

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal

Gesilda Florenço das Neves

**Dinâmica não linear na análise de séries temporais resultantes do  
bloqueio na corrente iônica através do nanoporo individual da  
alfatoxina do *Staphylococcus aureus***

Recife  
2017



Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Gesilda Florenço das Neves

**Dinâmica não linear na análise de séries temporais resultantes do  
bloqueio na corrente iônica através do nanoporo individual da  
alfatoxina do *Staphylococcus aureus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira  
Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues

Recife  
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Nome da Biblioteca, Recife-PE, Brasil

N518d Neves, Gesilda Florenço das  
Dinâmica não linear na análise de séries temporais resultantes do bloqueio na corrente iônica através do nanoporo individual da alfatoxina do *Staphylococcus aureus* / Gesilda Florenço das Neves. – 2017.  
98 f. : il.

Orientador: Romildo de Albuquerque Nogueira.  
Coorientador: Cláudio Gabriel Rodrigues.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2017.  
Inclui referências.

1. Alfa-hemolisina 2. Sensoriamento estocástico 3. Markov  
4. Complexidade 5. Aleatoriedade I. Nogueira, Romildo de Albuquerque, orient. II. Rodrigues, Cláudio Gabriel, coorient.  
III. Título

CDD 636.089

Gesilda Florenço das Neves

**Dinâmica não linear na análise de séries temporais resultantes do bloqueio na corrente iônica através do nanoporo individual da alfatoxina do *Staphylococcus aureus***

Tese defendida e aprovada em 28 de junho de 2017.

**Banca examinadora:**

---

Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira  
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal – UFRPE  
Presidente

---

Prof. Dr. Ramón Enrique Ramayo Gonzalez  
Departamento de Física -UFRPE

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Jeine Emanuele Santos da Silva  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

---

Dijanah Cota Machado  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Dijanah Cota Machado  
Departamento de Biofísica e Radiobiologia-UFPE

---

Prof. Dr.<sup>a</sup>. Tatjana Stosic  
Departamento de Estatística e Informática - UFRPE

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Giselda e Bráulio e minha filha Lívia.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por permitir a realização de mais um sonho. Agradeço eternamente aos meus pais, pelo incentivo, ajuda, em todos os momentos. Ao meu irmão Jonisson e meu esposo Helton, por estarem sempre prontos a me ouvir. À minha filha Lívia por contribuir com sua alegria nos dias que estive desanimada. Amo muito vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Romildo Nogueira, que admiro e agradeço muito, por sua capacidade de escutar, conversar e ajudar em todos os momentos que precisei durante anos que estive no laboratório.

À Dijannah por sua amizade e parceria, pela disponibilidade de contribuir sempre, ceder os registros, ensinar os procedimentos e ajudar em tudo que foi necessário.

Ao Prof. Dr. Claudio Rodrigues, meu co-orientador, pela paciência, dedicação e orientações que contribuíram grandemente para realização do trabalho e meu aprendizado.

Ao professor Luíz Hamiel de Almeida Consoni e Carlos Manuel pelas orientações para que o trabalho fosse bem desenvolvido. A Mayara pela ajuda nas análises. A Juliana e Arthur por proporcionar uma agradável convivência na UFPE.

À Edbhergue Costa pela orientação no andamento do projeto e sua harmoniosa companhia no laboratório. Ao amigo Leandro Aguiar pelas orientações na fase de análises. Sempre que precisei esteve presente ajudando, ensinando com toda paciência. À Renato Moraes pelos ensinamentos e ajuda nas análises. À minha amiga Sabrina Roberta pela força e ajuda.

A todos os companheiros e amigos do LABTEC e LRC pelo companheirismo. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

*"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível."*

**Charles Chaplin**

## RESUMO

Ferramentas estatísticas de dinâmica não linear são amplamente empregadas na análise e descrição adequada de fenômenos nas áreas de química, física e biologia. O aumento na capacidade de processamento computacional, juntamente com o desenvolvimento de linguagens de programação e algoritmos possibilitaram a disponibilização de programas capazes de simulação e previsão em fenômenos que há alguns anos seriam inexecutáveis. Neste trabalho empregaram-se: Análise de Flutuação Destendenciada (DFA), Modelagem de Markov, Entropia Aproximada (ApEn), Complexidade de Lempel Ziv (CLZ) e Gráfico de Recorrência (GR) na análise de séries temporais resultantes do bloqueio ou desbloqueio na corrente iônica através do nanoporo individual da alfa-hemolisina do *Staphylococcus aureus* (alfa-hemolisina), causado pela entrada ou translocação do polietilenoglicol (PEG1294) monodisperso. Todos os experimentos foram realizados em bicamadas lipídicas formadas por diftanoil fosfatidilcolina, a temperatura ambiente (25 °C) e condições de fixação de voltagem empregando um amplificador de patch clamp. A solução aquosa foi de KCl 4M, pH 7,5, com o PEG nas concentrações de 400, 1000 ou 2000  $\mu\text{M}$  e as séries temporais com duração de no mínimo 30 segundos foram obtidas para cada uma das concentrações de PEG e nos potenciais transmembrana: 20, 40, 60, 80 e 100 mV. Cada uma das séries temporais foi segmentada originando as séries denominadas TP's e TA's. As series TP's e TA's eram compostas respectivamente, pelos tempos de permanência ou ausência do PEG no interior do nanoporo. Esses eventos não apresentaram correlação de longo alcance ( $\alpha_{\text{DFA}} = 0.5$ ), seguiram um padrão estocástico Markoviano, modelado por um processo de dois estados, apresentaram alta complexidade (CLZ  $\sim 1$  e ApEn  $\sim 2$ ) e se mostraram aleatório quando analisado através do GR (DET < 100) e do RQA. Os resultados teóricos corroboram com a literatura que afirma ser a cinética da interação analito-nanoporo um fenômeno estocástico.

**Palavras-chave:** alfa-hemolisina, sensoriamento estocástico, Markov, complexidade, aleatoriedade

## ABSTRACT

Statistical tools of nonlinear dynamics are widely used in the analysis and proper description of phenomena in the areas of chemistry, physics and biology. The increase in computational processing capacity, together with the development of programming languages and algorithms, enabled the availability of programs capable of simulation and prediction in phenomena that for some years would be impracticable. In this work, we used: Detrended Fluctuation Analysis (DFA), Markov Modeling, Approximate Entropy (ApEn), Lempel Ziv Complexity (CLZ) and Recurrence Plot (RP) in the analysis of time series resulting from the blocking or unlocking in the chain Ionization through the individual nanopore of the alpha-hemolysin of *Staphylococcus aureus* (alpha-hemolysin), caused by the entry or translocation of monodisperse polyethylene glycol (PEG1294). All experiments were performed on lipid bilayers formed by diptanyl phosphatidylcholine at room temperature (25°C) and voltage clamping conditions employing a patch clamp amplifier. The aqueous solution was 4M KCl, pH 7.5, with the PEG at the concentrations of 400, 1000 or 2000 $\mu$ M and the time series with a duration of at least 30 seconds were obtained for each of the PEG concentrations and in the potential transmembrane: 20, 40, 60, 80 and 100 mV. Each of the time series was segmented originating the series called TP's and TA's. The TP's and TA's series were composed respectively by the residence times or absence of PEG within the nanopore. . These events did not present correlation ( $\alpha_{DFA} = 0.5$ ), followed a Markovian stochastic pattern, modeled by a two state process, presented high complexity (CLZ  $\sim$  1 and ApEn  $\sim$  2) and randomness as showed through RP (DET <100) and RQA. These theoretical results corroborate with the literature that affirm to be the kinetics of the analyte-nanopore interaction a stochastic phenomenon.

**Keywords:** alpha-hemolysin, stochastic sensor, Markov, complexity, randomness

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 Bionanotecnologia.....	16
2.2 Biossensores.....	16
2.3 Nanoporos como sensor .....	19
2.4 Alfa-Hemolisina .....	25
2.5 O Modelo Markoviano .....	29
2.6 Ruído Gaussiano Fracionário (fGn) .....	34
2.7 Análise de Flutuação Destendenciada-DFA.....	36
2.8 Complexidade de Lempel-Ziv.....	39
2.9 Entropia Aproximada (ApEn).....	40
2.10 Gráfico de Recorrência e Análise de Quantificação de Recorrência.....	43
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	51
<b>Capítulo 1</b> .....	63
Métodos de dinâmica não linear para estudar a interação polímero-nanoporo.....	63
<b>Capítulo 2</b> .....	81
Análise da dinâmica da translocação do PEG1294 no nanoporo formado pela alfa-hemolisina numa bicamada lipídica plana.....	81

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do processo de biossensoriamento.....	17
Figura 2. Biossensoriamento através de nanoporos biológicos.....	18
Figura 3. Classificação dos nanoporos.....	20
Figura 4. Esquema da interação da molécula do analito com o nanoporo proteico inserido em uma bicamada lipídica plana.....	21
Figura 5. Esquema representativo da translocação de três analitos simultaneamente pelo nanoporo de alfa-hemolisina.....	22
Figura 6. Esquema que ilustra o princípio da contagem de Coulter e nanoporo.....	23
Figura 7. Esquema do diagrama experimental.....	24
Figura 8. Estrutura do nanoporo de alfa-hemolisina.....	27
Figura 9. Exemplos de nanoporos nativos e engenheirados.....	28
Figura 10. Exemplo de um comportamento da cadeia de Markov de dois estados..	30
Figura 11. Modelagem Markoviana para dois estados F (Fechado) e A (Aberto) e suas taxas de transições ( $K_{01}$ e $K_{10}$ ).....	32
Figura 12. Fluxograma para a modelagem Markoviana no QUB©.....	34
Figura 13. Séries geradas por fGn.....	35
Figura 14. Procedimentos realizados para obtenção do coeficiente alfa de uma série temporal.....	39

Figura 15. Interação entre a informação e a entropia, ordem e desordem e a relação com o comportamento aleatório e caótico.....	42
Figura 16.Gráfico de recorrência.....	45
Figura 17.GR para o atrator de Lorenz: A. Série temporal a componente x do atrator; B. Idem A, porém a série temporal embaralhada.....	46
Figura 18.As séries temporais seguidas pelos respectivos GR.....	47
Figura 19.Exemplos de GR de séries temporais diversas.....	48

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

Poros em escala nanométrica estão emergindo como ferramentas poderosas no biossensoriamento de moléculas unitárias. Os biossensores têm capacidade de detectar de forma ágil, analitos químicos e/ou biológicos (KIRSCH et al., 2013; LETIZIA et al., 2017).

Os nanoporos podem ser biológicos ou artificiais, estes últimos são fabricados em substratos sólidos por meio de técnicas de nanotecnologias. Os nanoporos biológicos são, em sua maioria, canais iônicos proteicos (FENG et al., 2015). Um dos mais estudados para translocação de analitos e como sensor estocástico é o da alfa-hemolisina ( $\alpha$ HL) de *Staphylococcus aureus*. Esses nanoporos são obtidos através da inserção da  $\alpha$ HL num substrato, como exemplo, uma bicamada lipídica plana (MAJD et al., 2010; KIM et al., 2013).

Estudos sobre os nanoporos são desenvolvidos em diversas áreas da ciência e servem de base para compreender a função de canais iônicos e suas diversas ações em processos fisiológicos e também seu papel como biossensores de analitos diversos (GYURCSÁNYI, 2008; RINCON-RESTREPO et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011).

A passagem de analitos através do nanoporo promove alterações de condutância que permitem a identificação e quantificação de moléculas individuais de espécies-alvo numa mistura. A translocação molecular altera a corrente iônica e bloqueia o poro de forma reversível e aleatória (RODRIGUES et al., 2011).

Experimentos de interação analito-nanoporo resultam em sinais de correntes através do poro que podem ser tratados como uma série temporal, ou seja, conjunto de dados coletados em intervalos regulares de tempo que representam o bloqueio (tempo de presença) e interbloqueio (tempo de ausência) do analito no nanoporo. O objetivo do presente trabalho foi analisar os perfis de correlação e complexidade da série temporal obtida dos bloqueios da corrente iônica gerados pela interação das moléculas do analito (polietilenoglicol 1294) com o nanoporo de  $\alpha$ HL. Nesta análise foram aplicados métodos de dinâmica não linear, tais como: Análise de Flutuação Destendenciada (DFA); Entropia Aproximada (ApEn), Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ) e Gráfico de recorrência.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 BIONANOTECNOLOGIA**

A bionanotecnologia é uma área recente que teve seu surgimento a partir da união entre a biotecnologia e a nanotecnologia ou até um campo entre nanomateriais e biotecnologia (DA COSTA et al., 2014).

Área próspera nas pesquisas entre as ciências da vida e a nanotecnologia, a bionanotecnologia é uma ciência que lida com estruturas com dimensões em nanoescala entre 1 a 100nm. Esse novo território científico explora biomoléculas, nanoporos e até nanorrobôs. Em nanoporos, há a bioengenharia de proteínas para aplicações diversas (MARTINEZ et al., 2014; HE; MARLES-WRIGHT, 2015).

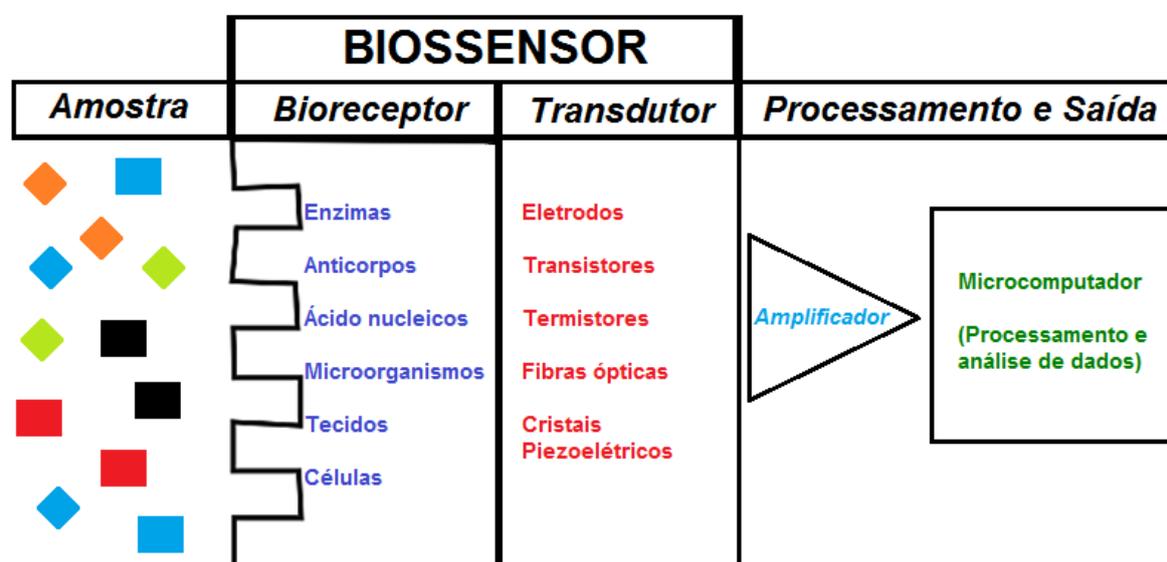
A interação entre materiais em nanoescala e sistemas biológicos, foca na produção de nanomateriais com aplicações na saúde, agricultura, meio ambiente, engenharia civil e ciências dos materiais (MARTINEZ et al., 2014; HE; MARLES-WRIGHT, 2015).

A meta de longo prazo da bionanobiotecnologia é construir dispositivos minúsculos que respondam ao ambiente e realizem tarefas. Recentemente, têm-se focado no transporte de eletrólitos em nanoporos com o objetivo de aplicações biológicas através de membranas, dispositivos para a administração de moléculas e sistemas de detecção (MOMOTENKO, 2011).

### **2.2 BIOSSENSORES**

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico, que integra um elemento biológico a um transdutor físico que é capaz de converter uma resposta biológica em um sinal mensurável, proporcional à concentração do analito (Figura 1) (KUMAR; RANI, 2013). As aplicações dos biossensores nas áreas de saúde, de alimentos, no meio ambiente e no controle do bioterrorismo são extraordinárias (HOWORKA; SIWY, 2009; MOVILEANU, 2009; LIU; ZHAO; GUAN, 2010). Esses dispositivos moleculares fornecem uma nova classe de sensores de baixo custo que permite medições sofisticadas e rápidas de moléculas unitárias (CORNELL et al., 1997; HELLINGA; MARVIN, 1998). A detecção de moléculas individuais tornou-se um

importante componente de investigação na bioquímica, biofísica e química (HOWORKA; SIWY, 2009).



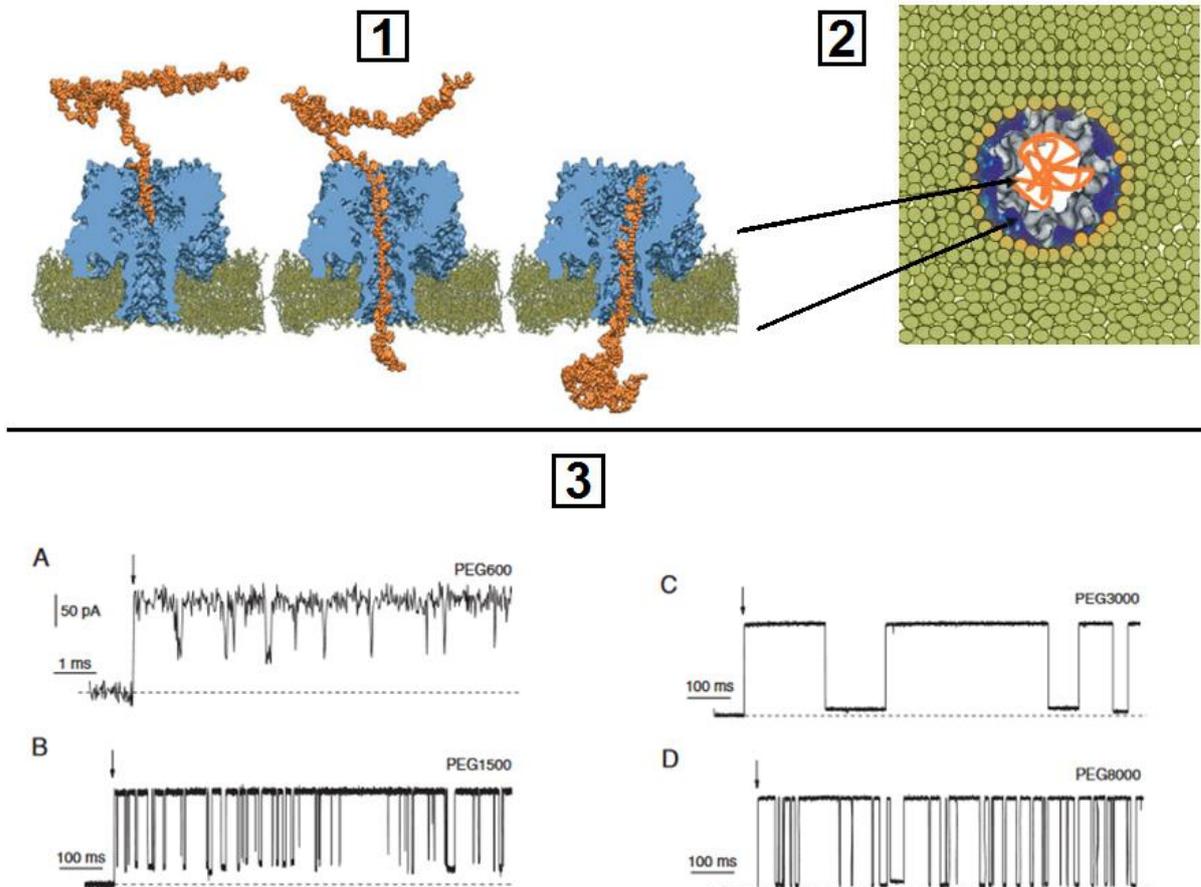
**Figura 1.** Esquema do processo de biossensoriamento com a chegada da amostra e o registro do sinal em um microcomputador para posterior análise. Adaptado de: BRITO, A. M. S, 2013.

A modulação da corrente iônica através dos canais de proteínas, por estímulos físicos ou químicos externos, provocou grandes impactos na ciência. Um crescimento expansivo tem sido visto no campo de biossensores, que consiste em uma classe de detectores de moléculas individuais que são baseados na modificação de corrente iônica através de um nanoporo por analitos que interagem dentro dessa estrutura. Esses biossensores têm sido empregados para a detecção de pequenas e longas estruturas moleculares (MOVILEANU, 2009; ARIF et al., 2015).

Biossensores estocásticos (BE) baseados em nanoporos proteicos individuais podem detectar, identificar e caracterizar analitos, apenas por meio da análise da série temporal das flutuações da corrente iônica que flui pelo nanoporo (Figura 2) (RODRIGUES et al., 2008; RINCON-RESTREPO et al., 2011). A análise da flutuação de corrente vai fornecer dois parâmetros importantes na identificação das moléculas: a amplitude de bloqueio e o tempo de residência (RINCON-RESTREPO et al., 2011).

Os nanoporos são ideais para serem usados como biossensores por diversas razões: o analito ao interagir com ele gera um sinal através do bloqueio temporário do poro ou mudança no potencial eletrostático perto ou dentro do poro; o analito não

precisa ser marcado para ser detectado; é possível a detecção de mais de um analito presente concomitantemente na solução, e apresenta alta sensibilidade e rapidez na análise (Figura 5) (RINCON-RESTREPO et al., 2011).



**Figura 2.** Biossensoriamento através de nanoporos biológicos. 1. Etapas da translocação de uma molécula de polietilenoglicol pelo nanoporo de alfa-hemolisina; 2. Vista de um corte transversal da bicamada lipídica (em verde), o nanoporo (em azul) e o polietilenoglicol (em laranja) no lúmen do nanoporo; 3. Corrente gerada pela translocação de um mesmo analito com pesos moleculares diferentes – cada um gera um sinal específico. Adaptado de: L Movileanu & Bayley, 2001; Krasilnikov, Rodrigues & Bezrukov, 2006.

Nos últimos anos temos visto um crescimento contínuo do campo de biossensores, devido a um aumento do interesse entre as ciências básicas e aplicadas para o desenvolvimento de dispositivos elétricos que podem ser utilizados em uma variedade de aplicações, incluindo serviços de saúde humana e monitoramento ambiental (WANEKAYA; CHEN; MULCHANDANI, 2008).

Os biossensores estocásticos são conhecidos por resultados rápidos e precisos que surgem devido à interação de uma substância com uma dada biomolécula (SINGH et al., 2014). É também uma ferramenta possível para sequenciamento de DNA (KOCER; TAUKE; DÉJARDIN, 2012). A alfa-hemolisina tem sido um dos mais bem estudados nanoporos formado por proteínas para fins de detecção e quantificação de espécies-alvo em uma mistura (KOCER; TAUKE; DÉJARDIN, 2012).

