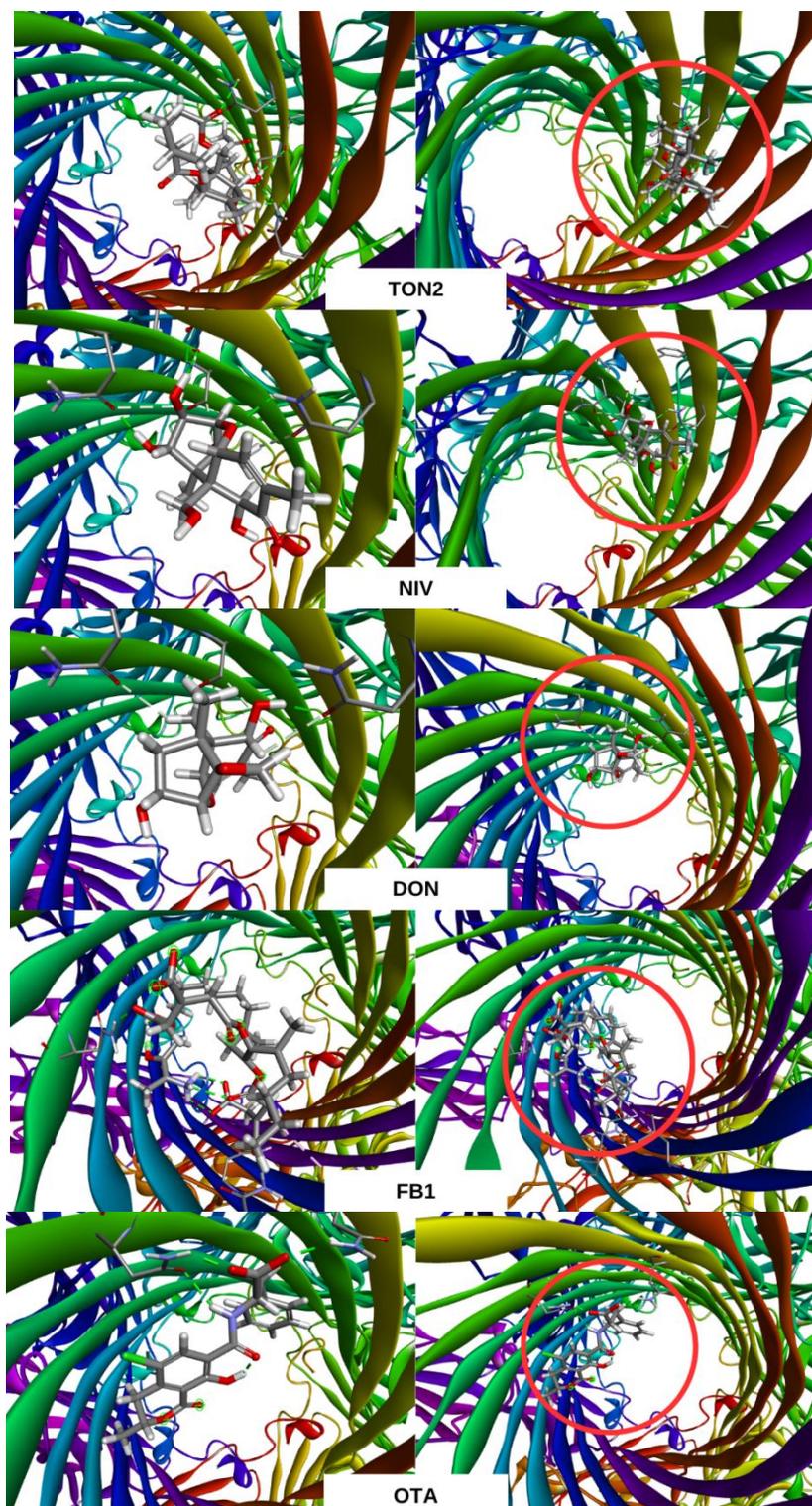
Fonte: elaborada pela autora.

Figura 19. Representação Gráfica em 3D dos complexos MTXs-NP, na região de estreitamento, geradas pelo DockThor.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 20. Representação Gráfica em 3D dos complexos MTXs-NP, na região troncular, geradas pelo DockThor.