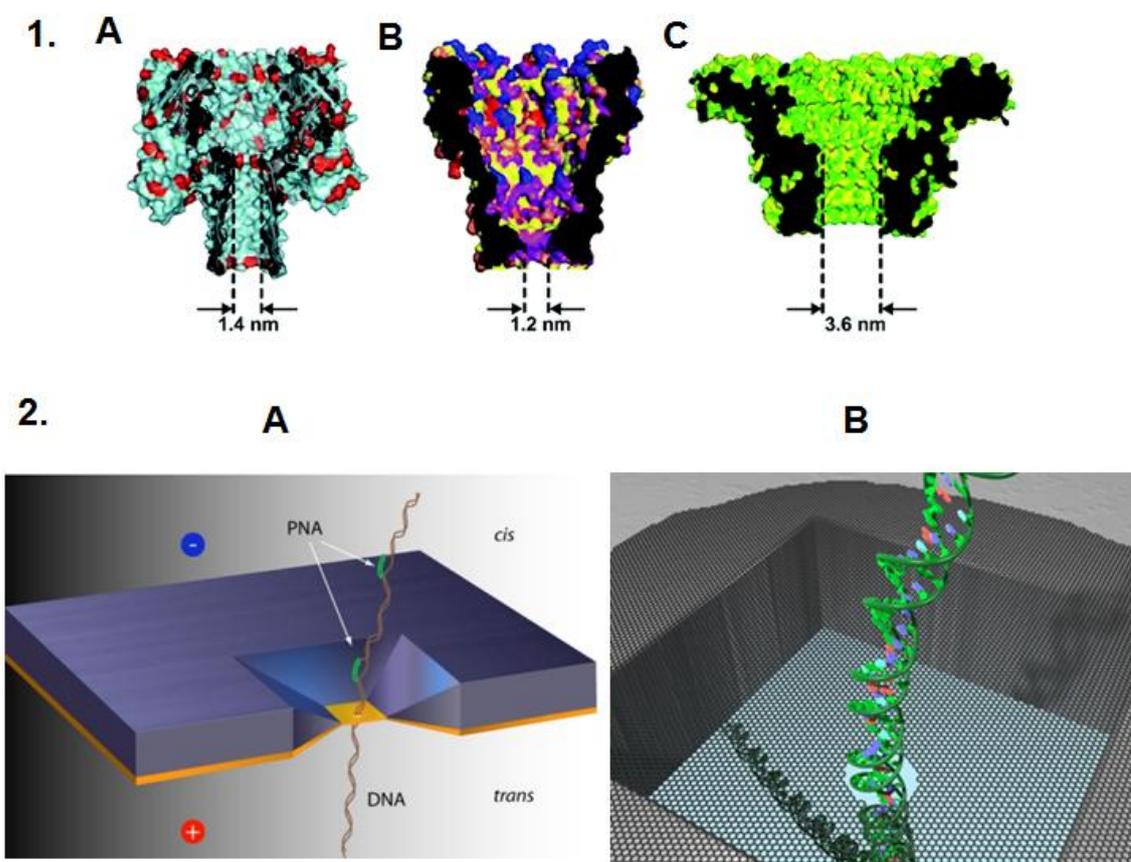
### **2.3 NANOPOROS COMO SENSOR**

O emprego da palavra nanoporo para estudos biológicos foi a partir de 1990 por David Deamer, em colaboração com Daniel Branton e independentemente por George Church e Richard Baldarelli, através da hipótese de que uma molécula de DNA ribossômico (DNAr) ao translocar-se por um nanoporo modificava a corrente iônica de uma forma específica. O primeiro experimento com um nanoporo foi realizado para detecção de ácidos nucleicos de cadeia simples através do poro alfa-hemolisina, como relatado por Kasianowicz e colaboradores em 1996 (KASIANOWICZ et al., 1996; ACTIS; VILOZNY; POURMAND, 2012).

Nanoporos têm aplicações em muitas áreas, como a análise de íons, DNA, RNA, peptídeos, proteínas, fármacos, polímeros e macromoléculas. Eles são classificados como biológicos e de estado sólido (Figura 3). Os biológicos têm sido amplamente utilizados na detecção de uma única molécula, diagnóstico de doença e sequenciamento de DNA. A utilização de nanoporos apresenta grande importância na análise do DNA, por apresentar baixo custo e alta velocidade no sequenciamento e identificação das bases através de bloqueios específicos no sinal da corrente quando o DNA passa através do nanoporo (ASTIER; BAYLEY; HOWORKA, 2005; KIM et al., 2013).

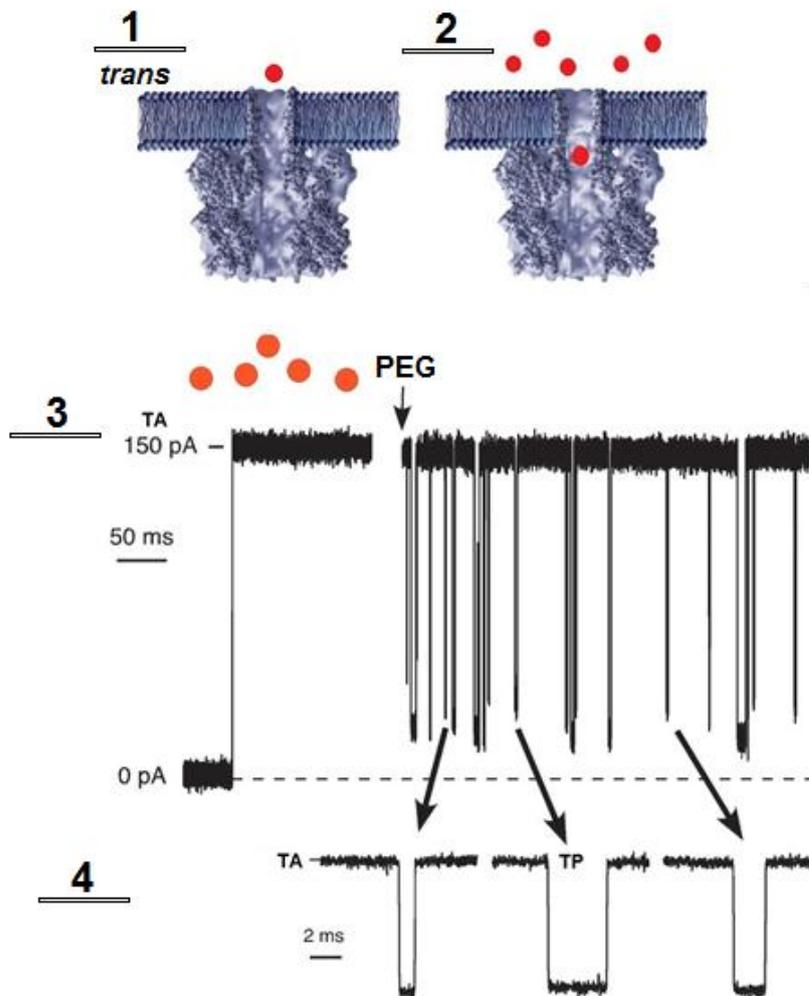
Através de técnicas de nanofabricação é possível criar artificialmente nanoporos em superfície inorgânica com precisão nanométrica, denominados nanoporos de estado sólido (Figura 3). Pesquisadores relataram a primeira fabricação de um nanoporo usando um método chamado feixe de íons de esculpir (LI et al., 2001). Os autores desenvolveram um feixe de íons focalizados (FIB) que usa íons para formar um pequeno orifício em uma membrana. Atualmente, o Óxido de Alumínio

Anodizado (AAO) tem sido um dos substratos de escolha para a fabricação de nanoporos. A aplicação de materiais mais voláteis foi utilizada para criar nanoporos de carbono (LEE; SOHN; HYEON, 2001) e de sílica. Além disso, a estrutura do nanoporo pode ser fabricada com materiais metálicos (ACTIS; VILOZNY; POURMAND, 2012).



**Figura 3.** Classificação dos nanoporos. 1. Exemplos de nanoporos biológicos: A. Alfa-hemolisina, B. MspA, C. Phi29; 2. Exemplos de nanoporos de estado sólido: A. Sílica, B. Grafeno. Adaptado de: Feng et al., 2015.

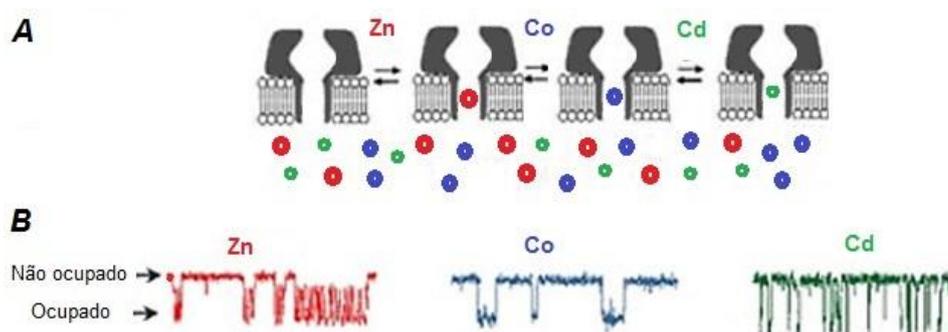
Os nanoporos biológicos são, geralmente, canais iônicos inseridos em uma bicamada lipídica plana banhados por solução eletrolítica (Figura 3;4). Há algumas limitações no processo de incorporação como dependência do pH, temperatura, concentração de eletrólitos e estresse mecânico (ACTIS; VILOZNY; POURMAND, 2012; ASTIER; BAYLEY; HOWORKA, 2005).



**Figura 4.** Esquema da interação da molécula do analito com o nanoporo proteico inserido em uma bicamada lipídica plana. 1. Nanoporo não ocupado pelo analito (representados pelas bolas vermelhas); 2. Ligação reversível do analito PEG; 3. Tempos de permanência dos bloqueios da corrente gerados pela entrada da molécula unitária no lúmen do nanoporo; 4. A análise dos tempos de permanências, os estados de não ocupação do analito (TA) e ocupação (TP). Adaptado de: Gu; Shim, 2010.

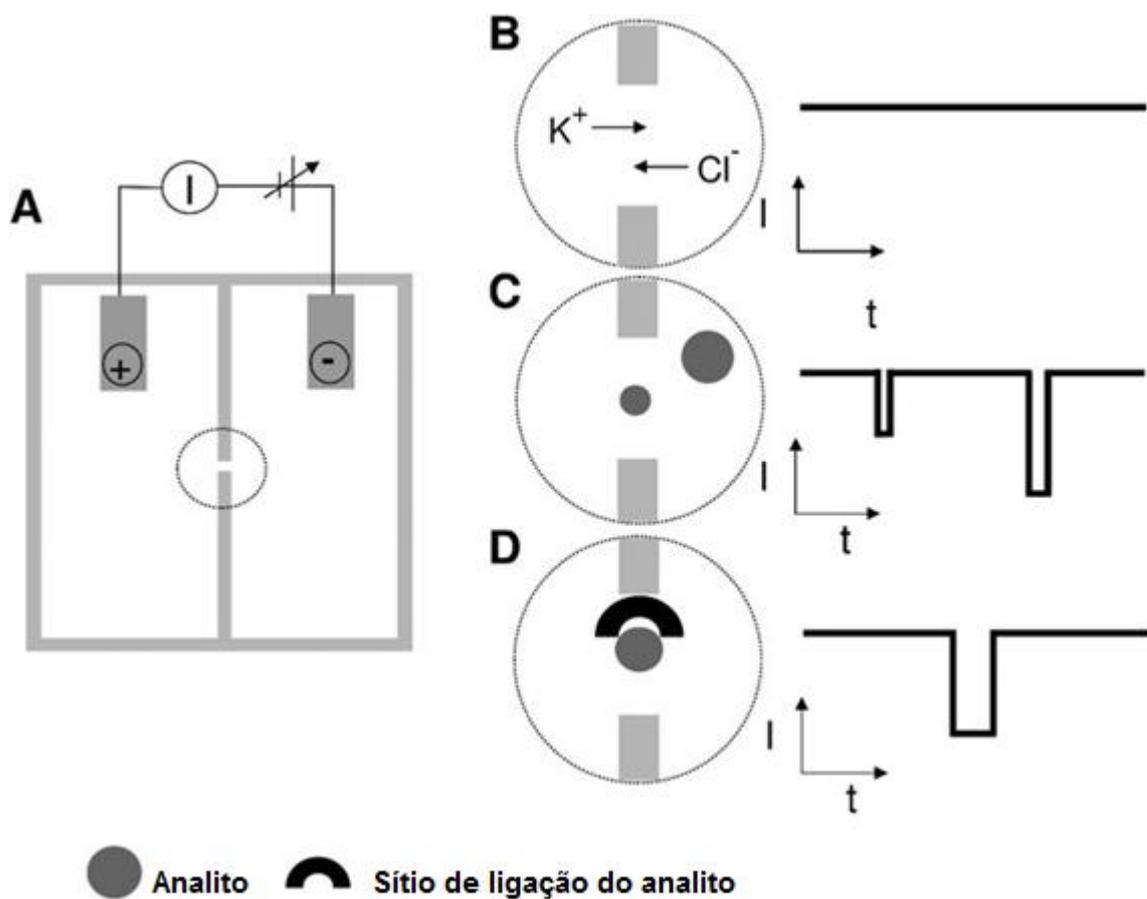
Poros em escala nanométrica têm sido amplamente investigados, particularmente, como sensores estocásticos aplicados na identificação de moléculas biológicas, sendo possível identificar e quantificar analitos com base na variação de condutância através do poro iônico (Figura 4; Figura 5) (RHEE; BURNS, 2007).

As vantagens de nanoporos biológicos são o tamanho, estrutura e a capacidade de poderem ser modificados facilmente com as técnicas modernas de biologia molecular e a detecção de moléculas individuais que permitiu o surgimento como uma das mais poderosas tecnologias de sequenciamento (FENG et al., 2015).



**Figura 5.** Esquema representativo da translocação de três analitos simultaneamente pelo nanoporo de alfa-hemolisina. A. Translocação de três analitos: Zn, Co, Cd; B. Sinal de corrente gerado por cada analito translocado. Adaptado de: Braha et al., 2000.

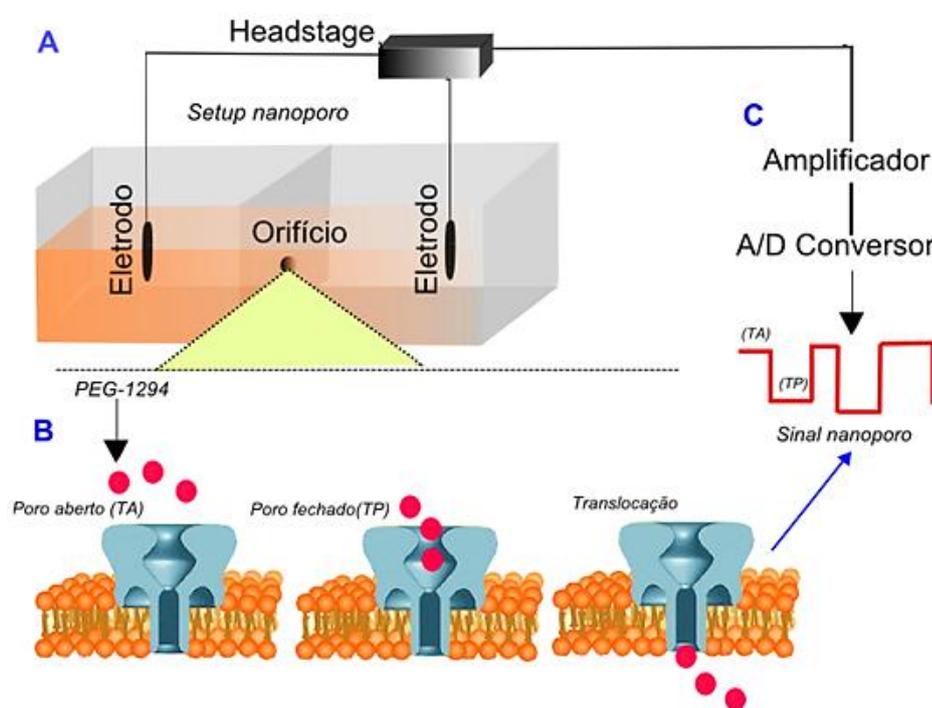
O princípio de funcionamento do nanoporo-sensor baseia-se no contador Coulter (Figura 6). Coulter, em 1953, desenvolveu o primeiro dispositivo baseado em microporo para a identificação e contagem de partículas contidas em fluido condutor (COULTER, 1953). É utilizado principalmente na contagem de células sanguíneas, mas pode ser utilizado para outros materiais. O princípio básico do contador Coulter é que pequenas partículas são forçadas pela diferença de potencial a passar através de um microcanal provocando uma mudança momentânea na condutância do sistema (Figura 6) (DING et al., 2010; FENG et al., 2015).



**Figura 6.** Esquema que ilustra o princípio da contagem de Coulter e nanoporo. (A) Esquema experimental do contador de Coulter ou nanoporo-sensor, respectivamente. (B) um potencial transmembranar causa um fluxo constante de íons através de um único poro. (C) analitos que passampelo poro causam bloqueios temporários em tempo real. (D) um analito liga reversivelmente em um local (construído com engenharia genética) no interior do poro resultando na flutuação da corrente. Adaptado de: Howorka; Siwy (2009).

O nanoporo biológico mais estudado e utilizado para fins de sensoriamento estocástico é o nanoporo formado pela alfa-hemolisina de *Staphylococcus aureus* inserido em bicamada lipídica plana (Figura 7). O sistema experimental utilizado na detecção de substâncias por este nanoporo é composto por uma câmara de Teflon® que é dividida em dois compartimentos separados por uma partição de Teflon®. Nesta partição há um orifício de dimensões micrométricas onde será formada a bicamada lipídica e em seguida inserido um único nanoporo. Este sistema é banhado por uma solução eletrolítica que permite que a corrente no nanoporo aberto seja medida. Eletrodos Ag/AgCl são inseridos em cada lado da câmara fazendo a conexão da câmara com o amplificador, como mostrado na Figura 7. Com a aplicação de um

potencial elétrico, os íons do eletrólito em solução são movidos através do poro, gerando um sinal de corrente iônica (FENG et al., 2015). Na ausência de compostos, o nanoporo está sempre aberto e uma corrente iônica constante pode ser observada. Em contraste, quando uma molécula alvo entra no poro, ela irá bloquear fisicamente o canal, resultando assim numa diminuição na corrente iônica que flui através do poro; quando a molécula deixa o canal, os poros desocupam e a corrente iônica volta ao estado de canal aberto (Figura 7) (LIU; ZHAO; GUAN, 2010).



**Figura 7.** Esquema do diagrama experimental. (A) câmara experimental que consiste de duas hemicâmaras separadas por uma película de teflon que possui um orifício para a formação da bicamada lipídica plana. (B) ilustração da translocação do analito PEG1294 no nanoporo protéico de  $\alpha$ HL. Uma voltagem é aplicada através dos eletrodos via um circuito externo, e a corrente iônica que flui pelo nanoporo é monitorada. A aplicação do potencial transmembrana é controlada pelo amplificador de clampeamento de voltagem. (C) O sinal é amplificado e representado em tempos de permanências TA e TP.

Segundo Krasilnikov (KRASILNIKOV et al., 2006), para o Polietilenoglicol a amplitude do bloqueio depende do peso molecular do polímero e a sua permanência no canal também é em função do seu tamanho.

Devido à natureza estocástica, as durações dos bloqueios individuais diferem entre si, porém, estatisticamente, seguem uma distribuição exponencial. A constante de ajuste da distribuição exponencial é definida como o tempo médio do bloqueio,  $\tau_{off}$ . A mudança na amplitude da condutância ( $\Delta g$ ) juntamente com o valor da  $\tau_{off}$  representam a assinatura de identificação do analito. Com  $\tau_{off}$ , podemos calcular a constante de dissociação,  $K_{off}$ , do complexo analito-nanoporo:  $K_{off} = 1/\tau_{off}$ .

Adicionalmente, ao contar a frequência de eventos de ligação (bloqueios de corrente), pode-se quantificar o analito medindo o intervalo entre dois bloqueios adjacentes. Semelhante ao tempo de bloqueio, os intervalos estocásticos entre os bloqueios também seguem uma distribuição exponencial e a constante  $\tau_{on}$  é o intervalo médio interbloqueios. O valor invertido da  $\tau_{on}$  é a frequência de ocorrência dos eventos  $f = 1/\tau_{on}$  que é proporcional à concentração do analito ([T]) (GU; SHIM, 2010).

Cada analito produz uma assinatura característica, portanto o próprio elemento sensor não precisa ser altamente seletivo. Teoricamente, isso permite vários analitos ser quantificados e identificados utilizando simultaneamente um único elemento sensor, enquanto o sensor em si pode fornecer suficiente resolução (Figura 5) (BRAHA et al., 1997; ACTIS; VILOZNY; LIU; ZHAO; GUAN, 2010; POURMAND, 2012).

A interação de moléculas individuais com nanoporos provoca mudanças na corrente que flui através do poro (Figura 2;4), baseia-se em interrupções reversíveis da corrente iônica (por analitos individuais ou objetos em nanoescala) através de um poro montado na bicamada (GURNEV; NESTOROVICH, 2014). Nanoporos individuais também têm sido utilizados para detectar proteínas e determinar características particulares da mesma (WANG; LU; CHEN, 2014).

## 2.4 ALFA-HEMOLISINA

Nos últimos anos os nanoporos têm sido modificados e utilizados em diversas aplicações biotecnológicas devido a sua capacidade de detecção molecular (KASIANOWICZ et al., 1996; MAJD et al., 2010; DI MARINO et al., 2015). Os nanoporos biológicos são geralmente canais iônicos, com estrutura cristalográfica

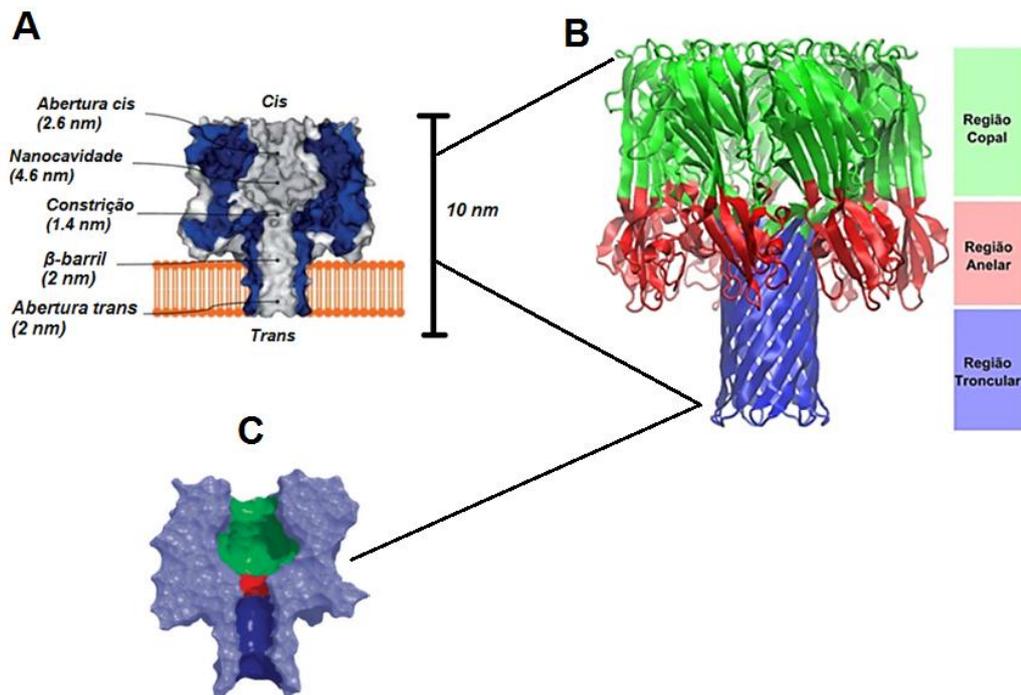
definida, o mais bem estudado é a alfa-hemolisina de *Staphylococcus aureus* (DEBLOIS; BEAN, 1970; BEZRUKOV; KASIANOWICZ, 1993; BRAHA et al., 1997; ITO; SUN; CROOKS, 2003; GURNEV et al., 2014).

A alfa-hemolisina é o primeiro e mais usado nanoporo biológico sendo empregado como sensor estocástico para pequenos solutos (Figura 2) através das membranas lipídicas e no campo de sequenciamento de DNA (DING et al., 2010; FENG et al., 2015). O estudo com translocação de polímeros não carregados através de nanoporos teve início em 1999 por Bezrukov e colaboradores (MERZLYAK et al., 1999). O grupo analisou bloqueios gerados pelo polímero polietilenoglicol de vários pesos moleculares para determinar o volume do lúmen do poro da alfa-hemolisina.

A exotoxina alfa-hemolisina é secretada pela bactéria *Staphylococcus aureus*. Os monômeros dessa toxina contêm 293 aminoácidos e peso molecular de 33 kDa. Sua estrutura é composta quase 293 aminoácidos (Figura 8) composta quase inteiramente por  $\beta$ -folhas (SONG et al., 1996; FENG et al., 2015) e se automontam na bicamada lipídica para formar um poro heptamérico (Figura 8) (KASIANOWICZ et al., 1996; GU; SHIM, 2010) com uma largura de 1,4 nm no ponto mais estreito (MURMU; ADHIKARI, 2012; FENG et al., 2015; CHANDRAMOULI et al., 2016).

Em membranas lipídicas planas a alfa-hemolisina é estável até 95°C e exibe uma condutância bem definida de um canal, permitindo que alterações sejam realizadas por meio da engenharia genética, ao longo do interior do poro (MOVILEANU, 2009). Este nanoporo tornou-se um excelente modelo para aplicações analíticas, porque ao contrário de muitos canais, ele pode permanecer totalmente aberto por períodos de até várias horas (KASIANOWICZ et al., 2001).

Os nanoporos derivados de toxinas formadoras de canais são de interesse para a biotecnologia (PANCHAL et al., 2002; MAJD et al., 2010; REINER et al., 2012; DELCOUR, 2013). Devido a sua capacidade de apresentar vias para translocação molecular em bicamada lipídica, tem oferecido caminhos para aplicações médicas e tecnológicas (GURNEV; NESTOROVICH, 2014).



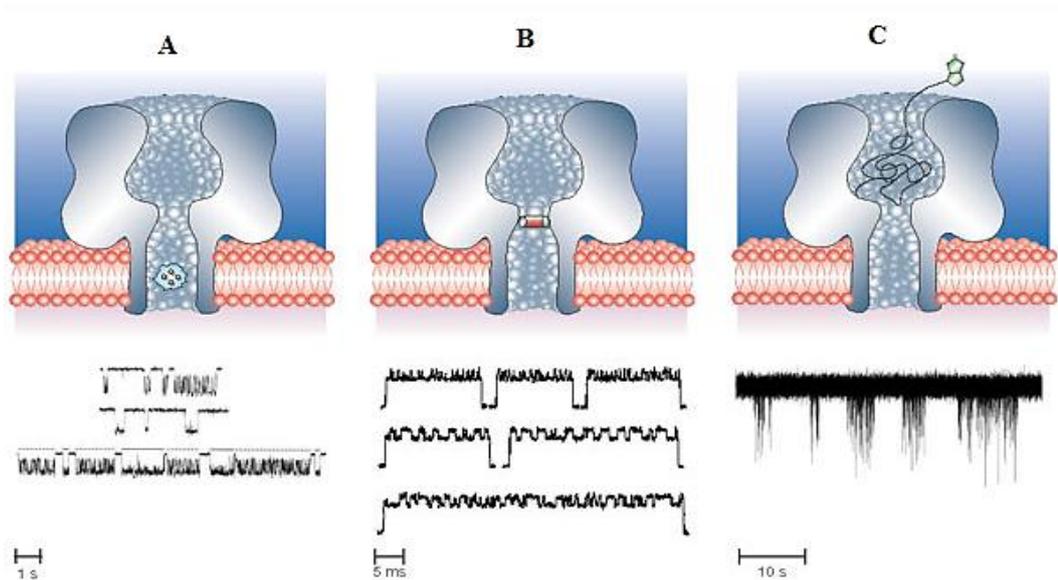
**Figura 8.** Estrutura do nanoporos de alfa-hemolisina. A. Dimensões do nanoporos; B. Regiões do nanoporos; C. A visão transversal à direita exibe a cavidade interna (verde), constrição interna (vermelha) e β-barril (azul). Adaptado de: Gu; Shim (2009); Howorka et al., 2009.

A alfa-hemolisina é uma ferramenta que tem sido empregada na detecção de diversas moléculas inorgânicas e orgânicas, não somente polipeptídios e polímeros (MOVILEANU, 2009). O uso desse nanoporos é interessante, por alguns fatores:

- a) Facilidade de engenharia genética
- b) Grande condutância de canal unitário
- c) Elevada estabilidade térmica

Nanoporos de alfa-hemolisina engenheirados têm sido estudados com a finalidade de tornar mais específica a detecção do analito pelo biossensor. Os nanoporos protéicos engenheirados são utilizados na detecção estocástica de uma ampla variedade de moléculas em solução aquosa (Figura 9) e como uma plataforma ultra-rápida e de baixo custo para o sequenciamento de RNA e DNA (MOVILEANU; BAYLEY, 2001; MAITRA; KIM; DUNBAR, 2012). Devido as suas características, a alfa-hemolisina é uma estrutura promissora para detectar

moléculas e por poder permanecer estável a temperaturas próximas de 100°C e dentro de uma larga faixa de pH de 2-12 (KANG et al., 2005).



**Figura 9.** Exemplos de nanoporos nativos e engenheirados. A. Translocação de íons metálicos através de um nanoporo nativo de alfa-hemolisina; B. Poro engenheirados com um adaptador de adaptador de ciclodextrina C. Nanoporo engenheirado: o poro contém uma cadeia de polietilenoglicol e uma extremidade da cadeia é anexada covalentemente dentro da cavidade do poro e a outra extremidade carrega um ligando para proteína alvo. Adaptado de: BAYLEY & CREMER, 2001.

Para a detecção de moléculas pequenas, há estratégias que diminuem mais ainda o diâmetro de constrição do poro, permitindo a detecção de tais moléculas (TERRETTAZ et al., 1993; HEYSE et al., 1998; TERRETTAZ; MAYER; VOGEL, 2003; GURNEV; NESTOROVICH, 2014; FENG et al., 2015). Utilizando poros de alfa-hemolisina geneticamente modificados, o grupo do pesquisador Hagan Bayley desenvolveu sensores para detecção de espécies iônicas e moléculas orgânicas em solução (BAYLEY; MARTIN, 2000; CHELEY; GU; BAYLEY, 2002; GUAN et al., 2005; WU; BAYLEY, 2008). Na figura 9 B e C podem ser observados dois nanoporos de alfa-hemolisina com as seguintes alterações adaptador de ciclodextrina e ligando da proteína alvo.

Já Kasianowicz estudou bloqueios devido a translocação de PEG em nanoporo de alfa-hemolisina (AMBJÖRNSSON et al., 2002; ROBERTSON et al., 2007).

Estudos com PEG também foram realizados para sondar a geometria do lúmen através dos diferentes bloqueios gerados (Figura 6) (MOVILEANU; BAYLEY, 2001; MERZLYAK et al., 2005).

## **2.5 O MODELO MARKOVIANO**

Processos estocásticos ou probabilísticos são usados na descrição de fenômenos cuja ocorrência no tempo (ou espaço) são permanentemente influenciadas por fatores aleatórios governados pelas leis de probabilidade, tais como:

- Recepção de sinais eletromagnéticos na presença de ruídos;
- Evolução de epidemias;
- Emissão de partículas por uma fonte radioativa;
- Crescimento de populações
- Cinética de canais iônicos

Espaço de parâmetros de um processo estocástico é um conjunto cujos os elementos representam os parâmetros que se deseja realizar a observação. Esses podem representar tempo, comprimento, a ordem de realização da observação etc. Espaço de estados de um processo estocástico é o conjunto cujos elementos representam os possíveis valores (estados) que o processo em observação pode assumir.

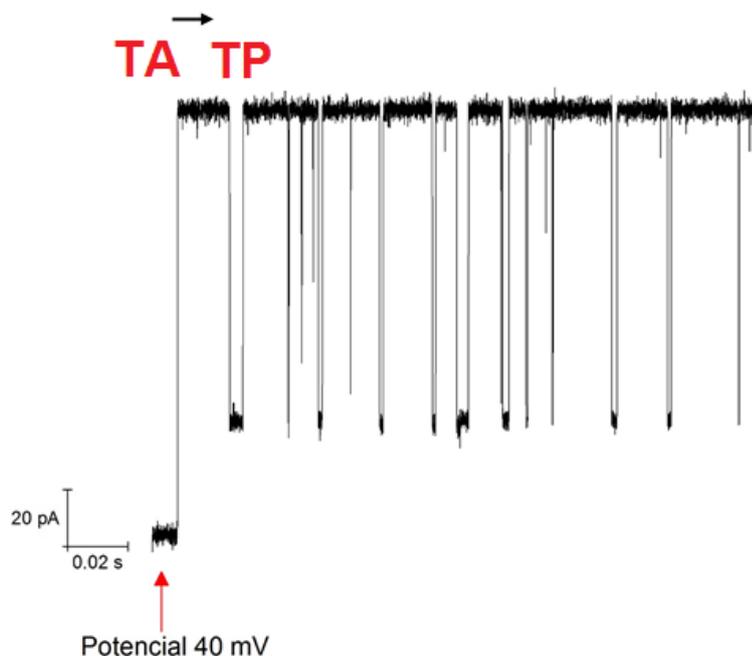
### **2.5.1 Processo estocástico e a cinética do bloqueio em nanoporos**

Na perspectiva de um sensor estocástico, a cinética da interação analito-nanoporo pode ser descrita por um processo estocástico de espaço de parâmetro contínuo – o tempo – e espaço de estados discretos – estados ocupado e não-ocupado.

### **2.5.2 Processo estocástico Markoviano**

Na maioria dos processos estocásticos as variáveis aleatórias que representam o espaço de estados  $\{X(t_1), X(t_2), \dots, X(t_n)\}$  exibem algum tipo de dependência. O tipo mais simples que um processo estocástico pode exibir é a dependência de Markov.

Numa cadeia de Markov é sempre possível prever-se o estado futuro da cadeia conhecendo-se unicamente o seu estado atual. Desta forma, o futuro da cadeia não depende do espaço de estados passados da cadeia, não possuindo memória (CAMPOS DE OLIVEIRA et al., 2006).



**Figura 10.** Exemplo de um comportamento da cadeia de Markov de dois estados no sinal de corrente gerado pela translocação de PEG1294 em 40mV. É visível que toda vez que sair do estado TA passará para o TP e vice-versa.

### 2.5.3 Cadeia de Markov e a cinética da interação analito-nanoporo

Algumas técnicas têm permitido o registro da corrente iônica através de um único canal iônico (nanoporo). A presença de um analito na solução que permeia o nanoporo pode bloqueá-lo e alterar sua condutância. Nesse caso o registro da corrente iônica reflete as transições do nanoporo entre o estado bloqueado e não bloqueado. Considerando o bloqueio-desbloqueio como sendo processo essencialmente estocástico, o fenômeno pode ser descrito de maneira semelhante a um canal transitando entre dois estados aberto e fechado. As constantes de transições  $k_{ij}$  entre os possíveis estados cinéticos da interação analito-nanoporo devem ser interpretadas probabilisticamente e estão relacionadas às probabilidades

de transições entre estados bloqueados e não bloqueados (CAMPOS DE OLIVEIRA et al., 2006).

As taxas de transições entre os diferentes estados bloqueados e não bloqueados podem ser determinadas a partir do seguinte procedimento:

1. Mede-se os tempos de permanência do canal unitário nos estados não-bloqueados e bloqueados;
2. Traça-se histogramas dos tempos de permanências do nanoporo nos estados bloqueados e não bloqueados;
3. Determina-se as funções densidades de probabilidade que melhor descrevem os histogramas;
4. Calcula-se as taxas de transições relacionando-se os parâmetros das funções de densidade de probabilidade teórica e empírica.

#### **2.5.4 Histogramas dos tempos de permanências nos estados bloqueados e não bloqueados.**

Estes gráficos permitem analisar-se a frequência com o qual o nanoporo permanece bloqueado ou não bloqueado por um intervalo de tempo menor ou igual a um valor previamente estabelecido. Os histogramas são construídos considerando-se as larguras das barras do histograma (“bins”) iguais a um certo intervalo de tempo  $\Delta t$  e contando-se o número de vezes que o nanoporo permaneceu bloqueado ou não bloqueado por uma duração menor ou igual a  $\Delta t$  e repete-se o procedimento para uma duração maior que  $\Delta t$  e menor que  $2\Delta t$  e assim sucessivamente até que todos os intervalos de tempos de permanências do nanoporo nos estados bloqueados (ou não bloqueados) sejam colocados no gráfico.

#### **2.5.5 A função densidade de probabilidades**

A probabilidade que um canal esteja bloqueado (ou não bloqueado) é dada por:

$$P_0 = \int_t^{t+dt} f(t)dt \quad \text{(Eq.1)}$$

Onde  $f(t)$  é a função densidade da distribuição de probabilidades. Como o processo estocástico em análise é Markoviano, então a função densidade de probabilidades é bem descrita por uma exponencial ou soma de exponenciais do tipo:

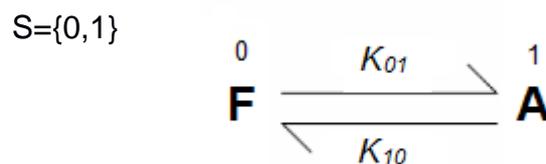
$$f(t) = a_1 \exp(-r_1 t) + a_2 \exp(-r_2 t) + \dots + a_n \exp(-r_n t) \quad \text{(Eq.2)}$$

Onde os  $a$ 's e  $r$ 's são os parâmetros ajustáveis do modelo.

Os parâmetros  $r$ 's são as constantes de tempos das exponenciais e no caso de um modelo cinético para um nanoporo com dois estados (bloqueado e não bloqueado, porém sempre com a mesmas condutâncias) são iguais as taxas de transições entre os dois estados. Para modelos com mais de dois estados necessariamente precisa-se resolver as equações diferenciais de Kolmogorov para obter-se a função densidade de probabilidade teórica.

### 2.5.6 Aplicação da teoria dos processos estocásticos a interação analito-nanoporo.

O caso mais simples de modelo para uma interação analito-nanoporo é aquela que tanto a condição bloqueado como não bloqueado apresenta somente um estado de condutância (Figura 11) (COLQUHOUN; HAWKES, 1981, 1982):



**Figura 11.** Modelagem Markoviana para dois estados F (Fechado) e A (Aberto) e suas taxas de transições ( $K_{01}$  e  $K_{10}$ ).

Onde F é o estado bloqueado e A o não bloqueado. Este modelo pode ser descrito por uma cadeia de Markov de espaço de parâmetro contínuo (o tempo de experimentação) e espaço de estados discretos  $S=\{0,1\}$ , onde 0 designa o estado bloqueado e 1 o estado não bloqueado. Neste caso, a função densidade de probabilidades dos tempos de permanências nos estados bloqueados e não bloqueados é dado pela seguinte expressão:

$$f_x = a_i \cdot \exp^{-r_i t}, t \geq 0. \quad (\text{Eq.3})$$

O tempo médio de permanências nos estados bloqueados e não bloqueados pode ser determinado como segue:

$$t_m = \int t f_x(t) \cdot dt = \frac{1}{r_i} \quad (\text{Eq.4})$$

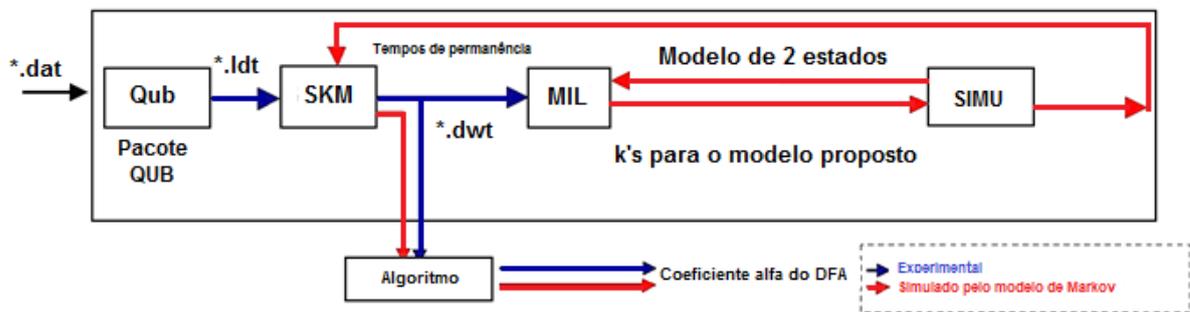
Os parâmetros  $q_x$  ( $x=0,1$ ) podem ser estimados a partir dos tempos médios de permanências nos estados bloqueados e não bloqueados. A taxa de transição entre os dois estados do nanoporo pode ser descrita como segue:

$$K_{ij} = r_i \cdot Q(i,j), i \neq j, \quad (\text{Eq.5})$$

Onde  $K_{ij}$  é a taxa de transição entre os dois estados  $i$  (bloqueado) e  $j$  (não bloqueado),  $r_i$  é o parâmetro da função densidade de probabilidades dos tempos de permanências no estado  $i$  e  $Q(i,j)$  é a probabilidade de ao encerrar um bloqueio  $i$  a cadeia transite em seguida para o estado não bloqueado  $j$ .

No caso do bloqueio-desbloqueio do nanoporo com apenas dois estados, toda vez que ele sair do estado bloqueado com certeza irá para não bloqueado e vice-versa. Portanto,  $Q(0,1)=Q(1,0)=1$  e como consequência disto  $K_{01} = r_0 \cdot Q(0,1) = r_0$  e  $K_{10} = r_1 \cdot Q(1,0) = r_1$  (CAMPOS DE OLIVEIRA et al., 2006).

Assim, quando um nanoporo tem apenas dois estados o conhecimento dos parâmetros das funções densidades de probabilidades dos estados bloqueado e não bloqueado permite determinar as constantes de transições entre estes dois estados. A simulação de um modelo Markoviano pode ser realizada através do programa QUB© (Fundação de Pesquisa da Universidade Estadual de Nova Iorque, EUA) (LUCHIAN, 2005; CAMPOS DE OLIVEIRA et al., 2006; TVEITO et al., 2016) de acordo com a figura 12.



**Figura 12.** Fluxograma para a modelagem Markoviana no QUB©. Através dos pacotes SKM, MIL e SIMU serão obtidas as taxas de transições e a série aleatória Markoviana simulada. Os tempos de permanência simulados são estudados em programas que possuem o algoritmo do DFA. Adaptado de: CAMPOS DE OLIVEIRA, R. A, 2003.

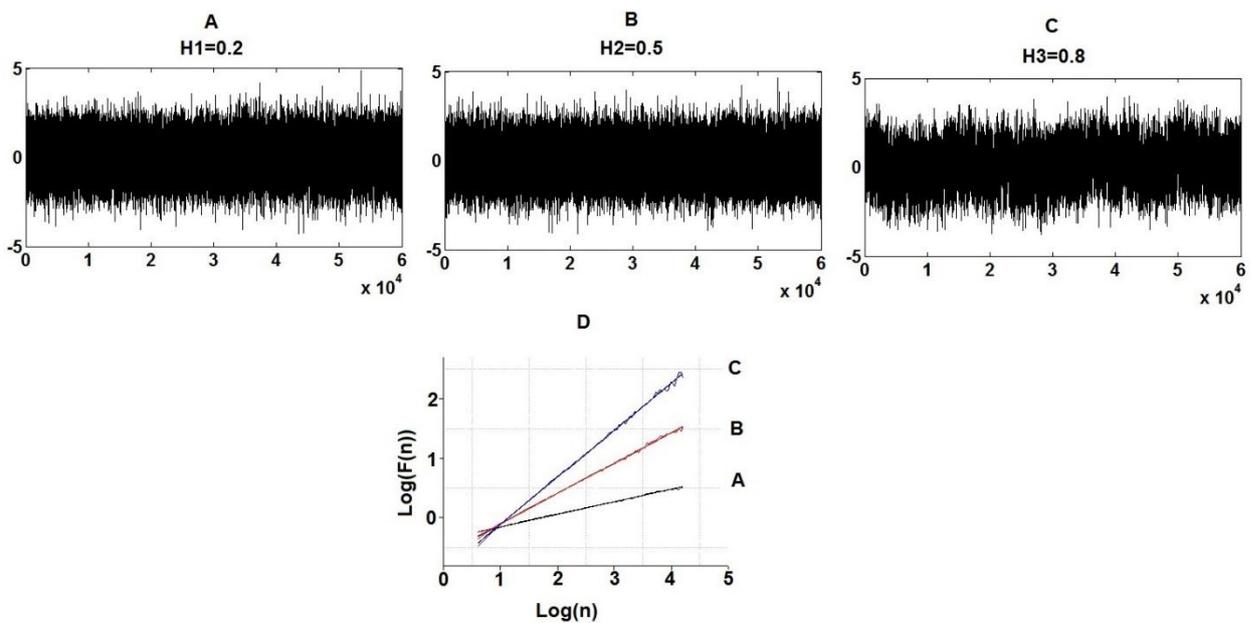
A descrição das transições entre os estados bloqueado e não bloqueado usando-se o modelo acima permite a obtenção de uma sequência dos tempos de permanências nos estados bloqueados e não bloqueados que geram uma série estocástica Markoviana. Portanto, se a sequência dos dados reais dos tempos de permanência nos estados bloqueados e não bloqueados não geram uma série estocástica Markoviana pode-se afirmar que o bloqueio não segue um processo estocástico de Markov e neste caso a série deve apresentar uma memória.