Fonte: elaborada pela autora.

7. CONCLUSÃO

Como discutido anteriormente, FB1, OTA, NIV, DON e TON2 interagem com resíduos de aminoácidos específicos da região de constrição, bem como os resíduos da região troncular, que são regiões do NP sensíveis a ligantes. Os perfis de interação de cada MTX, bem como as diferenças entre as médias de Afinidade ou Fitness, podem servir para elucidar como o NP é capaz de diferenciar cada molécula-analito. Estudos experimentais com os TCTs são necessários para complementar a discussão sobre seus perfis interação e padrões de bloqueio do NP.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHIKARI, Manish et al. T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies. **Oncotarget**, v. 8, n. 20, p. 33933, 2017.
- AGARWAL, Prerna et al. Amelioration of ochratoxin-A induced cytotoxicity by prophylactic treatment of N-Acetyl-L-Tryptophan in human embryonic kidney cells. **Toxicology**, v. 429, p.152324, 2020.
- AGUIAR, Juliana P. et al. Stochastic biosensing by a single protein nanopore in the development of analytical tools. *Química Nova*, v. 38, p. 817-827, 2015.
- ALSHANNAQ, Ahmad; YU, Jae-Hyuk. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 6, p. 632, 2017.
- ANVISA, Brasil. 2017. Resolução RDC nº 138, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União nº29, 09/02/2017.
- CASTEGNARO, Marcel et al. Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers. **Molecular nutrition & food research**, v. 50, n. 6, p. 519-529, 2006.
- CHEN, Jia et al. Fumonisin B1: Mechanisms of toxicity and biological detoxification progress in animals. **Food and chemical toxicology**, v. 149, p. 111977, 2021.
- DELLAFIORA, Luca; GALAVERNA, Gianni; DALL'ASTA, Chiara. Mechanisms of fumonisin B1 toxicity: a computational perspective beyond the ceramide synthases inhibition. **Chemical research in toxicology**, v. 31, n. 11, p. 1203-1212, 2018.
- DEY, Debasish Kumar et al. Mycotoxins in food and feed: Toxicity, preventive challenges, and advanced detection techniques for associated diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 27, p. 8489-8510, 2023.
- DMITRENKO, Olga et al. In Silico Genome-Scale Analysis of Molecular Mechanisms Contributing to the Development of a Persistent Infection with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST239. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 16086, 2022.
- EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM) et al. Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and

its acetylated and modified forms in food and feed. **EFSA journal**, v. 15, n. 9, p. e04718, 2017.

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

EL-SAYED, Raghda A. et al. An overview on the major mycotoxins in food products: Characteristics, toxicity, and analysis. **Journal of Future Foods**, v. 2, n. 2, p. 91-102, 2022.

EMBRAPA. GUARALDO, M. C., REYNOL, F. Ciência e tecnologia tornaram o Brasil um dos maiores produtores mundiais de alimentos, 2022. Disponível em <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/75085849/ciencia-e-tecnologia-tornaram-o-brasil-um-dos-maiores-produtores-mundiais-de-alimentos>>. Acesso em: 9 mar. 2024.

FREITAS, Débora. **Docking molecular de derivados de rodanina e tiazolidina frente à alfa-hemolisina de Staphylococcus aureus**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

FU, Yi; ZHAO, Ji; CHEN, Zhiguo. Insights into the molecular mechanisms of protein-ligand interactions by molecular docking and molecular dynamics simulation: A case of oligopeptide binding protein. **Computational and mathematical methods in medicine**, v. 2018, 2018.

GUEDES, I. A. et al., "DockTScore: New Physics-Based and Target-Specific Empirical Scoring Functions (article under submission phase)," 2020.

GUIDANCE, FDA Mycotoxin Regulatory. **A guide for grain elevators, feed manufacturers, grain processors and exporters**. 2011.

HALGREN, Thomas A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of computational chemistry**, v. 17, n. 5-6, p. 490-519, 1996.

HAQUE, Md Atiqul et al. Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review. **Microbial pathogenesis**, v. 142, p. 104095, 2020.

HOERR, Frederic J. Mycotoxicoses. **Diseases of poultry**, p. 1330-1348, 2020.