## 2.6 RUÍDO GAUSSIANO FRACIONÁRIO (fGn)

O Ruído Gaussiano Fracionário (fGn) é um processo estocástico estacionário, auto similar e de memória longa, proposto por Mandelbrot & Van Ness (1968) (NESS, 1968) e bastante explorado em modelagem de séries temporais (ELLIOTT; SIU, 2011). O fGn é derivado do movimento browniano fracionário (fBm) (LEDESMA; LIU; HERNÁNDEZ, 2007). O fGn é uma generalização do Movimento Browniano que permite a possibilidade de incrementos dependentes, estacionários e a presença de correlação de longo alcance. Foi introduzido por Kolmogorov (1940) e formalizado por Mandelbrot & Van Ness (1968) (HOTTA; PAPER, 2008).

O fGn fornece um modelo para incrementos estacionários de um processo auto similar parametrizado pelo Expoente de Hurst e classificado como um modelo simplificado da realidade, sendo diferente de um processo Markoviano (KOUTSOYIANNIS, 2002). Para a  $H > 0.5$  é dito que são positivamente

correlacionados ou apresentam uma memória persistente de longo alcance e  $H < 0.5$  estão negativamente correlacionados ou apresentam um comportamento antipersistente como pode ser observado na figura 13 (CARMONA; COUTIN; MONTSENY, 2003; LACASA et al., 2009) .



**Figura 13.**Séries geradas por fGn. A: $H_1$  com o valor de alfa igual a 0.2, B: $H_2=0.5$  e C: $H_3=0.8$ . D: alfa de DFA para as três séries testadas foram respectivamente: 0.20, 0.51 e 0.89.

Considerado um modelo útil para diversos fenômenos (BARTON , RICHARD J.; POOR, 1989), o fGn é uma generalização discreta do ruído branco e pode ser definido como o único processo gaussiano estacionário de média nula (FLANDRIN; RILLING; GONCALVES, 2004). Ele tem sido amplamente utilizado para modelagem e interpretação de dados fisiológicos e comportamentais e através dessa metodologia há a possibilidade de representação de processos estocásticos correlacionados com poderosas propriedades estatísticas. Com isso, é capaz de produzir séries temporais relevantes para diversas observações e em áreas de estudos variadas (DELIGNIÈRES, 2015).

## FERRAMENTAS DE ANÁLISES EM DINÂMICA NÃO-LINEAR

### 2.7 ANÁLISE DE FLUTUAÇÃO DESTENDENCIADA-DFA

Um conjunto de dados coletados em intervalos regulares de tempo são denominados de Séries Temporais. Elas distinguem-se de dados coletados aleatoriamente porque representam a evolução temporal da dinâmica de uma população ou processo. A ordenação linear dessas séries assume lugar de destaque na análise de dados, com um conjunto especializado de técnicas para estudo. É interessante verificar se numa série ou sequência de dados existe correlação, isto é, se há memória de longa duração no decorrer do tempo. Um processo apresenta memória de longa duração quando um evento passado tem efeito sobre eventos futuros (LIN, 2005; CAMPOS DE OLIVEIRA et al., 2006; LAN et al., 2008; LAN; XI; WAWRZKIEWICZ et al., 2012).

Em canais iônicos, o perfil de correlação foi visto através da análise de Hurst há alguns anos atrás (CAMPOS DE OLIVEIRA et al., 2006), mas a ideia de ser estudada a possibilidade ou não da memória em canais tem sido o foco de alguns trabalhos. Siwy e colaboradores (SIWY; AUSLOOS; IVANOVA, 2002) estudaram a série temporal de abertura e fechamento de canais BK para verificar o comportamento da correlação e neste caso, foram maiores que 0.5 e fortes correlações foram identificadas nos estados fechados. Lan et al. (2008) mostram a possibilidade de ser estudada a corrente de canais de  $K^+$  dependente de voltagem em neurônios ganglionares de ratos através de DFA. Em canais BK também foram estudados memória e *gates* (WAWRZKIEWICZ et al., 2012).

O método amplamente utilizado para identificar correlações de longo alcance, curto alcance e aleatoriedade em séries temporais é a Análise de Flutuação Destendenciada – DFA (PENG et al. 1994), considerado eficaz para medir a dependência de longo alcance para séries temporais não-estacionárias (CHIARUCCI; RUZZENENTI; LOFFREDO, 2014). Essa análise é uma técnica utilizada para proporcionar um parâmetro quantitativo simples para representar as propriedades de correlação de um sinal. A vantagem do DFA é que há a

possibilidade de eliminar sistematicamente as tendências de várias ordens causadas por efeitos externos e reduzir o ruído (WANG; YANG, 2012).

O DFA é um método sugerido para obter um expoente de escala mais confiável, quando o sinal tem propriedades não estacionárias, especialmente tendências diferentes, com duração desconhecida (MERT; AKAN, 2014). A vantagem deste método em relação aos convencionais é que ele também evita falsas detecções de correlações de longo alcance que são artefatos de tendência incorporada no sinal (HU et al., 2001). Apresenta aplicação em muitos campos, tais como: análises de sequências gênicas de DNA (PENG CK, BULDYREV SV, HAVLIN S, SIMONS M, STANLEY HE, 1994), canais iônicos (LAN et al., 2008), sinais cardíacos (MIESZKOWSKI, D. et al., 2016) , estudos climáticos (STOSIC, T. et al., 2016), atividade cerebral (MEISEL, C. et al., 2017) etc.

O método DFA baseia-se em análise de flutuações dos dados após a retirada das tendências da série temporal integrada. O procedimento é o seguinte: seja  $y(i)$  com  $i = 1, 2, \dots, N$ , a série temporal original, a série integrada é obtida usando a expressão:

$$y(k) = \sum_{i=1}^k (y(i) - M) \quad \text{(Eq.6)}$$

, onde  $M$  é a média dos valores de  $y(i)$  com  $i = 1, 2, \dots, N$  e  $k$  é um número inteiro.

A integração transforma a série original em um processo auto-similar. Em seguida, a série  $y(k)$  é dividida em intervalos de tamanho  $n$ . Para cada intervalo são feitos ajustes usando-se funções polinomiais, que podem ser: linear (DFA-1), quadrática (DFA-2), cúbica (DFA-3) ou de ordem  $m$  (DFA- $m$ ), para retirar a tendência da série em cada intervalo de tamanho  $n$ . A ordenada do segmento que representa a tendência no intervalo de tamanho  $n$  é denotada  $y_n(k)$ . Essa tendência é retirada subtraindo-se o valor do ajuste  $y_n(k)$  do valor correspondente da série integrada  $y(k)$ . A função de flutuação  $F(n)$  (que caracteriza o tamanho das flutuações para o tamanho  $n$  dos intervalos usados) é dada pela expressão:

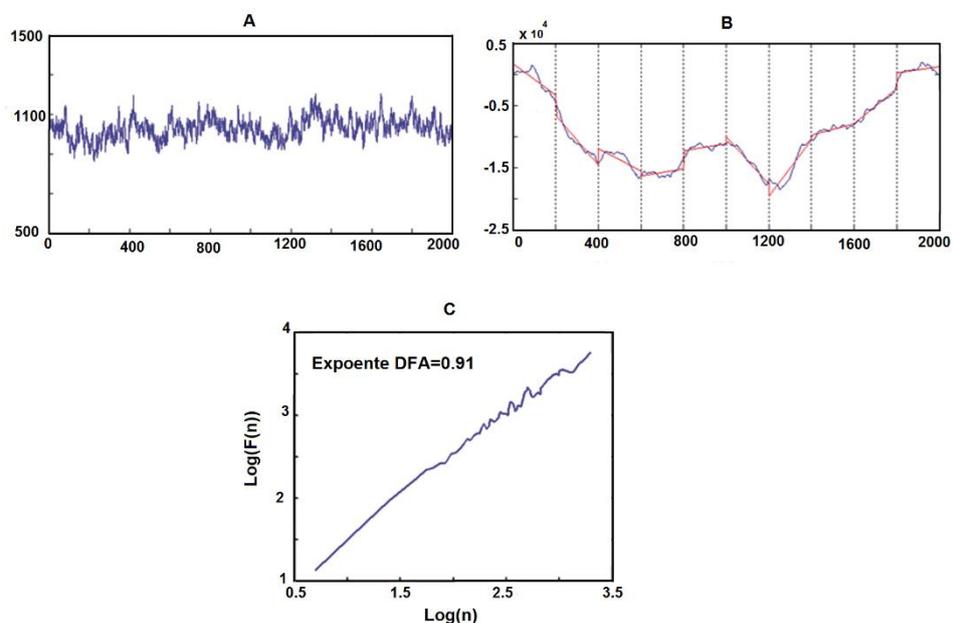
$$F(n) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{K=1}^N [y(k) - y_n(k)]^2} \quad \text{(Eq.7)}$$

O procedimento é repetido para vários tamanhos do intervalo  $n$  para poder determinar a relação entre a função de flutuação  $F(n)$  e o tamanho do intervalo  $n$ . Para processos fractais (auto-similares)  $F(n)$  aumenta com  $n$  pela lei de potência,

$$F(n) \propto n^\alpha$$

O expoente de auto-similaridade  $\alpha$  pode ser calculado usando o coeficiente angular da reta obtida por regressão linear do gráfico  $\log(F(n))$  versus  $\log(n)$  (PENG et. al., 1994). O parâmetro de auto-similaridade  $\alpha$  tem a interpretação seguinte:

- a) Para ruído branco (série não correlacionada)  $\alpha=0,5$ ;
- b) O valor  $0,5 < \alpha < 1$  indica as correlações de longo alcance persistentes;
- c) O caso  $\alpha = 1$  representa ruído d tipo  $1/f$ ;
- d) O valor  $0 < \alpha < 0,5$  indica as correlações de longo alcance anti-persistentes;
- e) Para  $\alpha > 1$  correlações ainda existem, mas não se comportam pela lei de potência. O caso especial  $\alpha = 1,5$  indica ruído Browniano que representa integração do ruído branco.



**Figura 14.** Procedimentos realizados para obtenção do coeficiente alfa de uma série temporal. Em A temos uma série original; B – Corresponde a integração da série A para a retirada das tendências; C - Resultado do alfa a partir do Log da função de flutuação versus o tamanho da janela. Adaptado de: LEE et al., 2011.

## 2.8 COMPLEXIDADE DE LEMPEL-ZIV

A complexidade de Lempel-Ziv é uma das metodologias mais utilizadas e de grande simplicidade para estudo de séries temporais, pois não necessita de nenhuma dimensão de imersão e a série é interpretada como um sinal binário. Foi proposta por Lempel e Ziv (1976) e tem como objetivo calcular a complexidade de um sinal, não requerendo longos segmentos de dados. Diversos estudos utilizam a ferramenta para análises de DNA (ALVES; NUNES, 2014), transmissão de informação do cérebro (XU et al., 1997), detecção de taquicardia ventricular, fibrilação (ZHANG et al., 1999) e análises *in silico* da atividade elétrica pancreática (NEVES et al., 2014).

O Lempel-Ziv é um método de cálculo de complexidade e avaliação da aleatoriedade em um sinal unidimensional ou sequências finitas. É considerada uma medida não paramétrica de complexidade que reflete o padrão da série (ABÁSOLO et al., 2006; GÓMEZ et al., 2016). Para calcular a CLZ é necessário transformar a série temporal em uma sequência binária que é gerada a partir da comparação de cada ponto de tempo da série com uma média de todos os pontos na série. Se o valor do ponto é maior do que a média, passa a ser representado por 1, se é menor do que a média será representado por 0. Deste modo obtém-se uma sequência formada por 1 e 0 (ABÁSOLO et al., 2006).

A complexidade de uma série pode ser medida da seguinte forma:

Seja uma série  $X = x(1), x(2), \dots, x(N)$  que é convertida numa sequência 0-1 gerando um  $P = s(1), s(2), \dots, s(N)$ , com  $s(i)$  definida por:

$$s_{(1)} = \begin{cases} 0, & \text{se } s_{(i)} < \text{média} \\ 1, & \text{se } s_{(i)} \geq \text{média} \end{cases}$$

Depois, esta cadeia de caracteres (P) é escaneado da esquerda para a direita e um contador de complexidade  $C(n)$  é aumentado em uma unidade cada vez que uma

nova subsequência de caracteres consecutivos é encontrada no processo de escaneamento. Finalmente,  $c(n)$  é normalizado de modo a obter uma medida de complexidade independente do comprimento da sequência. Para uma conversão binária, o limite superior de  $c(n)$  é dado por  $b(n) = n/\log_2(n)$ , e  $c(n)$  pode ser normalizado via  $b(n)$ :

$$CLZ = \frac{c(n)}{b(n)} \quad \text{(Eq.8)}$$

O resultado do cálculo da CLZ é um número que está entre 0 e 1. Quanto mais próximo de 1 for o resultado maior a CLZ e mais aleatório será o comportamento do sinal, quanto mais próximo o resultado for de 0 menor será a CLZ, indicando que a série tem maior auto-similaridade (ABOY et al., 2006; NEVES et al., 2014; GÓMEZ et al., 2016).

## 2.9 ENTROPIA APROXIMADA (ApEn)

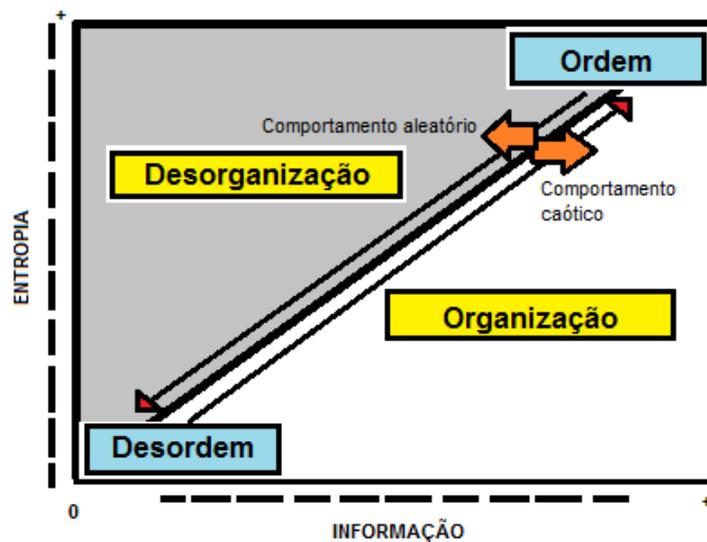
Nos últimos anos a entropia tem sido considerada uma poderosa ferramenta de análises de séries temporais, pois permite descrever a distribuição de probabilidade do possível estado de um sistema (ZANIN et al., 2012). A entropia consiste numa medida da desordem em sistemas físicos e tem sido usada como um indicador da complexidade de sinais não-lineares (BRISAUD, 2005; MORABITO et al., 2012; ZANIN et al., 2012).

Dentre as diversas variações de entropia temos a Entropia aproximada (ApEn) descrita por Pincus (PINCUS; GLADSTONE; EHRENKRANZ, 1991). A ApEn é uma estimativa estatística de regularidade (ou complexidade) de uma série temporal, ela quantifica a imprevisibilidade das flutuações em séries temporais e estima se os padrões atuais permanecem constantes ou não, comparando-os com as probabilidades de ocorrência desses padrões em futuros eventos (Figura 15). As sequências regulares de padrões têm valores ApEn menores (baixa entropia) enquanto de grandes valores de ApEn indicam sequências aleatórias com maior independência ou complexidade (alta entropia) (Figura 15) (CULLEN et al., 2010; CHEN; CHANG, 2013).

Na maioria dos casos, o valor de um ApEn é positivo ou zero, mas pode ser negativo por causa dos valores dos argumentos que são dados e a aleatoriedade da série (CULLEN et al., 2010; CHEN; CHANG, 2013). Esta ferramenta não substitui medições estatísticas como a média e o desvio padrão. É uma técnica que não exige grandes conjuntos de amostras, a metodologia possibilita trabalhar com séries pequenas e dados que apresentam ruídos (PINCUS, 1991; SOKUNBI et al., 2015).

ApEn é usada para análises de sinais estocásticos ou determinísticos, é uma medida estatística da regularidade (ou irregularidade) das flutuações desses sinais em diversos processos, incluindo os fisiológicos. Devido a esta propriedade, tem sido usada para determinar características de fenômenos biológicos principalmente na medicina, tais como: estudo de sequências genéticas (ANDRÉS; JOSÉ-LEONEL TORRES; BARRERA, 1998), eletrocardiograma (PINCUS, 2000), os padrões respiratórios (CALDIROLA et al., 2004), eletroencefalogramas (EEG) (KOSKINEN et al., 2006) , a variabilidade da frequência cardíaca (HU, XIAO; MILLER, CHAD; VESPA, PAUL; BERGSNEIDER, 2008), na telecomunicação para classificar e identificar dados de sinal complexos (SOKUNBI et al., 2015; WU et al., 2017). Sendo utilizado até como uma ferramenta para prever a iminência de surtos de dengue várias semanas antes da sua ocorrência (CHEN; CHANG, 2013).

O algoritmo resume uma série de tempo em um número não-negativo, onde os valores mais elevados representam sistemas mais irregulares, então, é dito ser um índice estatístico utilizado para quantificar a irregularidade de uma série de dados (SAMPAIO; NICOLETTI, 2016).



**Figura 15.** Interação entre a informação e a entropia, ordem e desordem e a relação com o comportamento aleatório e caótico. Adaptado de: DE GODOY, M.F. 2003.

O algoritmo do ApEn pode ser descrito como (PINCUS, 1991; ZACARIAS, H. M. J., 2015):

1. Dado  $A_N$ , uma série temporal com  $N$  amostras;
2. Determina-se os parâmetros de entrada  $m$  e  $r$  para o cálculo da entropia aproximada  $ApEn(m,r,A)$ ;

De acordo com Pincus,  $m$  pode ser admitido como 2 e  $r$  como 0,1 a 0,25 do desvio padrão dos dados escolhidos para o cálculo do ApEn (Pincus, 1991). O parâmetro  $m$  é o comprimento de um subconjunto de amostras de  $A_N$ , o  $r$  é o parâmetro denominado de critério de similaridade (CUKIERT; DIAMBRA, 2006; CHEN; CHANG, 2013).

Subsequência ou padrão de  $m$  amostras de  $A_N$  que se inicia no índice  $i$  é denominada de  $P_{m(i)}$  (Pincus, 1991). Sejam dois padrões  $P_{m(i)}$  e  $P_{m(j)}$ , que se iniciam, respectivamente nos índices  $i$  e  $j$ . Tais padrões são considerados similares caso o módulo da diferença entre quaisquer pares de amostras correspondentes for menor do que  $r$ , ou seja:

$$|A_{i+k} - A_{j+k}| < r, \text{ para } 0 \leq k \leq m. \quad (\text{Eq.9})$$

Considere  $P_m$  o conjunto de todos os padrões de comprimentos  $m$  de  $A_N$ , pode-se então definir a relação:

$$C_{i,m}(r) = \frac{n_{i,m}(r)}{N-m+1} \quad (\text{Eq.10})$$

Em que  $n_{i,m}(r)$  é o número de padrões em  $P_m$  similares a  $P_{m(i)}$ , de acordo com o critério de similaridade  $r$ . Calcula-se, então,  $C_{i,m}(r)$  para cada padrão pertencente a  $P_m$ . Ao final, calcula-se também a média de todos os  $C_{i,m}(r)$ , denominada de  $C_m(r)$ . Esta média representa o nível de predominância de padrões similares de tamanho  $m$  em  $A_n$ . Define-se a entropia aproximada da série  $A_n$  para padrões de comprimento  $m$  e critério de similaridade  $r$ , por:

$$ApEn(m, r, A_n) = \ln \frac{C_m(r)}{C_{m+1}(r)} \quad (\text{Eq.11})$$

Portanto, a  $ApEn$  é o logaritmo natural da razão entre o nível de predominância de padrões repetidos de tamanho  $m$  e de tamanho  $m+1$ . Grandes valores de  $ApEn$  corresponde a processos randômicos ou irregularidade da série e pequenos valores sinais determinístico (Figura 15) (SAMPAIO; NICOLETTI, 2016; WU et al., 2017).

## 2.10 GRÁFICO DE RECORRÊNCIA E ANÁLISE DE QUANTIFICAÇÃO DE RECORRÊNCIA

Recorrência, estudada inicialmente por Poincaré, consiste numa propriedade fundamental de muitos sistemas dinâmicos, ou seja, de vários processos da natureza. A recorrência é definida como sendo o retorno da trajetória para um local já visitado antes. É uma propriedade fundamental de sistemas dinâmicos que pode ser caracterizada através do espaço de fase (MARWAN et al., 2007).

O gráfico para estudo da recorrência (GR) foi introduzido por Eckmann et al. (1987) para a análise de sistemas dinâmicos (ECKMANN; KAMPHORST; RUELLE, 1987) e consiste em uma poderosa e moderna ferramenta para quantificar padrões e

descobrir propriedades estatísticas ocultas que caracterizam os sistemas complexos (ROHDE et al., 2008; XU; SHANG; LIN, 2017). Os GR's são visualmente atraentes e formados por estruturas de pequena escala como pontos e linhas e de larga escala, as texturas (Figura 10).

Para obtenção do gráfico de recorrência não há necessidade de série temporal longa e algoritmos demorados, pois o gráfico é capaz de analisar qualquer série temporal, seja com correlação de curto, longo alcance ou sem correlação (ZARGHAMI; SHARIFI; MOSTOUFI, 2017).

Os GR's têm crescentes aplicações em diversas áreas, tais como: sistema cardiovascular (ZBILUT; THOMASSON; WEBBER, 2002; OUYANG et al., 2008;-U. RAJENDRA ACHARYA;VINITHA SREE; ALVIN, 2011; YAN, J. et al. 2016), efeito de polímeros em fluxo óleo-água (YANG, Q. Y. 2017), estudos climáticos (OGUNJO, S. T., ADEDIJI, A. T., & DADA, J. B. 2017), estudo de dinâmica de fluidos e plasma (WANG et al., 2010) e a detecção dos estágios do sono (TERRILL et al., 2010).

O gráfico de recorrência é uma ferramenta que mostra os tempos em que uma trajetória do espaço de fase do sistema dinâmico visita aproximadamente a mesma área no espaço de fase, através dos eixos horizontal e vertical. Ou seja, é uma matriz bidimensional, quadrada, na qual seus eixos representam a evolução dos estados do sistema dinâmico (ECKMANN; KAMPHORST; RUELLE, 1987). Eles têm uma construção bastante simples: é baseada em um quadrado no qual tanto o eixo x quanto o eixo y contém os elementos da série temporal. A partir disso e de acordo com a dimensão e distâncias (raio) é verificado se há ou não recorrência de valores (BAPTISTA, M. A., 2011). O GR é definido pela seguinte equação (MARWAN et al., 2007):

$$\bar{R}_{i,j}^{m,\varepsilon} = \theta(\varepsilon - \|\bar{x}_i - \bar{x}_j\|), \bar{x}_i \in \mathcal{R}^m, i, j = 1, \dots, N. \quad (\text{Eq.12})$$

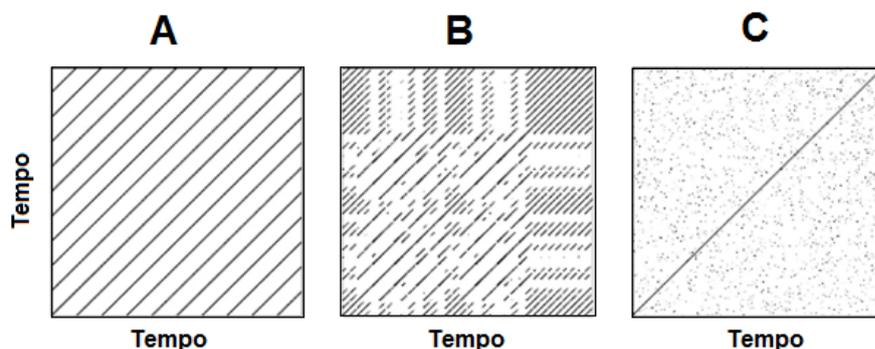
Onde  $\bar{x}_i$  representa cada um dos N estados formados do sistema, que são obtidos por meio do método de atrasos temporais.  $\varepsilon$  é o raio de vizinhança,  $\theta(\cdot)$  função de Heaviside (ex.  $\theta(x)x < 0$ , e  $\theta(x) = 1$ ) a qual mapeia os pontos recorrentes dentro do gráfico e  $\|\cdot\|$  é a norma.

O gráfico de recorrência sempre possui uma linha diagonal principal preta, a *linha de identidade (LOI)*. Além disso, o GR é simétrico por definição em relação à diagonal principal, por exemplo:  $R_{i,j} \equiv R_{j,i}$ . É também constituído por pontos e

linhas únicas paralelas a diagonal média ou verticais e horizontais (Figura 16;17). Como um GR é simétrico, linhas horizontais e verticais correspondem umas às outras e, portanto, apenas são consideradas linhas verticais. As linhas correspondem a um comportamento típico da trajetória do espaço de fase: as linhas diagonais representam segmentos da trajetória do espaço de fase que são paralelos por algum tempo, as linhas verticais representam segmentos que permanecem na mesma região do espaço de fase por algum tempo.

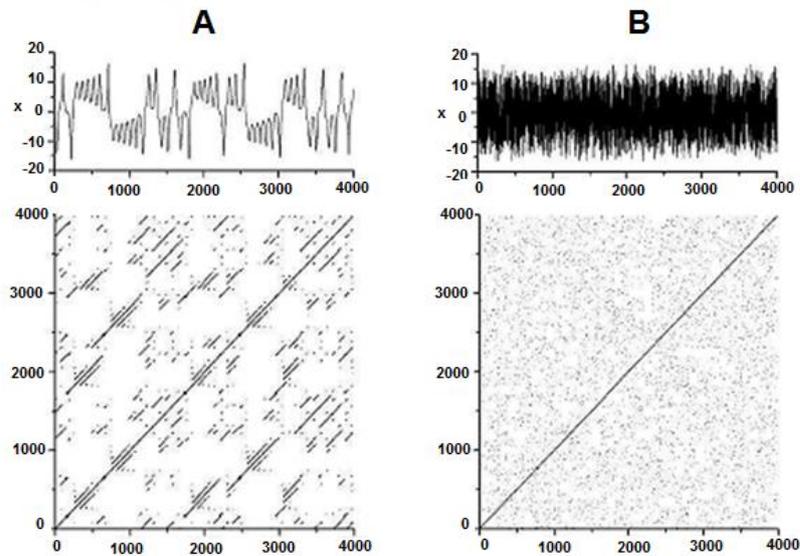
A linha diagonal ocorre quando um segmento da trajetória segue paralelo a outro segmento, ou seja, a trajetória visita a mesma região de espaço a fase em momentos diferentes. Linhas diagonais paralelas à linha principal representam trajetórias paralelas seguindo uma mesma evolução temporal. As estruturas diagonais perpendiculares à linha diagonal principal representam um seguimento de evolução contrária. A linha vertical (horizontal) caracteriza um período de tempo em que um estado não muda ou muda muito lentamente (MELLO, G.J. et al. 2013).

O GR é obtido pelo plot da matriz de recorrência e usando diferentes cores , por exemplo, plotando um ponto preto para as coordenadas (i,j), se  $R_{i,j} \equiv 1$  e um ponto branco se  $R_{i,j} \equiv 0$ . Ambos os eixos do RP são representam o tempo (Figura 16;17). (ECKMANN; KAMPHORST; RUELLE, 1987).



**Figura 16.**Gráfico de recorrência: A. Movimento periódico; B. Sistema caótico de Rossler; C. Ruído branco. Adaptado de: MARWAN et al., 2007.

As figuras são bastantes peculiares (Figura 17), séries diferentes geram ***padrões particulares ou tipologia.***



**Figura 17.**GR para o atrator de Lorenz: A. Série temporal a componente x do atrator; B. Idem A, porém a série temporal embaralhada. Adaptado de: GUILHERME, A.P., 2008.

Os gráficos de recorrências podem ser classificados de acordo com a série e suas trajetórias ou tipologias da seguinte forma (MARWAN et al., 2007):

Tipos de GR	Caracterização
<b>Homogêneos</b>	Típicos de sistemas estacionários onde os tempos de relaxamento são muito curtos, ou seja, a série gerada varia rapidamente, porém de forma estacionária. Exemplo: Ruído branco (Fig. 18: (a))
<b>De sistemas periódicos ou quase-periódicos</b>	São gerados GR bastante característicos, há predominância de linhas diagonais paralelas a diagonal principal ( $i=j$ ). (Fig. 18: (b))
	São sistemas dinâmicos conhecidos, por exemplo, os não estacionários. Resultando

---

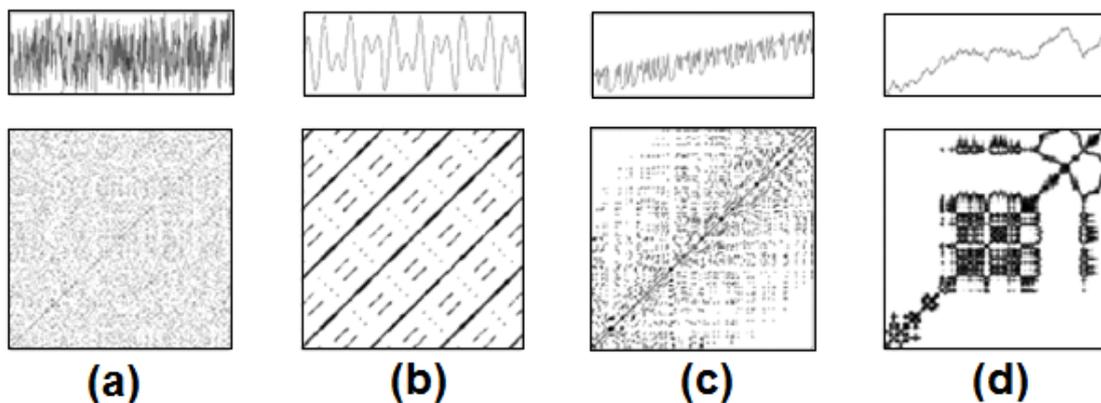
**Gerados por sistemas com lentas variações de parâmetro (s)**

em GR com um clareamento nas extremidades distantes (mudança lenta ilumina o canto superior esquerdo e inferior direito do GR. Mudanças abruptas no sistema causam áreas brancas) da diagonal principal, não ocorrendo recorrência. (Fig. 18: (c))

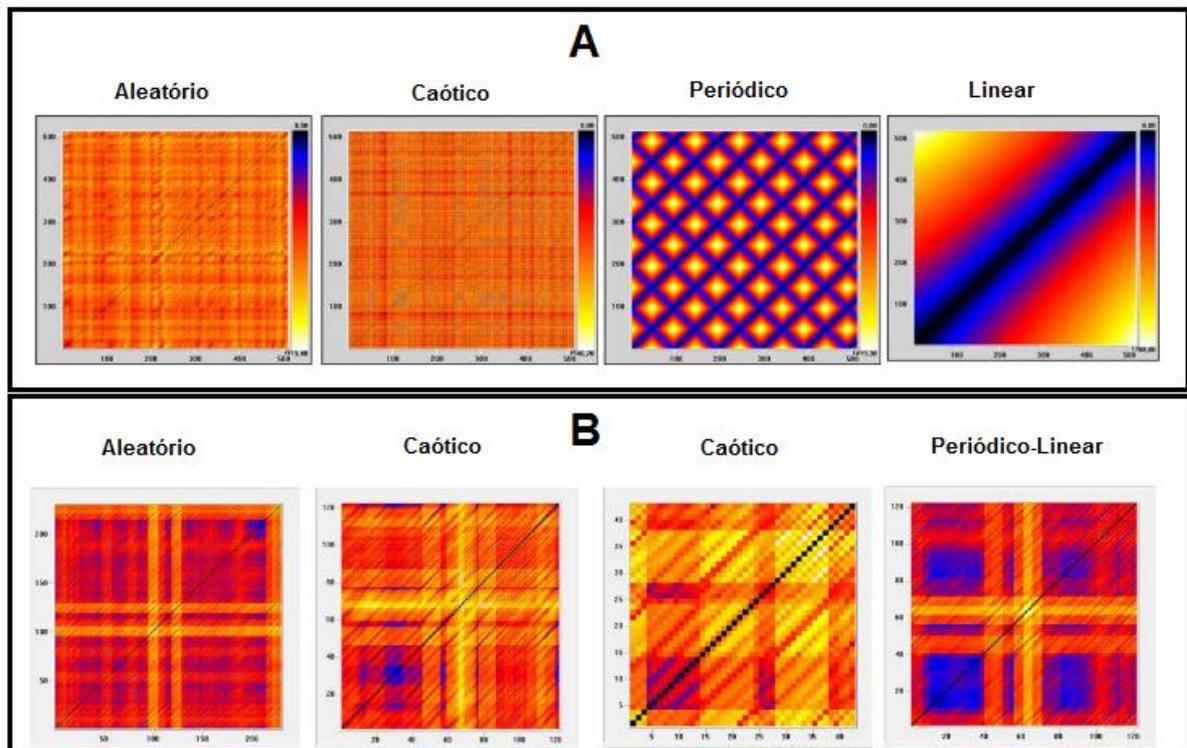
---

**De sistemas que permitem variações abruptas na dinâmica**

Gera-se grandes regiões brancas ou interrompidas no gráfico. Ex: séries temporais geradas por movimento browniano. (Fig. 18: (d))



**Figura 18.**As séries temporais seguidas pelos respectivos GR. (a) GR homogêneo; (b) GR gerado por sistemas periódicos; (c) GR de sistemas com variação no(s) parâmetro(s); (d) GR de uma série temporal altamente não-estacionária. Adaptado: de Marwan et al., 2007.



**Figura 19.** Exemplos de GR de séries temporais diversas. A. GR de séries temporais originadas de modelos matemáticos; B. GR de morbidade. Adaptado de: A: BAPTISTA, M. A., 2011; B: ROCHA, S.A., 2015.

As cores "quentes" (amarelo, vermelho e laranja) podem ser associadas a pequenas distâncias entre os vetores, enquanto as cores "frias" (azul, preto) podem ser usadas para mostrar grandes distâncias. Desta forma, pode-se visualizar e estudar o movimento das trajetórias do sistema e inferir algumas características do sistema dinâmico que gerou as séries temporais (Figura 19) (ROCHA, S.A., 2015).

A análise visual dos gráficos de recorrência é subjetiva e pode levar a diferentes interpretações. Com o objetivo de trazer mais robustez às análises, quantificando estruturas presentes nos gráficos de recorrência, Zbilut e Webber (1992) e mais recentemente Marwan (2007) elaboraram a Análise de Quantificação de Recorrência (AQR) ou *Recurrence Quantitative Analysis (RQA)*.

A AQR é baseada nos seguintes parâmetros:

1. **Pontos isolados de recorrência:** são os elementos onde  $R_{i,j} \equiv 1$ ;

2. **Linhas diagonais:** Significam que segmentos do atrator seguem caminhos aproximadamente paralelos, ou seja, estados em tempos diferentes estão evoluindo de maneira muito semelhante;
3. **Linhas verticais ou horizontais:** os tamanhos destas linhas representam o intervalo de tempo no qual os estados variam ou não muito lentamente.

Dentre os parâmetros que podem ser quantificados pela AQR, destacamos em nosso estudo o Determinismo (DET).

**Determinismo:** Consiste na razão entre o número de pontos pertencentes a diagonais e o número total de pontos recorrentes. Logo, quanto mais e maiores forem as diagonais de um GR, mais pares de trechos do atrator se comportam de maneira semelhante, mostrando que uma previsibilidade maior é possível. Séries temporais com comportamento estocástico não apresentam linhas diagonais ou apresentam linhas curtas. Já um evento determinístico apresenta linhas diagonais longas e menos pontos de recorrência isolados e simples. Quanto maior o DET%, mais previsível será o sistema. Para sistemas com comportamentos periódicos a previsibilidade é 1. Séries completamente estocásticas tendem a gerar GR homogêneos, quase sem diagonais e com valor de DET baixo (MARWAN et al., 2007). O DET é dado pela função:

$$DET = \frac{\sum_{l=l_{min}}^N lP(l)}{\sum_{i,j}^N lP(l)} \quad (\text{Eq.13})$$

Onde  $l$  é o comprimento da linha diagonal,  $N$  a dimensão do gráfico de recorrência,  $P(l)$  a probabilidade de existência de linhas diagonais com comprimento  $l$  e  $l_{min}$  é o menor tamanho para uma linha ser considerada uma diagonal (XU; SHANG; LIN, 2017).



# 3. OBJETIVOS

## 3 OBJETIVOS

### 3.10 OBJETIVO GERAL

Analisar se a translocação de polímeros neutros em nanoporos é um processo estocástico Markoviano ou com memória.

### 3.11 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar técnicas de dinâmica não linear, tais como a Análise de Flutuação Destendenciada, Complexidade de Lempel-Ziv, Entropia Aproximada, Plot de recorrência e Análise de Quantificação de Recorrência para investigar a cinética do bloqueio e desbloqueio pelo PEG1294 no interior do nanoporo;

- Propor um modelo cinético para nanoporos de alfa-Hemolisina através da Modelagem Markoviana.

#### 4. REFERÊNCIAS

ABÁSULO, D. et al. Analysis of EEG background activity in Alzheimer's disease patients with Lempel-Ziv complexity and central tendency measure. **Medical Engineering and Physics**, v. 28, n. 4, p. 315–322, 2006.

ABOY, M. et al. Interpretation of the Lempel-Ziv complexity measure in the context of biomedical signal analysis. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 53, n. 11, p. 2282–2288, 2006.

ACTIS, P.; VILOZNY, B.; POURMAND, N. Immunoassays Using Artificial Nanopores. **Advances in immunoassay technology**. InTech, p. 125-140, 2012.

AMBJÖRNSSON, T. et al. Charged polymer membrane translocation. **Journal of Chemical Physics**, v. 117, n. 8, p. 4063–4073, 2002.

ANDRÉS, J. C.; JOSÉ-LEONEL TORRES; BARRERA, J. A Statistical Feature of

Genetic Sequences. **Biometrical journal**, v. 40, p. 855–863, 1998.

ARIF, S. et al. Biosensors and Bioelectronics Blueprint of quartz crystal microbalance biosensor for early detection of breast cancer through salivary autoantibodies against ATP6AP1. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 65, p. 62–70, 2015.

ASTIER, Y.; BAYLEY, H.; HOWORKA, S. Protein components for nanodevices. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 6, p. 576–584, 2005.

BARTON, RICHARD J.; POOR, V. Fast Gaussian Noise Generator. **IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing**, v. 37, n. 10, p. 1593–1597, 1989.

BAPTISTA, M. A. **Gráficos de recorrência e de poincaré na análise da quantidade de internações por diferentes grupos nosológicos, ocorridas ao longo de uma década, em um hospital de ensino**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências de Saúde)- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto.

BAYLEY, H.; MARTIN, C. R. Resistive-pulse sensing-from microbes to molecules. **Chemical reviews**, v. 100, n. 7, p. 2575–2594, 2000.

BEZRUKOV, S. M.; KASIANOWICZ, J. J. Current noise reveals protonation kinetics and number of ionizable sites in an open protein ion channel. **Physical Review Letters**, v. 70, n. 15, p. 2352–2355, 1993.

BRAHA, O. et al. Designed protein pores as components for biosensors. **Chemistry & biology**, v. 4, n. 7, p. 497–505, 1997.

BRAHA, O. Simultaneous stochastic sensing of divalent metal ions. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 9, p. 1005–1007, 2000.

BRISAUD, J. B. The meanings of entropy. **Entropy**, v. 7, n. 1, p. 68–96, 2005.

BRITO, A. M. S. **Estudo da interação de ácidos nucleicos como nanoporo adaptado da  $\alpha$ -hemolisina**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

CALDIROLA, D. et al. Approximate Entropy of Respiratory Patterns in Panic Disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 161, n. 1, p. 79–87, 2004.

CAMPOS DE OLIVEIRA, R. A. et al. Long-term correlation in single calcium-activated potassium channel kinetics. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 364, p. 13–22, 2006.

CAMPOS DE OLIVEIRA, R. A. (2003). Memória em cinética de canais para potássio ativados por cálcio em células de Leydig. Dissertação de Mestrado em Biofísica e Radiologia. Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

CARMONA, P.; COUTIN, L.; MONTSENY, G. Stochastic integration with respect to fractional Brownian motion. **Annales de l'institut Henri Poincaré (B) Probability and Statistics**, v. 39, n. 1, p. 27–68, 2003.

- CHANDRAMOULI, B. et al. Introducing an artificial photo-switch into a biological pore: A model study of an engineered  $\alpha$ -hemolysin. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 4, p. 689–697, 2016.
- CHELEY, S.; GU, L. Q.; BAYLEY, H. Stochastic sensing of nanomolar inositol 1,4,5-trisphosphate with an engineered pore. **Chemistry and Biology**, v. 9, n. 7, p. 829–838, 2002.
- CHEN, C. C.; CHANG, H. C. Predicting dengue outbreaks using approximate entropy algorithm and pattern recognition. **Journal of Infection**, v. 67, n. 1, p. 65–71, 2013.
- CHIARUCCI, R.; RUZZENENTI, F.; LOFFREDO, M. I. Detecting spatial homogeneity in the World Trade Web with Detrended Fluctuation Analysis. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 401, p. 1–7, 2014.
- COLQUHOUN, D.; HAWKES, A.G. On the Stochastic Properties of Single Ion Channels. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 211, n. 1183, p. 205–235, 1981.
- COLQUHOUN, D.; HAWKES, A. G. On the Stochastic Properties of Bursts of Single Ion Channel Openings and of Clusters of Bursts. p. 1–59, 1982.
- CORNELL, B. A et al. A biosensor that uses ion-channel switches. **Nature**, v. 387, n. 6633, p. 580–583, 1997.
- COULTER, W. H. **Means for counting particles suspended in a fluid**, U.S. Patent n. 2,656,508, 20 out. 1953.
- CULLEN, J. et al. Measurement of cardiac synchrony using Approximate Entropy applied to nuclear medicine scans. **Biomedical Signal Processing and Control**, v. 5, n. 1, p. 32–36, 2010.
- DA COSTA, J. P. et al. Bionanoconjugation for Proteomics applications - An overview. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 5, p. 952–970, 2014.
- DE GODOY, M.F. **Teoria do Caos Aplicada à Medicina**. 2003. Tese (Doutorado para Livre Docência em Cardiologia), FAMERP, São José do Rio Preto.
- DEBLOIS, R. W.; BEAN, C. P. Counting and sizing of submicron particles by the resistive pulse technique. **Review of Scientific Instruments**, v. 41, n. 7, p. 909–916, 1970.
- DELCOUR, A. H. Electrophysiology of bacteria. **Annual review of microbiology**, v. 67, p. 179–97, 2013.
- DELIGNIÈRES, D. Correlation Properties of ( Discrete ) Fractional Gaussian Noise and Fractional Brownian Motion. **Mathematical Problems in Engineering**, v. 2015, 2015.
- DI MARINO, D. et al. All-Atom Molecular Dynamics Simulation of Protein Translocation through an  $\alpha$ -Hemolysin Nanopore. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 6, n. 15, p. 2963–2968, 2015.

DING, K.-J. et al. Progress of Research on Nanopore-macromolecule Detection. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 280–285, 2010.

ECKMANN, J.-P.; KAMPHORST, S. O.; RUELLE, D. Recurrence Plots of Dynamical Systems. **Europhysics Letters (EPL)**, v. 4, n. 9, p. 973–977, 1987.

ELLIOTT, R. J.; SIU, T. K. Control of discrete-time HMM partially observed under fractional Gaussian noises. **Systems & Control Letters**, v. 60, n. 5, p. 350–355, 2011.

FENG, Y. et al. Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 4–16, 2015.

FILHO, A. P.; CUKIERT, A.; DIAMBRA, L. Peri-ictal complexity loss as determined by approximate entropy analysis in the electrocorticogram obtained from chronic subdural recordings in patients with refractory temporal lobe epilepsy. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, n. 4, p. 191–199, 2006.

FLANDRIN, P.; RILLING, G.; GONCALVES, P. Empirical mode decomposition as a filter bank. **IEEE Signal Processing Letters**, v. 11, n. 2, p. 112–114, 2004.