JANIK, Edyta et al. Molecular aspects of mycotoxins—A serious problem for human health. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 21, p. 8187, 2020.

- JONES, Gareth et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of molecular biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.
- JÚNIOR, Janilson JS et al. Alpha-hemolysin nanopore allows discrimination of the microcystins variants. **RSC advances**, v. 9, n. 26, p. 14683-14691, 2019.
- JURASCHEK, Lena Marie; KAPPENBERG, Arne; AMELUNG, Wulf. Mycotoxins in soil and environment. **Science of the Total Environment**, v. 814, p. 152425, 2022.
- KHANEGHAH, Amin Mousavi et al. The concentration and prevalence of ochratoxin A in coffee and coffee-based products: A global systematic review, meta-analysis and meta-regression. **Fungal biology**, v. 123, n. 8, p. 611-617, 2019.
- KIM, Dong-Hyun et al. Elevation of sphinganine 1-phosphate as a predictive biomarker for fumonisin exposure and toxicity in mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 69, n. 23, p. 2071-2082, 2006.
- KORB, Oliver; STUTZLE, Thomas; EXNER, Thomas E. Empirical scoring functions for advanced protein–ligand docking with PLANTS. **Journal of chemical information and modeling**, v. 49, n. 1, p. 84-96, 2009.
- KÓSZEGI, Tamás; POÓR, Miklós. Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. **Toxins**, v. 8, n. 4, p. 111, 2016.
- KUMAGAI, Keigo; HANADA, Kentaro. Structure, functions and regulation of CERT, a lipid-transfer protein for the delivery of ceramide at the ER–Golgi membrane contact sites. **FEBS letters**, v. 593, n. 17, p. 2366-2377, 2019.
- KUMAR, Pradeep et al. Nivalenol Mycotoxin Concerns in Foods: An Overview on Occurrence, Impact on Human and Animal Health and Its Detection and Management Strategies. **Toxins**, v. 14, n. 8, p. 527, 2022.
- LEÃO, Aaron Bruno. **Estratégias de otimização e paralelização massiva do programa de atracamento molecular DockThor**. 2022. Tese (Pós-graduação em modelagem computacional) - Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, 2022.
- LI, Feng-Qin; LUO, Xue-Yun; YOSHIZAWA, Takumi. Mycotoxins (trichothecenes, zearalenone and fumonisins) in cereals associated with human red-mold intoxications stored since 1989 and 1991 in China. **Natural Toxins**, v. 7, n. 3, p. 93-97, 1999.

LUTSKY, I. I.; MOR, N. Alimentary toxic aleukia (septic angina, endemic panmyelotoxicosis, alimentary hemorrhagic aleukia): t-2 toxin-induced intoxication of cats. **The American Journal of Pathology**, v. 104, n. 2, p. 189, 1981.

MAGALHÃES, Camila S. de; BARBOSA, Hélio JC; DARDENNE, Laurent E. A genetic algorithm for the ligand-protein docking problem. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 605-610, 2004.

MAGNOLI, Alejandra Paola; POLONI, Valeria Lorena; CAVAGLIERI, Lilia. Impact of mycotoxin contamination in the animal feed industry. **Current Opinion in Food Science**, v. 29, p. 99-108, 2019.

MARASAS, Walter Friedrich Otto et al. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 197-203, 1988.

OLIVEIRA, Idjane Santana et al. Biosensors for early detection of fungi spoilage and toxigenic and mycotoxins in food. **Current opinion in food science**, v. 29, p. 64-79, 2019.

OLIVEIRA, Gislaine et al. Influence of temperature and water activity on Ochratoxin A production by *Aspergillus* strain in coffee south of Minas Gerais/Brazil. **LWT**, v. 102, p. 1-7, 2019.

OSBORNE, Lawrence E.; STEIN, Jeffrey M. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. **International journal of food microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 103-108, 2007.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 36, n. 2, p. 96-136, 2014.

QIN, Xiaoya et al. Sphingosine kinase AtSPHK1 functions in fumonisin B₁-triggered cell death in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 119, p. 70-80, 2017.

QUINTELA, Silvia. Mycotoxins in beverages: occurrence, regulation, economic impact and cost-effectiveness of preventive and removal methods. In: **Safety issues in beverage production**. Academic Press, 2020. p. 147-186.