GARCÍA, S. R. et al. Characterization of ground motions using recurrence plots. **Geofísica Internacional**, v. 52, n. 3, p. 209–227, 2013.

GUILHERME, A. P. **Análise do índice bovespa pelo método dos gráficos de recorrência**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

GOLDBERGER, A. L. et al. Fractal dynamics in physiology: Alterations with disease and aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. Supplement 1, p. 2466–2472, 2002.

GÓMEZ, C. et al. Characterization of EEG patterns in brain-injured subjects and controls after a Snoezelen® intervention. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 136, p. 1–9, 2016.

GU, L. Q.; SHIM, J. W. Single molecule sensing by nanopores and nanopore devices. **Analyst**, v. 135, n. 3, p. 441–451, 2010.

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

GURNEV, P. A. et al. Alpha-synuclein lipid-dependent membrane binding and translocation through the  $\alpha$ -hemolysin channel. **Biophysical Journal**, v. 106, n. 3, p. 556–565, 2014.

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

GYURCSÁNYI, R. E. Chemically-modified nanopores for sensing. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 627–639, 2008.

HE, D.; MARLES-WRIGHT, J. Ferritin family proteins and their use in

bionanotechnology. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 651–657, 2015.

HELLINGA, H. W.; MARVIN, J. S. Protein engineering and the development of generic biosensors. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 183–189, 1998.

HEYSE, S. et al. Emerging techniques for investigating molecular interactions at lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes**, v. 1376, n. 3, p. 319–338, 1998.

HOTTA, L. K.; PAPER, I. W. Inferência indireta em modelos fracionários de taxas de juros de curto prazo. **XXX Meeting of the Brazilian Econometric Society**, 2008.

HOWORKA, S.; SIWY, Z. Nanopore analytics: sensing of single molecules. **Chemical Society reviews**, v. 38, n. 8, p. 2360–2384, 2009.

HU, XIAO; MILLER, CHAD; VESPA, PAUL; BERGSNEIDER, M. Adaptive computation of approximate entropy and its application in integrative analysis of irregularity of heart rate variability and intracranial pressure signals. **Computer**, v. 144, n. 5, p. 724–732, 2008.

HU, K. et al. Effect of trends on detrended fluctuation analysis. **Physical Review E**, v. 64, 2001.

ITO, T.; SUN, L.; CROOKS, R. M. Simultaneous Determination of the Size and Surface Charge of Individual Nanoparticles Using a Carbon Nanotube-Based Coulter Counter. v. 75, n. 10, p. 2399–2406, 2003.

KANG, X. F. et al. Single protein pores containing molecular adapters at high temperatures. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 10, p. 1495–1499, 2005.

KASIANOWICZ, J. J. et al. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 13770–3, 1996.

KASIANOWICZ, J. J. et al. Simultaneous multianalyte detection with a nanometer-scale pore. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 10, p. 2268–2272, 2001.

KIM, J. et al. Detecting single-abasic residues within a DNA strand immobilized in a biological nanopore using an integrated CMOS sensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 177, p. 1075–1082, 2013.

KIRSCH, J. et al. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 22, p. 8733, 2013.

KOCER, A.; TAUKE, L.; DÉJARDIN, P. Nanopore sensors: From hybrid to abiotic systems. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 38, n. 1, p. 1–10, 2012.

KOSKINEN, M. et al. Monotonicity of approximate entropy during transition from awareness to unresponsiveness due to propofol anesthetic induction. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 53, n. 4, p. 669–675, 2006.

KOUTSOYIANNIS, D. The Hurst phenomenon and fractional Gaussian noise made

easy. **Hydrological Sciences Journal**, v. 47, n. 4, p. 573–595, 2002.

KRASILNIKOV, O. V.; RODRIGUES, C. G.; BEZRUKOV, S. M. Single polymer molecules in a protein nanopore in the limit of a strong polymer-pore attraction. **Physical Review Letters**, v. 97, n. 1, p. 1–4, 2006.

KUMAR, H.; RANI, R. Development of biosensors for the detection of biological warfare agents: Its issues and challenges. **Science Progress**, v. 96, n. 3, p. 294–308, 2013.

LACASA, L. et al. The visibility graph: A new method for estimating the Hurst exponent of fractional Brownian motion. **EPL (Europhysics Letters)**, v. 86, n. 3, p. 30001, 2009.

LAN, T.H. et al. Detrended fluctuation analysis as a statistical method to study ion single channel signal. **Cell biology international**, v. 32, n. 2, p. 247–252, 2008.

LAN, T. H.; XI, H.; LIN, J. R. Correlation character of ionic current fluctuations: Analysis of ion current through a voltage-dependent potassium single channel. **Biophysical Chemistry**, v. 117, n. 3, p. 191–197, 2005.

LEDESMA, S.; LIU, D.; HERNÁNDEZ, D. Two approximation methods to synthesize the power spectrum of Fractional Gaussian Noise. **Computational Statistics and Data Analysis**, v. 52, n. 2, p. 1047–1062, 2007.

LEE, J.; SOHN, K.; HYEON, T. Fabrication of novel mesocellular carbon foams with uniform ultralarge mesopores. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 21, p. 5146–5147, 2001.

LEE, S. et al. Detrended fluctuation analysis of membrane flickering in discocyte and spherocyte red blood cells using quantitative phase microscopy. **Journal of biomedical optics**, v. 16, p. 76009-76009–6, 2011.

LEMAY, S. G. Nanopore-based biosensors: The interface between ionics and electronics. **ACS Nano**, v. 3, n. 4, p. 775–779, 2009.

LEMPEL, A.; ZIV, J. On the complexity of finite sequences. **IEEE Transactions Information Theory**, v. 22, p. 75–81, 1976.

LETIZIA, E.; FABIO, B.; MAURO, C. Electroosmotic flow through an  $\alpha$ -hemolysin nanopore. **Microfluidics and Nanofluidics**, p. 1–9, 2017.

LI, J. et al. Ion-beam sculpting at nanometre length scales. **Nature**, v. 412, n. 6843, p. 166–169, 2001.

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.

LUCHIAN, T. An automated method for generating analogic signals that embody the Markov kinetics of model ionic channels. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 147, n. 1, p. 8–14, 2005.

MAITRA, R.; KIM, J.; DUNBAR, W. B. Recent advances in nanopore sequencing. **Electrophoresis**, v. 33, n. 33, p. 1–11, 2012.

MAJD, S. et al. Applications of biological pores in nanomedicine, sensing, and nanoelectronics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 439–476, 2010.

MARTINEZ, D. S. T. et al. Exploring the use of biosurfactants from *Bacillus subtilis* in bionanotechnology: A potential dispersing agent for carbon nanotube ecotoxicological studies. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 7, p. 1162–1168, 2014.

MEISEL, C. et al. Decline of long-range temporal correlations in the human brain during sustained wakefulness. **arXiv preprint arXiv:1706.03835**, 2017.

MIESZKOWSKI, D. et al. Asymmetric detrended fluctuation analysis reveals asymmetry in the RR intervals time series. **Journal of Applied Mathematics and Computational Mechanics**, v. 15, n. 1, p. 99–106, 2016.

MARWAN, N. et al. Recurrence plots for the analysis of complex systems. **Physics Reports**, v. 438, n. 5–6, p. 237–329, 2007.

MELLO, G. J. et al. Análise da complexidade do saldo de radiação em uma floresta sazonalmente inundada no norte do pantanal. **Ciência e Natura**, v. 35, n. 1, 2013.

MERT, A.; AKAN, A. Detrended fluctuation thresholding for empirical mode decomposition based denoising. **Digital Signal Processing**, v. 32, p. 48–56, 2014.

MERZLYAK, P. G. et al. Polymeric Nonelectrolytes to Probe Pore Geometry: Application to the  $\alpha$ -Toxin Transmembrane Channel. v. 77, n. 6, p. 3023–3033, 1999.

MERZLYAK, P. G. et al. Conductance and ion selectivity of a mesoscopic protein nanopore probed with cysteine scanning mutagenesis. **Biophysical journal**, v. 89, n. 5, p. 3059–70, 2005.

MOMOTENKO, D. ET AL. Ion current rectification and rectification inversion in conical nanopores: a perm-selective viewwz. **Phys.Chem.Chem.Phys.**, v. 13, p. 5430–5440, 2011.

MORABITO, F. C. et al. Multivariate multi-scale permutation entropy for complexity analysis of Alzheimer's disease EEG. **Entropy**, v. 14, n. 7, p. 1186–1202, 2012.

MOVILEANU, L. Interrogating single proteins through nanopores: challenges and opportunities. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 333–341, 2009.

MOVILEANU, L.; BAYLEY, H. Partitioning of a polymer into a nanoscopic protein pore obeys a simple scaling law. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 18, p. 10137–41, 2001.

MURMU, T.; ADHIKARI, S. Nonlocal frequency analysis of nanoscale biosensors. **Sensors and Actuators, A: Physical**, v. 173, n. 1, p. 41–48, 2012.

NESS, B. B. MANDELROT. A. J. W. VAN. Fractional Brownian Motions, Fractional Noises and Applications. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n.

9, p. 422–437, 1968.

NESTOROVICH, E. M.; ROSTOVTSEVA, T. K.; BEZRUKOV, S. M. Residue ionization and ion transport through OmpF channels. **Biophysical journal**, v. 85, n. 6, p. 3718–29, 2003.

NEVES, G. F. et al. 60 Hz Electric Field Changes the Membrane Potential During Burst Phase in Pancreatic  $\beta$ -Cells: In Silico Analysis. **Acta Biotheoretica**, v. 62, n. 2, p. 133–143, 2014.

NUNES, C. A. J. **Algoritmo de Lempel-Ziv aplicado à classificação quantitativa de autômatos celulares**. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

OGUNJO, S. T., ADEDIJI, A. T., & DADA, J. B. Investigating chaotic features in solar radiation over a tropical station using recurrence quantification analysis. **Theoretical and Applied Climatology**, v. 127, n. 1-2, p. 421-427, 2017.

OUYANG, G. et al. Using recurrence plot for determinism analysis of EEG recordings in genetic absence epilepsy rats. **Clinical neurophysiology**, v. 119, p. 1747–1755, 2008.

PANCHAL, R. G. et al. Pore-forming proteins and their application in biotechnology. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 99–115, 2002.

PENG CK, BULDYREV SV, HAVLIN S, SIMONS M, STANLEY HE, G. A. Mosaic organization of DNA nucleotides. **Physical review e**, v.49,n.2,p.1685,1994.

PINCUS, S. M. Approximate entropy as a measure of system complexity. **Mathematics**, v. 88, n. March, p. 2297–2301, 1991.

PINCUS, S. M. Approximate entropy in cardiology. **Herzschr Elektrophys**, v. 11, p. 139–150, 2000.

PINCUS, S. M.; GLADSTONE, I. M.; EHRENKRANZ, R. A. A regularity statistic for medical data analysis. **Journal of Clinical Monitoring and Computing**, v. 7, n. 4, p. 335–345, 1991.

REINER, J. E. et al. Disease detection and management via single nanopore-based sensors. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 12, p. 6431–6451, 2012.

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

RINCON-RESTREPO, M. et al. Controlled translocation of individual DNA molecules through protein nanopores with engineered molecular brakes. **Nano Letters**, v. 11, n. 2, p. 746–750, 2011.

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

ROCHA, S. A. **Procura espontânea de atendimento por idosos da Estratégia**

**Saúde da Família: análise não linear do comportamento temporal das morbidades.** 2015. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

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

RODRIGUES, C. G. et al. Hofmeister effect in confined spaces: Halogen ions and single molecule detection. **Biophysical Journal**, v. 100, n. 12, p. 2929–2935, 2011.

ROHDE, G. K. et al. Stochastic analysis of recurrence plots with applications to the detection of deterministic signals. **Physica D: Nonlinear Phenomena**, v. 237, n. 5, p. 619–629, 2008.

SAMPAIO, D. L.; NICOLETTI, R. Detection of cracks in shafts with the Approximated Entropy algorithm. **Mechanical Systems and Signal Processing**, v. 72–73, p. 286–302, 2016.

SCHLENKER, J. et al. Biomedical Signal Processing and Control Recurrence plot of heart rate variability signal in patients with vasovagal synopes. **Biomedical Signal Processing and Control**, v. 25, p. 1–11, 2016.

SCHMIDT-WINKEL, P. et al. Mesocellular siliceous foams with uniformly sized cells and windows. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 1, p. 254–255, 1999.

SINGH, R. et al. Biosensors for pathogen detection: A smart approach towards clinical diagnosis. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 197, p. 385–404, 2014.

SIWY, Z.; AUSLOOS, M.; IVANOVA, K. Correlation studies of open and closed state fluctuations in an ion channel: Analysis of ion current through a large-conductance locust potassium channel. **Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics**, v. 65, n. 3, p. 6, 2002.

SOKUNBI, M. O. et al. Fuzzy approximate entropy analysis of resting state fMRI signal complexity across the adult life span. **Medical Engineering & Physics**, v. 37, n. 11, p. 1082–1090, 2015.

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

STOSIC, T. et al. Identifying drought-induced correlations in the satellite time series of hot pixels recorded in the Brazilian Amazon by means of the detrended fluctuation analysis. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 444, p. 660–666, 2016.

TERRETTAZ, S. et al. Protein Binding to Supported Lipid Membranes: Investigation of the Cholera Toxin-Ganglioside Interaction by Simultaneous Impedance Spectroscopy and Surface Plasmon Resonance. **Langmuir**, v. 9, n. 6, p. 1361–1369, 1993.

TERRETTAZ, S.; MAYER, M.; VOGEL, H. Highly electrically insulating tethered lipid bilayers for probing the function of ion channel proteins. **Langmuir**, v. 19, n. 14, p. 5567–5569, 2003.

TERRILL, P. I. et al. Attractor Structure Discriminates Sleep States : Recurrence Plot Analysis Applied to Infant Breathing Patterns. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 57, n. 5, p. 1108–1116, 2010.

TVEITO, A. et al. Computing rates of Markov models of voltage-gated ion channels by inverting partial differential equations governing the probability density functions of the conducting and non-conducting states. **Mathematical Biosciences**, v. 277, p. 126–135, 2016.

U. RAJENDRA ACHARYA; VINITHA SREE; ALVIN, S. C. W. Y. A. P. C. Application of recurrence quantification analysis for the automated identification of epileptic EEG signals. **International journal of neural systems**, v. 21, n. 3, p. 199–211, 2011.

WANEKAYA, A. K.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Recent biosensing developments in environmental security. **Journal of environmental monitoring : JEM**, v. 10, p. 703–712, 2008.

WANG, C. et al. Prediction of jet penetration depth based on least square support vector machine. **Powder Technology**, v. 203, n. 2, p. 404–411, 2010.

WANG, C. C.; YANG, W. H. Using detrended fluctuation analysis (DFA) to analyze whether vibratory insoles enhance balance stability for elderly fallers. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 55, n. 3, p. 673–676, 2012.

WANG, X.; LU, X.; CHEN, J. Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 2, p. 25–32, 2014.

WAWRZKIEWICZ, A. et al. On the simple random-walk models of ion-channel gate dynamics reflecting long-term memory. **European Biophysics Journal**, v. 41, n. 6, p. 505–526, 2012.

WU, H. C.; BAYLEY, H. Single-molecule detection of nitrogen mustards by covalent reaction within a protein nanopore. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 21, p. 6813–6819, 2008.

WU, Y. et al. Measuring signal fluctuations in gait rhythm time series of patients with Parkinson's disease using entropy parameters. **Biomedical Signal Processing and Control**, v. 31, p. 265–271, 2017.

XU, J. et al. Information transmission in human cerebral cortex. **Physica D: Nonlinear Phenomena**, v. 106, p. 363–374, 1997.

XU, M.; SHANG, P.; LIN, A. Multiscale recurrence quantification analysis of order recurrence plots. **Physica A**, v. 469, p. 381–389, 2017.

YAN, J. et al. Using max entropy ratio of recurrence plot to measure electrocorticogram changes in epilepsy patients. **Physica A: Statistical Mechanics**

**and its Applications**, v. 443, p. 109-116, 2016.

ZACARIAS, H. M. J. **Avaliação da frequência cardíaca fetal baseada em métricas não-lineares**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Teleinformática) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ZANIN, M. et al. Permutation entropy and its main biomedical and econophysics applications: A review. **Entropy**, v. 14, n. 8, p. 1553–1577, 2012.

ZARGHAMI, R.; SHARIFI, F.; MOSTOUFI, N. Investigating the hydrodynamics of high temperature fluidized bed by recurrence plot. **Experimental Thermal and Fluid Science**, v. 83, p. 88–99, 2017.

ZBILUT, J. P.; THOMASSON, N.; WEBBER, C. L. Recurrence quantification analysis as a tool for nonlinear exploration of nonstationary cardiac signals. **Medical engineering & physics**, v. 24, p. 53–60, 2002.

ZHANG, X. S. et al. Detecting ventricular tachycardia and fibrillation by complexity measure. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 46, n. 5, p. 548–555, 1999.

## Capítulo 1

Métodos de dinâmica não linear para estudar a interação  
polímero-nanoporo

# MÉTODOS DE DINÂMICA NÃO LINEAR PARA ESTUDAR A INTERAÇÃO POLÍMERO-NANOPORO

Gesilda F. Neves<sup>1</sup>, Dijanah C. Machado<sup>2</sup>, Romildo A. Nogueira<sup>1</sup>, Carlos M. M. Carneiro<sup>2</sup>, Luiz H. A. Consoni<sup>2</sup>, Cláudio G. Rodrigues<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil

\* Corresponding author: cgrufpe@gmail.com

Os nanoporos de alfa-hemolisina são usados na identificação de analitos como o polietilenoglicol e outros através de um processo conhecido como biossensoriamento estocástico. No entanto, estudos de uma possível interação do analito polietilenoglicol com as paredes do lúmen do nanoporo são pouco esclarecedores. Neste trabalho avaliamos através de duas técnicas da dinâmica não linear os estados ocupados e não ocupados do poro em diferentes concentrações de PEG e numa concentração salina de 4M KCl para diferentes voltagens. As técnicas usadas foram a Análise de Flutuação Destendenciada (DFA) e a complexidade de Lempel-Ziv (CLZ) e os resultados foram indicativos que a chegada do analito a boca do nanoporo e a sua passagem pelo lúmen é um processo aleatório (*alfa do DFA*  $\cong 0.5$  e de alta complexidade (*CLZ*  $\cong 1$ ). Estudos posteriores serão realizados com a finalidade de caracterizar a interação ou não com regiões da alfa-hemolisina e sua aleatoriedade em outras condições.

Áreas do assunto: alfa-hemolisina, DFA, Lempel-Ziv, Markov, complexidade

Canais iônicos são moléculas proteicas encontradas em membranas biológicas que promovem o fluxo iônico e assumem estados conformacionais fechados (ou inativados) e abertos (para passagem de íons), fenômeno esse chamado cinética de canais<sup>1</sup>. Fisiologicamente, as transições dos estados estão associadas com barreiras energéticas. Recentemente, estudos foram realizados com foco na passagem de analitos através de canais iônicos em membranas lipídicas para entender a seletividade e a cinética de bloqueio desses canais, pois a dinâmica de chegada de alguma substância às proteínas e sua translocação são fenômenos importantes e específicos de cada analito, e possibilitam tanto a identificação do analito<sup>2,3</sup> como o perfil do interior do poro iônico.

Há vários modelos que mimetizam a cinética do canal iônico: um clássico é o Modelo Markoviano, no qual as transições entre os estados independem do tempo que o canal permaneceu num certo estado<sup>4</sup>. Assumindo-se que a cinética não apresente relação com suas propriedades físicas, as transições entre aberto e fechado constituem um processo aleatório<sup>4</sup>.

Fenômenos de translocação aleatórios são previstos também em nanoporos através do biossensoriamento estocástico. Em virtude dessa situação são gerados sinais de bloqueios de corrente característicos que determinam o perfil da translocação do analito pelo nanoporos. Esses sinais caracterizam a série temporal dos eventos de bloqueio que ocorrem pela interação analito-nanoporos. Ao analisar a série temporal pode-se obter o tempo de ausência (TA) e o tempo de permanência (TP) do analito no nanoporos. Desde a década de 90, nanoporos de  $\alpha$ -hemolisina( $\alpha$ HL) são utilizados como biossensores estocásticos. Apesar do biossensor de  $\alpha$ HL ser classificado como estocástico, não há evidências, utilizando ferramentas estatísticas, que comprovem que a passagem de analitos pelo interior do nanoporos é um processo aleatório. Porém, devido às semelhanças da corrente iônica gerada pelos analitos em nanoporos com aquela gerada pelo canal iônico, podemos recorrer a ferramentas utilizadas em canais para caracterizar esse processo.

A análise dos tempos de ocupação e não-ocupação do analito (TP e TA, respectivamente) em relação às suas propriedades de correlação ou aleatoriedade pode ser realizada por meio de diversas ferramentas matemáticas. Uma dessas técnicas é a *Detrended Fluctuation Analysis* (DFA) proposta por Peng et al. (1995)<sup>5</sup> é um método utilizado para medir a presença ou ausência de correlação de longo e curto alcance (memória) em séries temporais e tem sido frequentemente aplicada em vários campos, como os de canais iônicos<sup>6,7</sup>, dinâmica cardíaca<sup>8</sup>, estudos de DNA<sup>9</sup>, economia<sup>10</sup>, clima<sup>11</sup> etc.

Outra técnica utilizada é a Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ), através da qual há possibilidade de quantificar a complexidade de um sinal. Diversos estudos têm caracterizado sinais usando como ferramenta de análise a CLZ, entre eles citamos a complexidade do sinal de EEG em pacientes com Doença de Alzheimer<sup>12</sup>, doença de Parkinson e distonia<sup>13</sup>, em EGG<sup>14</sup>, efeito de anestésicos<sup>15</sup>, atividade neural<sup>16,17</sup>, análises *in silico* da atividade elétrica pancreática<sup>18</sup> e muitos outros.

O presente trabalho tem como objetivo investigar se os bloqueios da corrente iônica decorrentes da interação do analito Polietilenoglicol 1294 monodisperso (PEG 1294) com o lúmen nanoporos de  $\alpha$ HL é um processo aleatório ou com memória.

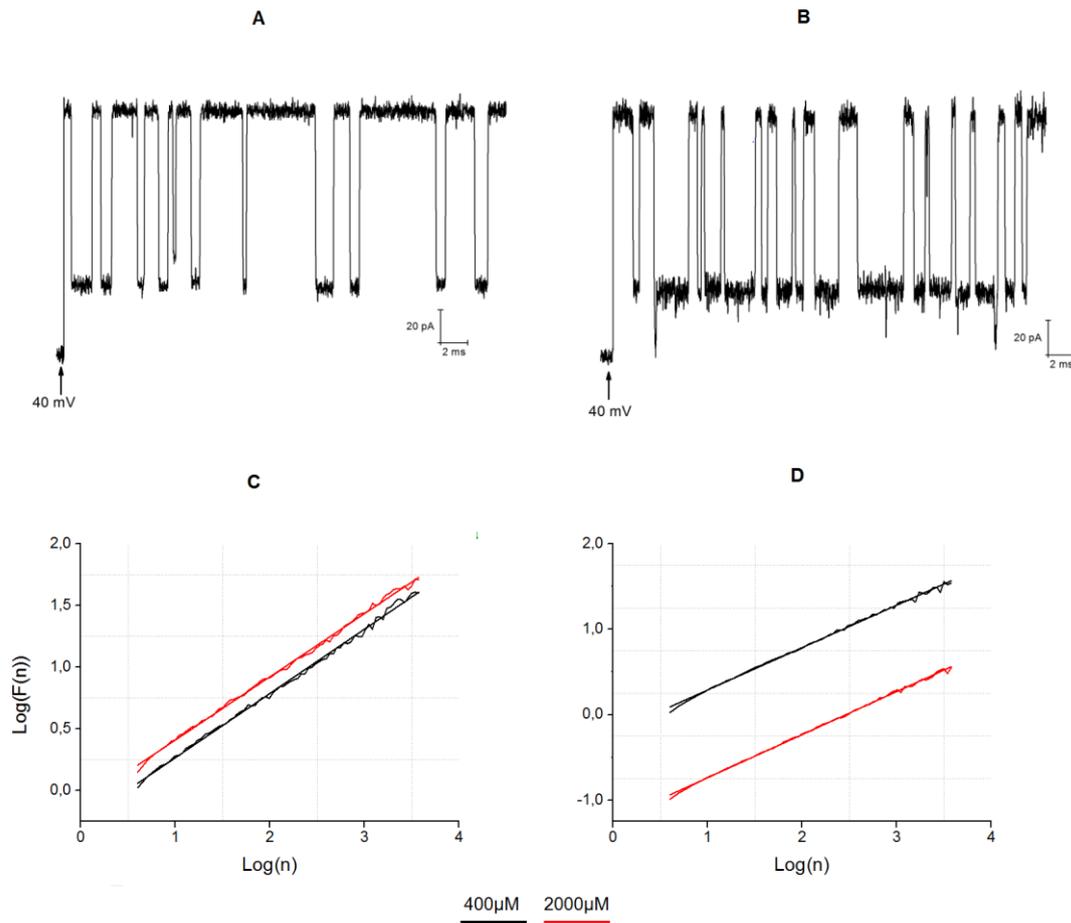
## RESULTADOS

### Análise DFA – TA's e TP's

Foi utilizado para o estudo o analito PEG1294 e o nanoporo de alfa-hemolisina. Os registros em voltagens que variaram de 20mV até 100mV com incrementos de 20mV e em concentrações de 400,1000 e 2000 $\mu$ M mostram que a passagem das moléculas de PEG através do nanoporo gera bloqueio da corrente iônica, o qual permite determinar os tempos de permanências desbloqueados (TA's) e bloqueados (TP's). Os tempos de permanências nesses dois estados foram analisados através do algoritmo de DFA. A figura 1 A e B mostra registros típicos das alterações da corrente iônica no nanoporo em decorrência dos bloqueios e desbloqueios do analito. Gráficos do tipo duplo-logaritmo para determinar o expoente  $\alpha$  da função  $F_{\alpha}(n)$  do DFA para os nossos registros experimentais são mostrados na figura 1 C e D. Podemos observar que para um valor de voltagem transmembrana fixado em 40mV e em concentrações de 400, 1000 e 2000 $\mu$ M, os valores dos alfas estão em torno de 0.50. Cada expoente foi obtido a partir da inclinação da reta de regressão para os pontos correspondentes às análises de flutuações em cada janela n. Os alfas experimentais para cada valor de voltagem e concentração são mostrados na tabela 1. Em todas as condições experimentais investigadas, os  $\alpha$ 's foram aproximadamente iguais a 0.5 e de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e pos hoc de Dunn não houve diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre as diferentes concentrações e voltagens usadas nos protocolos experimentais.

**Tabela 1.** Alfa do DFA (média  $\pm$  desvio padrão) para n=3 de TP e TA nas concentrações 400 $\mu$ M, 1000 $\mu$ M e 2000 $\mu$ M e voltagens de 20 a 100mV.

VOLTAGEM \ CONCENT.	400 $\mu$ M		1000 $\mu$ M		2000 $\mu$ M	
	$\alpha_{TP}$	$\alpha_{TA}$	$\alpha_{TP}$	$\alpha_{TA}$	$\alpha_{TP}$	$\alpha_{TA}$
20mV	0.497 $\pm$ 0.028	0.521 $\pm$ 0.012	0.510 $\pm$ 0.006	0.504 $\pm$ 0.013	0.501 $\pm$ 0.016	0.502 $\pm$ 0.037
40mV	0.503 $\pm$ 0.009	0.511 $\pm$ 0.012	0.497 $\pm$ 0.019	0.513 $\pm$ 0.007	0.506 $\pm$ 0.012	0.515 $\pm$ 0.010
60mV	0.507 $\pm$ 0.016	0.505 $\pm$ 0.028	0.505 $\pm$ 0.017	0.508 $\pm$ 0.016	0.511 $\pm$ 0.011	0.522 $\pm$ 0.018
80mV	0.532 $\pm$ 0.049	0.513 $\pm$ 0.020	0.515 $\pm$ 0.044	0.535 $\pm$ 0.013	0.506 $\pm$ 0.010	0.513 $\pm$ 0.018
100mV	0.492 $\pm$ 0.011	0.506 $\pm$ 0.020	0.518 $\pm$ 0.020	0.502 $\pm$ 0.012	0.493 $\pm$ 0.010	0.504 $\pm$ 0.044



**Figura 1.** Registro do PEG-1294 e coeficiente alfa do DFA. (A) Registro da concentração 400 $\mu$ M na voltagem de 40mV; (B) Registro da concentração de 2000 $\mu$ M na voltagem de 40mV; (C) Resultados dos coeficientes alfas em TA nas concentrações de 2000 e 400  $\mu$ M em 40mV, respectivamente: 0.51, 0.51; (D) Resultados dos coeficientes alfas em TP nas concentrações de 400 e 2000 $\mu$ M em 40mV, respectivamente: 0.49, 0.50.

### Aleatorização dos registros experimentais

Os TA's e TP's foram aleatorizados a partir dos dados experimentais em todas as condições de concentração e voltagem e encontramos o expoente de DFA para cada série. Os alfas aleatorizados foram de aproximadamente 0.50, para confirmar a não correlação dos dados experimentais aplicamos o teste Z bicaudal para verificar se havia diferença estatística entre o resultado experimental e o aleatorizado. Verificamos que não havia diferença estatística entre eles, o que é indicativo de um processo estocástico Markoviano. Uma modelagem Markoviana de

dois estados também foi usada para simular uma série aleatória. Os estados considerados foram TP (bloqueado) e TA (não-bloqueado) com taxas de transições representadas pelos K's. As séries simuladas seguiram a rotina disponibilizada no software QUB©<sup>19,20,21</sup>, para as quais obtivemos 40 taxas de transições ( $K_{12}$  e  $K_{21}$ ) de média ( $K_{12}$ : 631,504;  $K_{21}$ : 1726,27).

### Complexidade de Lempel-Ziv em TA e TP

O coeficiente de Lempel-Ziv mostrou que TA e TP separadamente apresentam um comportamento de alta aleatoriedade e complexidade. Obtivemos os seguintes resultados (média  $\pm$  desvio padrão) na tabela 2. Verificamos que os resultados se aproximaram do valor máximo de complexidade que corresponde a 1. Para comparar o CLZ nas diversas concentrações e voltagens utilizamos o teste de Kruskal-Wallis e pos hoc de Dunn ( $p < 0.05$ ) e não houve diferença significativa para as concentrações de 400, 1000 e 2000  $\mu\text{M}$  e as voltagens de 20-100mV. Os valores obtidos indicam que o comportamento tanto de TA quanto de TP são complexos.

**Tabela 2.** Coeficiente de CLZ (média  $\pm$  desvio padrão) para  $n=3$  de TP e TA nas concentrações 400 $\mu\text{M}$ , 1000 $\mu\text{M}$  e 2000 $\mu\text{M}$  e voltagens de 20 a 100mV.

VOLTAGEM \ CONCENT.	400 $\mu\text{M}$		1000 $\mu\text{M}$		2000 $\mu\text{M}$	
	TP	TA	TP	TA	TP	TA
20mV	0.9452 $\pm$ 0.0599	0.9084 $\pm$ 0.0552	0.9662 $\pm$ 0.0051	0.8459 $\pm$ 0.0516	0.9760 $\pm$ 0.0104	0.8965 $\pm$ 0.0174
40mV	0.9729 $\pm$ 0.0013	0.8901 $\pm$ 0.0249	0.9704 $\pm$ 0.0007	0.8717 $\pm$ 0.0167	0.9762 $\pm$ 0.0177	0.8937 $\pm$ 0.0091
60mV	0.8704 $\pm$ 0.0859	0.8819 $\pm$ 0.0446	0.948 $\pm$ 0.02720	0.9095 $\pm$ 0.0101	0.9669 $\pm$ 0.0088	0.9114 $\pm$ 0.0051
80mV	0.9229 $\pm$ 0.0193	0.9341 $\pm$ 0.0320	0.9211 $\pm$ 0.0715	0.9075 $\pm$ 0.0597	0.9656 $\pm$ 0.0012	0.9290 $\pm$ 0.0125
100mV	0.9466 $\pm$ 0.0218	0.9772 $\pm$ 0.0102	0.9500 $\pm$ 0.0143	0.9354 $\pm$ 0.0315	0.9557 $\pm$ 0.0166	0.9546 $\pm$ 0.0114

## DISCUSSÃO

Biossensores estocásticos (BE) baseados em nanoporos proteicos individuais podem detectar, identificar e caracterizar analitos, apenas por meio da análise do registro temporal das flutuações da corrente iônica que flui pelo nanoporo<sup>22-24</sup>. Para os BE, a relação entre o tamanho molecular e a amplitude do bloqueio é muito importante, pois, é o indicativo de quais moléculas individuais podem ser detectadas, essencialmente aquelas que apresentam valor de diâmetro semelhante ao do nanoporo<sup>22</sup>.

A  $\alpha$ -Hemolisina, o primeiro e mais usado nanoporo biológico, é o componente principal em várias aplicações biotecnológicas, incluindo sensores estocásticos para diversas moléculas e substâncias<sup>25,26</sup> é considerada o nanoporo mais bem caracterizado e estudado para fins de biossensoramento<sup>7</sup>. O nanoporo-sensor de  $\alpha$ -Hemolisina baseia-se na inserção de um único nanoporo em uma membrana artificial banhada por uma solução eletrolítica. O mecanismo de sensoriamento do nanoporo é simples: aplicando-se um potencial elétrico ao sistema, fluirá uma corrente iônica máxima através do poro; as moléculas do analito ao interagirem com o nanoporo bloqueiam parte dessa corrente iônica gerando eventos temporais<sup>27,28</sup>. Como foi mencionado acima, a presença do analito no interior do nanoporo gera alterações na corrente provocando identificar os eventos de bloqueio<sup>28</sup>. Cada evento de bloqueio mostra a interação da molécula unitária com o nanoporo e a análise da série temporal gerada permite identificar e caracterizar o analito em questão<sup>29,30</sup>.

Acredita-se que o PEG associa-se a regiões hidrofóbicas do nanoporo, já que o movimento do polímero dentro do poro é caracterizado por um coeficiente de difusão que é da ordem de magnitude menor que a do polímero em solução aquosa<sup>31</sup>. Movileanu e colaboradores<sup>32</sup> observaram o comportamento estocástico de polímeros confinados em nanoporos unitários. Segundo Merzlyak et al.<sup>33</sup> análises teóricas indicam não existir interação entre o PEG e o lúmen do canal. Porém, para altas concentrações o PEG pode ser ligado a regiões hidrofóbicas da proteína pela condição da não polaridade do PEG.

Outros fatores relevantes no sensoriamento são as condições físico-químicas da solução que banha o nanoporo. Estudos indicam que a temperatura da solução<sup>34</sup>, o aumento da viscosidade<sup>35</sup> e a concentração de sal<sup>36</sup> podem influenciar a velocidade de translocação das moléculas dentro do nanoporo. Como foi dito anteriormente, a capacidade de detecção do sensor de  $\alpha$ HL pode ser modificada de acordo com alterações na concentração da solução eletrolítica banhante. De acordo com Rodrigues et al.(2008)<sup>37</sup>, o aumento da concentração de KCl de 1 para 4 molL<sup>-1</sup> melhora a sensibilidade e a resolução do nanoporo na detecção de moléculas de polímero em cerca de 100 vezes. Estudos também mostraram que o tipo de íon que compõe a solução de banho influencia a sensibilidade do nanoporo-sensor<sup>24,37</sup>. A de  $\alpha$ HL pertence à classe de biossensores estocásticos que permitem a detecção de analitos no nível de molécula unitária<sup>38</sup>. Os eventos de bloqueio de corrente de íon

requerem que a interação analito-nanoporo siga padrões que governam fenômenos estocásticos<sup>39-41</sup>.

Os sinais de bloqueios característicos determinam o perfil do comportamento em relação à translocação do analito-nanoporo através de séries temporais para TA's e TP's. Em canais iônicos, ferramentas utilizadas para caracterizar o comportamento de um canal, permitiram sugerir a possibilidade de memória/correlação de longo ou curto alcance e aleatoriedade. Acredita-se que nanoporos proteicos apresentam um comportamento estocástico em relação à translocação, onde o analito passa sem sofrer alterações na sua estrutura e possivelmente sem interagir com o nanocanal. Devido a estas propriedades, a  $\alpha$ -hemolisina tem sido escolhida para sequenciamento da fita simples de DNA (ss-ADN)<sup>42,43</sup> gerando bloqueios na corrente iônica característica para cada base nucleotídica<sup>6</sup> e translocação de diversos outros analitos<sup>28,44</sup>. Pela escassez de trabalhos que provem matematicamente as propriedades estocásticas do bloqueio e desbloqueio, utilizamos as ferramentas DFA, CLZ e Modelagem Markoviana para ajudar a esclarecer o perfil da translocação em nanoporos.

**Análise de Flutuação Destendenciada** - O DFA é uma ferramenta aplicada para investigar correlações e a auto-similaridade em séries temporais através do seu parâmetro alfa que corresponde ao perfil do sinal. Desde seu desenvolvimento têm sido utilizado em diversas áreas incluindo estudos em canais iônicos<sup>7,45</sup>. Lan et al. (2008)<sup>7</sup> mostraram a possibilidade de ser estudada a corrente de canais de K<sup>+</sup> dependente de voltagem em neurônios ganglionares de ratos através de DFA. Siwy e colaboradores<sup>46</sup> estudaram a série temporal de abertura e fechamento de canais BK para verificar o comportamento da correlação e neste caso, foram maiores que 0.5 e fortes correlações foram identificadas nos estados fechados.

Contudo, não há na literatura estudos aplicando o DFA na análise da interação de moléculas com nanoporos biológicos. Neste estudo, pioneiramente, analisamos a série temporal de eventos de bloqueio da corrente iônica gerada pela interação de moléculas de PEG com o nanoporo proteico unitário da  $\alpha$ -HL. Através do uso do DFA foi possível inferir que a sua interação com polietilenoglicol (1294) consiste em um processo aleatório (TA e TP concentram-se em torno de um alfa de 0.5) independente do potencial aplicado e das diferentes concentrações. Com isso,

mostramos que o nanoporo em solução de KCL 4M apresentou um comportamento aleatório, tanto para o analito chegar na boca do nanoporo quanto durante sua passagem no lúmen.

**Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ)**- é uma medida bastante usada para caracterizar a complexidade em sinais biológicos<sup>15,47</sup>. O Lempel-Ziv é um método de cálculo de complexidade e avaliação da aleatoriedade em um sinal unidimensional ou sequências finitas. É considerada uma medida não paramétrica de complexidade que reflete o padrão da série<sup>12,48</sup>. O resultado do cálculo da CLZ é um número que está entre 0 e 1. Quanto mais próximo de 1 for o resultado maior a CLZ e mais aleatório será o comportamento do sinal, quanto mais próximo o resultado for de 0 menor será a CLZ, indicando que a série tem maior auto-similaridade<sup>18,48,49</sup>. Os altos valores de CLZ (aproximadamente igual a 1) obtidos para sequência dos tempos de permanência nos estados abertos e bloqueados estão coerentes com o DFA. Outro dado relevante é que a CLZ para este perfil de estudo é uma técnica robusta, pois não se modifica quando a voltagem aplicada no nanoporo é alterada. Esta técnica foi eficiente para caracterizar a interação PEG-nanoporo como um processo estocástico e de alta complexidade.

**Modelagem Markoviana** - Modelos de comportamentos aleatórios têm sido mimetizado pela Cadeia de Markov, onde em situações com memória é visto que a dinâmica da corrente iônica não segue um padrão Markoviano<sup>46</sup>. Na modelagem Markoviana é assumido que a cinética do canal independe de suas propriedades físicas e as transições entre aberto e fechado seja processo aleatório<sup>50</sup>. Na cadeia de Markov é sempre possível prever  $X_n$  conhecendo o estado  $X$  atual, sendo assim, o  $X_n$  não depende do estado  $X_{n-1}$ , ou seja, assume-se que uma transição futura é independente do tempo que esteve no estado anterior<sup>51</sup>. Propriedade esta que qualifica a cadeia de Markov como sem memória<sup>1</sup>. Canais iônicos do tipo BK, devido à memória, apresentam comportamento não-Markoviano<sup>1</sup>.

Nogueira et al.<sup>52</sup> mostraram através da análise de Hurst que canais iônicos do tipo BK têm memória e testaram se algum tipo de modelagem Markoviana poderia responder pela correlação observada nos dados experimentais. Esses autores mostraram que nem modelos Markovianos de multiestados e nem outros modelos,

tais como o fractal e o caótico, puderam mimetizar a memória observada na cinética de canais do tipo BK. A partir do sinal experimental, simulamos nossos dados e obtivemos registros que descreveram precisamente os estados funcionais de um nanoporo, permitindo o estudo de seu comportamento<sup>20</sup>.

As taxas de transições entre os estados descrevem a abertura ou bloqueio/fechamento do canal e correspondem às probabilidade de passar de um estado a outro<sup>4</sup>. Modelamos as constantes de transições  $K_1$  e  $K_2$  entre os estados cinéticos tempo de abertura (TA) e tempo de permanência (TP). Foi simulado a corrente iônica e obtidas as taxas de transições para o modelo de Markov<sup>7</sup>. Timmer e Klein<sup>53</sup> analisaram dados de canais a partir da dinâmica Markoviana. Segundo eles com o mínimo de estados é possível descrever os dados. Neste caso, a função densidade de probabilidades dos tempos de visita ao estado bloqueado e não bloqueado é dado pela seguinte expressão:

$$f_x = a_x \cdot \exp(-q_x t), t \geq 0 \quad (1)$$

O tempo médio de bloqueios e desbloqueios pode ser determinado como:

$$t_m = \int t f_x(t) \cdot dt = \frac{1}{r_x} \quad (2)$$

Os parâmetros  $r_x$  ( $x=0,1$ ) podem ser estimados a partir dos tempos médios de bloqueios e desbloqueios. A taxa de transição entre os dois estados do canal pode ser descrita da seguinte forma:

$$K_{ij} = r_i \cdot Q(i,j), i \neq j \quad (3)$$

onde  $K_{ij}$  é a taxa de transição entre os dois estados  $i$  e  $j$ ,  $r_i$  é o parâmetro da função densidade de probabilidades dos tempos de permanência no estado  $i$  e  $Q(i,j)$  é a probabilidade de ao sair de um estado  $i$  (por exemplo, bloqueado) a cadeia transite para um estado  $j$  (por exemplo, desbloqueado). No caso de um nanoporo com apenas duas condições: bloqueado e não bloqueado, toda vez que ela sair do estado bloqueado com certeza irá para o não bloqueado e vice-versa<sup>54</sup>. Portanto,  $Q(0,1) = Q(1,0) = 1$  e como consequência disto  $K_{01} = r_0 \cdot Q(0,1) = r_0$  e  $K_{10} = r_1 \cdot Q(1,0) = r_1$ .

No entanto, dados aleatórios e dados de simulação do modelo de Markov mostraram que não existe correlação de longo alcance e o bloqueio é estocástico, diferentemente de dados de cinética de canais iônicos<sup>3,4,51</sup>. Sanson et al.<sup>55</sup> sugerem

que modelos Markovianos fornecem uma boa descrição dos tempos abertos e fechados para sistemas sem correlação o que justifica o uso de modelos de Markov para estudar mecanismos de bloqueio de canais e nanoporos.

## CONCLUSÃO

A dinâmica de bloqueio-desbloqueio da corrente iônica decorrentes da interação do analito Polietilenoglicol 1294 monodisperso (PEG 1294) com o lúmen nanoporo de  $\alpha$ HL, incorporado numa bicamada lipídica plana banhada por uma solução de 4M KCl, segue um processo estocástico Markoviano. Esse achado revela que é realmente coerente tratar o biosensor formado pelo nanoporo de  $\alpha$ HL numa bicamada lipídica como um Biosensor Estocástico (BE). Estudos futuros serão desenvolvidos com a finalidade de caracterizar mais detalhadamente a aleatoriedade que rege os TA's e TP's do nanoporo de  $\alpha$ HL e a possibilidade ou não de interação do PEG com regiões do nanoporo.