RASHIDIEH, Behnam et al. A molecular modeling based screening for potential inhibitors to alpha hemolysin from *Staphylococcus aureus*. **Bioinformatics**, v. 11, n. 8, p. 373, 2015.

- RATHER, Irfan A. et al. The sources of chemical contaminants in food and their health implications. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 830, 2017.
- SABE, Victor T. et al. Current trends in computer aided drug design and a highlight of drugs discovered via computational techniques: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 224, p. 113705, 2021.
- SCHLOSSER, Olivier; ROBERT, Samuel; NOYON, Naike. Airborne mycotoxins in waste recycling and recovery facilities: Occupational exposure and health risk assessment. **Waste Management**, v. 105, p. 395-404, 2020.
- SELKO, Global Mycotoxin Review, 2022 update and outlook for 2023, 2023. Disponível em <<https://ruminants.selko.com/health-and-fertility/mycotoxin-management-mycotoxin-contamination-risk-global-review-dairy>>. Acesso em: 9 mar. 2024.
- SILVA, Artur Alves Rodrigues da et al. Alphatoxin Nanopore Detection of Aflatoxin, Ochratoxin and Fumonisin in Aqueous Solution. **Toxins**, v. 15, n. 3, p. 183, 2023.
- SILVA, Artur AR et al. Stochastic Sensing of Organotin Compounds with Alpha-Hemolysin Nanopore. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 35, p. e-20230127, 2024.
- SILVA-JÚNIOR, Janilson José da. Modelagem computacional, preparação e análise das propriedades do nanosensor estocástico para detecção e identificação de cianotoxinas. 2017.
- SOBROVA, Pavlina et al. Deoxynivalenol and its toxicity. **Interdisciplinary toxicology**, v. 3, n. 3, p. 94-99, 2010.
- SUBEDI, Subash. Journal of Maize Research and Development (2015) 1 (1): 28-52. **Journal of Maize Research and Development**, v. 1, n. 1, p. 28-52, 2015.
- TAN, Hongxia et al. Recent advances on formation, transformation, occurrence, and analytical strategy of modified mycotoxins in cereals and their products. **Food Chemistry**, v. 405, p. 134752, 2023.
- TANIWAKI, Marta H. et al. Understanding mycotoxin contamination across the food chain in Brazil: Challenges and opportunities. **Toxins**, v. 11, n. 7, p. 411, 2019.
- TEIXEIRA, L. R.; SILVA JÚNIOR, J. J. da; VIEIRA, P. H. S.; CANTO, M. V. G.; FIGUEIRÊDO, A. G. M. de; SILVA, J. L. V. da. Tamoxifen inhibits the anion channel induced by Staphylococcus aureus α -hemolysin: electrophysiological

and docking analysis. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. e13010212326, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i2.12326.

TIAN, Ye et al. Functional agents to biologically control deoxynivalenol contamination in cereal grains. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 395, 2016.

UDOMKUN, Patchimaporn et al. Mycotoxins in Sub-Saharan Africa: Present situation, socio-economic impact, awareness, and outlook. **Food Control**, v. 72, p. 110-122, 2017.

VAN DER MERWE, K. J. et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, v. 205, n. 4976, p. 1112-1113, 1965.

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

VISUALIZER, D. S. Discovery Studio Visualizer. 2. **Accelrys software inc**, 2005.

WU, Felicia; GROOPMAN, John D.; PESTKA, James J. Public health impacts of foodborne mycotoxins. **Annual review of food science and technology**, v. 5, p. 351-372, 2014.

YU, Yuandong et al. Application of Molecular Simulation Methods in Food Science: Status and Prospects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 6, p. 2684-2703, 2023.

ZAIN, Mohamed E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi chemical society**, v. 15, n. 2, p. 129-144, 2011.

ZHENG, Hong-Yun; LI, Chun-Yu; YAO, Nan. Fumonisin B1: A tool for exploring the multiple functions of sphingolipids in plants. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 600458, 2020.

ZHIHONG, Liang; KUNLUN, Huang; YUNBO, Luo. Ochratoxin A and ochratoxin-producing fungi on cereal grain in China: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 4, p. 461-470, 2015.