## MÉTODOS

**Experimental.** Neste trabalho, foram confeccionadas bicamadas lipídicas planas livres de solvente, com capacitância de 40 pF, de acordo com a técnica de Montal & Mueller<sup>56</sup>, usando o lipídeo sintético 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) 2% (p/v) em hexano (Merck). Esta técnica consiste basicamente na formação de uma bicamada lipídica por aposição de dois filmes monomoleculares de lipídeo em um orifício (~100  $\mu$ m diâmetro) de uma partição de Teflon® que separa dois compartimentos idênticos de uma câmara experimental de Teflon®, contendo solução eletrolítica. Antes da formação da bicamada, o orifício foi pré-tratado com uma solução de 1% (v/v) de hexadecano (Sigma) em hexano (Merck). Os dois compartimentos da câmara continham solução eletrolítica composta por 4 M de KCl, 5 mM de tampão Tris-ácido cítrico (pH 7.5). Polyethylene Glycol (PEG) monodisperso 1294 (Polypure, Oslo, Norway) foi usado como um analito representativo de polímeros neutros por causa de sua ampla aplicabilidade em estudos científicos e tecnológicos. PEG 1294 foi adicionado no

lado trans da membrana. A  $\alpha$ -hemolisina (Calbiochem, Madison, WI) foi adicionada no lado cis da membrana em concentração suficiente para formar um único nanoporo proteico na bicamada lipídica. Foram aplicados potenciais de 20 a 100 mV (em incrementos de 20 mV). Uma corrente positiva é definida pelo fluxo de cátions do lado trans para cis. Todos os experimentos foram realizados usando um amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA) em modo de fixação de voltagem. O registro da corrente foi realizado através de eletrodos prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) em pontes salinas de 3% de Ágar em 3M KCl fazendo a conexão entre a câmara e o amplificador. As correntes iônicas foram filtradas por um filtro passa-baixa Butterworth (model 9002; Frequency Devices, Haverhill, MA) a 15 kHz e diretamente salvas na memória de um computador com uma taxa de amostragem de 250 kHz. As concentrações de PEG 1294 utilizadas nos experimentos foram 0.4, 1 e 2 mM. Todos os experimentos foram realizados a  $25 \pm 1$  °C.

## Teórico

**Análise de Flutuação Destendenciada (algoritmo).** O método DFA baseia-se em análise de flutuações dos dados após a retirada das tendências da série temporal integrada. O procedimento é o seguinte:

(a) seja  $y(i)$  com  $i = 1, 2, \dots, N$ , a série temporal original, a série integrada é obtida usando a expressão:

$$y(k) = \sum_{i=1}^k (y(i) - M) \quad (4)$$

onde  $M$  é a média dos valores de  $y(i)$  com  $i = 1, 2, \dots, N$  e  $k$  é um número inteiro. A integração transforma a série original em um processo auto-similar;

(b) Em seguida, a série  $y(k)$  é dividida em intervalos de tamanho  $n$ . A ordenada do segmento que representa a tendência no intervalo de tamanho  $n$  é denotada  $y_n(k)$ . Essa tendência é retirada subtraindo-se o valor do ajuste  $y_n(k)$  do valor correspondente da série integrada  $y(k)$ . A função de flutuação  $F(n)$  (que caracteriza o tamanho das flutuações para o tamanho  $n$  dos intervalos usados) é dada pela expressão:

$$F(n) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=1}^N [y(k) - y_n(k)]^2} \quad (5)$$

O procedimento é repetido para vários tamanhos do intervalo  $n$  para poder determinar a relação entre a função de flutuação  $F(n)$  e o tamanho do intervalo  $n$ . Como  $F(n)$  versus  $n$  segue uma lei de potência com expoente de auto-similaridade  $\alpha$ , este expoente  $\alpha$  pode ser calculado usando o coeficiente angular da reta obtida por regressão linear do gráfico  $\log F(n)$  versus  $\log(n)$ <sup>5</sup>.

**Complexidade de Lempel-Ziv.** A Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ)<sup>57</sup> é um método de cálculo de complexidade e avaliação da aleatoriedade em um sinal. Para calcular a CLZ é necessário transformar a série temporal em uma sequência binária que é gerada a partir da comparação de cada tempo da série com uma média de todos os pontos na série. Se o valor do ponto é maior do que a média, passa a ser representado por 1, se é menor do que a média será representado por 0. Deste modo obtém-se uma sequência formada por 1 e 0<sup>12</sup>. A complexidade de uma série pode ser medida da seguinte forma:

Seja uma série  $X = x(1), x(2), \dots, x(N)$  é convertida numa sequência 0-1 gerando um  $P = s(1), s(2), \dots, s(N)$ , com  $s(i)$  definida por:

$$s(i) = \begin{cases} 0, & \text{se } s(i) < \text{média} \\ 1, & \text{se } s(i) \geq \text{média} \end{cases}$$

Depois, este string  $P$  é escaneado da esquerda para a direita e um contador de complexidade  $c(n)$  é aumentado em uma unidade cada vez que uma nova subsequência de caracteres consecutivos é encontrado no processo de escaneamento. Finalmente,  $c(n)$  é normalizado de modo a obter uma medida de complexidade independente do comprimento da sequência. Para uma conversão binária, o limite superior de  $c(n)$  é dado por  $b(n) = n/\log_2(n)$ , e  $c(n)$  pode ser normalizado via  $b(n)$ :

$$CLZ = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{c(n)}{b(n)} \quad (6)$$

O resultado do cálculo da CLZ é um número que está entre 0 e 1. Quanto mais próximo de 1 for o resultado maior a CLZ e mais aleatório será o comportamento do

sinal, quanto mais próximo o resultado for de 0 menor será a CLZ, indicando que a série tem maior auto-similaridade<sup>18,48,49</sup>.

**Modelagem Markoviana.** A partir do sinal experimental, simulamos nossos dados através do software QUB© e obtivemos registros que descreveram precisamente os estados funcionais de um nanoporo. Modelamos as constantes de transições  $K_{12}$  e  $K_{21}$  (probabilidades de transições do sistema molecular que forma nanoporo) entre os estados cinéticos tempo de abertura (TA) e tempo de permanência (TP) que representam os estados não bloqueado e bloqueado, respectivamente, e obtivemos uma série baseada no experimental e com propriedades Markoviana. Numa série com essas características a técnica do DFA identificou um expoente  $\alpha=0.5$ .

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve suporte da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Agradecemos ao Laboratório de Análises Computacionais e Realidades Complexas (LACREC) do Centro de Apoio a Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Cenapesq), Laboratório de Biofísica Teórica e Computacional da UFRPE (LABTEC) e ao Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-Tronco – Dr. Oleg Krasilnikov da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pelo suporte técnico para o desenvolvimento desse trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Campos De Oliveira, R. A. *et al.* Long-term correlation in single calcium-activated potassium channel kinetics. *Phys. A Stat. Mech. its Appl.* **364**, 13–22 (2006).
2. Tang, Y. W., Chan, K. Y. & Szalai, I. One-dimensional capacitance behavior of electrolytes in a nanopore. *Nano Lett.* **3**, 217–221 (2003).
3. Wawrzkiwicz, A., Pawelek, K., Borys, P., Dworakowska, B. & Grzywna, Z. J. On the simple random-walk models of ion-channel gate dynamics reflecting long-term memory. *Eur. Biophys. J.* **41**, 505–526 (2012).
4. Bandeira, H. T., Barbosa, C. T. F., Campos De Oliveira, R. A., Aguiar, J. F. & Nogueira, R. A. Chaotic model and memory in single calcium-activated potassium channel kinetics. *Chaos* **18**, (2008).

5. Peng, C. *et al.* Fractal Mechanisms and Heart Rate Dynamics Long-range Correlations and Their Breakdown With Disease. *J. Electrocardiol.* **28**, 59–65 (1995).
6. Lan, T. H., Xi, H. & Lin, J. R. Correlation character of ionic current fluctuations: Analysis of ion current through a voltage-dependent potassium single channel. *Biophys. Chem.* **117**, 191–197 (2005).
7. Lan, T.-H., Gao, Z.-Y., Abdalla, A. N., Cheng, B. & Wang, S. Detrended fluctuation analysis as a statistical method to study ion single channel signal. *Cell Biol. Int.* **32**, 247–252 (2008).
8. Márton, L. F., Brassai, S. T., Bakó, L. & Losonczi, L. Detrended Fluctuation Analysis of EEG Signals. *Procedia Technol.* **12**, 125–132 (2014).
9. Peng CK, Buldyrev SV, Havlin S, Simons M, Stanley HE, G. A. Mosaic organization of DNA nucleotides. *Physical review e.* 1685–9 (1994).
10. Wang, Q., Zhu, Y., Yang, L. & Mul, R. A. H. Coupling detrended fluctuation analysis of Asian stock markets. *Physica A* **471**, 337–350 (2017).
11. Habib, A. *et al.* Temporal scaling phenomena in groundwater-floodplain systems using robust detrended fluctuation analysis. *J. Hydrol.* **549**, 715–730 (2017).
12. Abásolo, D., Hornero, R., Gómez, C., García, M. & López, M. Analysis of EEG background activity in Alzheimer’s disease patients with Lempel-Ziv complexity and central tendency measure. *Med. Eng. Phys.* **28**, 315–322 (2006).
13. Geng, X. *et al.* Comparison of oscillatory activity in subthalamic nucleus in Parkinson’s disease and dystonia. *Neurobiol. Dis.* **98**, 100–107 (2016).
14. Bai, Y., Liang, Z. & Li, X. A permutation Lempel-Ziv complexity measure for EEG analysis. *Biomed. Signal Process. Control* **19**, 102–114 (2015).
15. Hudetz, A. G., Liu, X., Pillay, S., Boly, M. & Tononi, G. Propofol anesthesia reduces Lempel-Ziv complexity of spontaneous brain activity in rats. *Neurosci. Lett.* **628**, 132–135 (2016).
16. Amigó, J. M., Szczepański, J., Wajnryb, E. & Sanchez-Vives, M. V. Estimating the entropy rate of spike trains via Lempel-Ziv complexity. *Neural Comput.* **16**, 717–36 (2004).
17. Li, R. & Wang, J. Interacting price model and fluctuation behavior analysis from Lempel-Ziv complexity and multi-scale weighted-permutation entropy. *Phys. Lett. Sect. A Gen. At. Solid State Phys.* **380**, 117–129 (2016).
18. Neves, G. F. *et al.* 60 Hz Electric Field Changes the Membrane Potential During Burst Phase in Pancreatic  $\beta$ -Cells: In Silico Analysis. *Acta Biotheor.* **62**, 133–143 (2014).
19. Qin, F., Auerbach, a & Sachs, F. Hidden Markov modeling for single channel kinetics with filtering and correlated noise. *Biophys. J.* **79**, 1928–1944 (2000).
20. Luchian, T. An automated method for generating analogic signals that embody the Markov kinetics of model ionic channels. *J. Neurosci. Methods* **147**, 8–14 (2005).
21. Tveito, A., Lines, G. T., Edwards, A. G. & McCulloch, A. Computing rates of Markov models of voltage-gated ion channels by inverting partial differential equations governing the probability density functions of the conducting and non-conducting

- states. *Math. Biosci.* **277**, 126–135 (2016).
22. Rincon-Restrepo, M., Mikhailova, E., Bayley, H. & Maglia, G. Controlled translocation of individual DNA molecules through protein nanopores with engineered molecular brakes. *Nano Lett.* **11**, 746–750 (2011).
  23. Campos, E. J., McVey, C. E. & Astier, Y. Stochastic Detection of MPSA-Gold Nanoparticles Using a  $\alpha$ -Hemolysin Nanopore Equipped with a Noncovalent Molecular Adaptor. *Anal. Chem.* **88**, 6214–6222 (2016).
  24. Machado, D. C. *et al.* Effects of alkali and ammonium ions in the detection of poly(ethyleneglycol) by alpha-hemolysin nanopore sensor. *RSC Adv.* **6**, 56647–56655 (2016).
  25. Feng, Y., Zhang, Y., Ying, C., Wang, D. & Du, C. Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* **13**, 4–16 (2015).
  26. Chandramouli, B., Di Maio, D., Mancini, G. & Brancato, G. Introducing an artificial photo-switch into a biological pore: A model study of an engineered  $\alpha$ -hemolysin. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1858**, 689–697 (2016).
  27. Bayley, H. & Cremer, P. S. Stochastic sensors inspired by biology. *Nature* **413**, 226–230 (2001).
  28. Aguiar, J. P., Júnior, J. J. S., Machado, D. C. & Melo, M. C. A. Biossensoriamento estocástico via nanoporo proteico individual no desenvolvimento de ferramentas analíticas. *Quim. Nova* **38**, 817–827 (2015).
  29. Laszlo, A. H., Derrington, I. M. & Gundlach, J. H. MspA nanopore as a single-molecule tool: From sequencing to SPRNT. *Methods* **105**, 75–89 (2016).
  30. Reiner, J. E., Kasianowicz, J. J., Nablo, B. J. & Robertson, J. W. F. Theory for polymer analysis using nanopore-based single-molecule mass spectrometry. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 6–11 (2010).
  31. Bezrukov, Sergey M *et al.*; Vodyanoy, Igor; Brutyan A, Rafik; Kasianowicz, J. J. Dynamics and Free Energy of Polymers Partitioning into a nanoscale Pore. *Macromolecules* **9297**, 8517–8522 (1996).
  32. Movileanu, L., Schmittschmitt, J. P., Scholtz, J. M. & Bayley, H. Interactions of peptides with a protein pore. *Biophys. J.* **89**, 1030–45 (2005).
  33. Merzlyak, P. G. *et al.* Polymeric Nonelectrolytes to Probe Pore Geometry : Application to the  $\alpha$ -Toxin Transmembrane Channel. *Biophysical Journal*.**77**, 3023–3033 (1999).
  34. Meller, A., Nivon, L., Brandin, E., Golovchenko, J. & Branton, D. Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1079–1084 (2000).
  35. Fologea, D., Uplinger, J., Thomas, B., McNabb, D. S. & Li, J. Slowing DNA translocation in a solid-state nanopore. *Nano Lett.* **5**, 1734–1737 (2005).
  36. Schneider, G. F. *et al.* DNA Translocation through Graphene Nanopores. *Nano Lett.* **10**, 3163–3167 (2010).
  37. 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.* **95**, 5186–5192 (2008).
38. Liu, A., Zhao, Q. & Guan, X. Stochastic nanopore sensors for the detection of terrorist agents: Current status and challenges. *Anal. Chim. Acta* **675**, 106–115 (2010).
  39. Kasianowicz, J. J. & Bezrukov, S. M. Protonation dynamics of the alpha-toxin ion channel from spectral analysis of pH-dependent current fluctuations. *Biophys. J.* **69**, 94–105 (1995).
  40. Bezrukov, S. M. & Kasianowicz, J. J. Current noise reveals protonation kinetics and number of ionizable sites in an open protein ion channel. *Phys. Rev. Lett.* **70**, 2352–2355 (1993).
  41. de la Escosura-Muñiz, A. & Merkoçi, A. Nanochannels for electrical biosensing. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **79**, 134–150 (2016).
  42. Branton, D. *et al.* The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1146–53 (2008).
  43. Ervin, E. N. *et al.* Creating a Single Sensing Zone Within an Alpha-Hemolysin Pore via Site-Directed Mutagenesis. *Bionanoscience* **4**, 78–84 (2014).
  44. Kasianowicz, J. J., Henrickson, S. E., Weetall, H. H. & Robertson, B. Simultaneous multianalyte detection with a nanometer-scale pore. *Anal. Chem.* **73**, 2268–2272 (2001).
  45. Kantelhardt, J. W., Koscielny-Bunde, E., Rego, H. H. ., Havlin, S. & Bunde, A. Detecting long-range correlations with detrended fluctuation analysis. *Phys. A Stat. Mech. its Appl.* **295**, 441–454 (2001).
  46. Siwy, Z., Ausloos, M. & Ivanova, K. Correlation studies of open and closed state fluctuations in an ion channel: Analysis of ion current through a large-conductance locust potassium channel. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **65**, 6 (2002).
  47. Hu, J., Gao, J. & Principe, J. C. Analysis of biomedical signals by the Lempel-Ziv complexity: The effect of finite data size. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **53**, 2606–2609 (2006).
  48. Gómez, C. *et al.* Characterization of EEG patterns in brain-injured subjects and controls after a Snoezelen® intervention. *Comput. Methods Programs Biomed.* **136**, 1–9 (2016).
  49. Aboy, M., Hornero, R., Abásolo, D. & Álvarez, D. Interpretation of the Lempel-Ziv complexity measure in the context of biomedical signal analysis. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **53**, 2282–2288 (2006).
  50. Kochetkov, K. V, Kazachenko, V. N., Aslanidi, O. V & Gapeyev, A. B. Non-Markovian Gating of Ca<sup>2+</sup> Activated K<sup>+</sup> Channels in Cultured Kidney Cells Vero . Rescaled Range Analysis. **211589**, 211–222 (1999).
  51. Varanda, A.Wamberto; Liebovitch, Larry S.;Figueiroa , José N.;Nogueira, A. R. Hurst Analysis Applied to the Study of Single Calcium-activated Potassium Channel Kinetics. *Journal of theoretical biology.* 343–353 (2000). doi:10.1006/jtbi.2000.2131
  52. Nogueira, R. A., Varanda, W. A. & Liebovitch, L. S. Hurst analysis in the study of ion

- channel kinetics. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **28**, 491–496 (1995).
53. Timmer, J. & Klein, S. Testing the Markov condition in ion channel recordings. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **55**, 3306–3311 (1997).
  54. Wagner, M. & Timmer, J. The effects of non-identifiability on testing for detailed balance in aggregated Markov models for ion-channel gating. *Biophys. J.* **79**, 2918–24 (2000).
  55. Sansom, M. S. *et al.* Markov, fractal, diffusion, and related models of ion channel gating. A comparison with experimental data from two ion channels. *Biophys. J.* **56**, 1229–1243 (1989).
  56. Montal, M. & Mueller, P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 3561–3566 (1972).
  57. Lempel, A. & Ziv, J. On the complexity of finite sequences. *IEEE Trans. Inf. Theory.* **22**, 75–81 (1976).

## Capítulo 2

Análise da dinâmica da translocação do PEG1294 no nanoporo formado pela alfa-hemolisina numa bicamada lipídica plana

# Análise da dinâmica da translocação do PEG1294 no nanoporo formado pela alfa-hemolisina numa bicamada lipídica plana

Gesilda F. Neves<sup>1</sup>, Dijanah C. Machado<sup>2</sup>, Cláudio G. Rodrigues<sup>2</sup>, Carlos M. M. Carneiro<sup>2</sup>, Luiz H. A. Consoni<sup>2</sup>, Romildo A. Nogueira<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil

\* Corresponding author: ran.pe@terra.com.br

## ABSTRACT

A dinâmica da translocação do analito (PEG1294) no nanoporo formado pela alfa-hemolisina do *S. aureus* numa bicamada lipídica plana foi analisada por dois métodos de dinâmica não linear, a Entropia Aproximada (ApEn) e o Gráfico de Recorrência. (GR). A estratégia do estudo consistiu no registro elétrico da série dos tempos bloqueios e desbloqueios do nanoporo pelo analito e na aplicação da ApEn e do RP para analisar a complexidade destas séries. As análises das séries pelo ApEn revelou que o processo de bloqueio e desbloqueio do nanoporo da alfa-hemolisina é um processo de alta complexidade (ApEn  $\sim 2$ ) em qualquer valor de voltagem. Enquanto a análise pelo GR mostrou o caráter aleatório desta série, revelados pelos valores de determinismos (DET's) próximos a zero em todas as voltagens investigadas.

**Keywords:** alfa-hemolisina, nanoporo, Entropia Aproximada (ApEn), Gráfico de recorrência

## INTRODUÇÃO

A  $\alpha$ -hemolisina ( $\alpha$ HL) , exotoxina secretada pela bactéria *Staphylococcus aureus* , foi o primeiro e é o mais usado nanoporo biológico aplicado como sensor estocástico para pequenos solutos e sequenciamento de DNA (DI MARINO et al., 2015; FENG et al., 2015; CHANDRAMOULI et al., 2016;SCHMIDT, 2016). A translocação de analitos (como o PEG-1294) resulta em sinais de correntes iônicas denominados de bloqueio estocástico ou sensoriamento estocástico que são representados por tempos de bloqueio (TP) e não-bloqueio (TA) numa série

temporal (BEZRUKOV; KASIANOWICZ, 1993; BEZRUKOV, 1995; DE LA ESCOSURA-MUÑIZ; MERKOÇI, 2016).

Apesar do grande potencial de aplicação dos nanoporos, ainda faltam estudos que descrevam a complexidade da interação analito-nanoporo. Ferramentas de dinâmica não linear, tais como Entropia Aproximada (ApEn) e Gráfico de recorrência (GR) foram métodos que aplicamos na análise dos sinais de correntes iônicas gerados em decorrência da interação do analito no nanoporo e que podem trazer informações sobre a complexidade do sinal.

A Entropia Aproximada (ApEn) é uma ferramenta útil para estimar a complexidade de sistemas dinâmicos não lineares, e tem as vantagens como simplicidade no algoritmo, cálculo extremamente rápido e capacidade anti-ruído (ZHANG; LI; WANG, 2017). Consiste numa medida que mostra a regularidade (ordem) (RICHMAN, RANDALL MOORMAN, 2000) ou a entropia (aleatoriedade) (FLEISHER, LEE A.; PINCUS, STEVEN M.; ROSENBAUM, 1993) de uma série. A ApEn tem sido bastante usada para analisar sequências gênicas (ANDRÉS; JOSÉ-LEONEL TORRES; BARRERA, 1998), padrões respiratórios (CALDIROLA et al., 2004), variabilidade da frequência cardíaca (ZHANG; LI; WANG, 2017), sinais de electrocardiograma (PINCUS, 2000) e electroencefalograma (EEG) (KOSKINEN et al., 2006), doença de Parkinson (WU et al., 2017) e muitos outros fenômenos.

O Gráfico de Recorrência (GR) é reconhecido como uma poderosa ferramenta para análise de séries temporais, pois permite não apenas analisar, mas também, quantificar estruturas ocultas nos dados. É uma técnica gráfica avançada de análise que revela todos os momentos do espaço de fase. A maioria das aplicações desta técnica tem sido em física e biologia, mas vem ganhando interesse em uma variedade de campos científicos (MARWAN et al., 2007; MARTEY; BILLIO; GUÉGAN, 2013). O uso prático e poderoso de métodos baseados em GR tem sido demonstrado por esta crescente aplicação interdisciplinar, tais como diagnóstico de saúde cardiovascular, estudos comportamentais, cognitivos e neurológicos, estudo de dinâmica de fluidos e plasma etc. (DALE, 2005; GREINER et al., 2010; MARCELO et al., 2013; RICHARDSON; TAHMASEBPOUR; ZARGHAMI; MOSTOUFI, 2013). O foco do presente trabalho é propor a ApEn e a GR como estimadores matemáticos para investigar a complexidade da série temporal decorrente do bloqueio do PEG1294 no nanoporo formado pela  $\alpha$ HL numa bicamada lipídica plana.

## 2. MÉTODOS

### 2.1 Protocolo experimental

Neste trabalho foram confeccionadas bicamadas lipídicas planas, livres de solvente, de acordo com técnica de Montal & Mueller (MONTAL; MUELLER, 1972), usando o lipídeo sintético 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) 2% (p/v) em hexano (Merck). Esta técnica consiste basicamente na formação de uma bicamada lipídica por aposição de dois filmes monomoleculares de lipídeo em um orifício (~100 µm diâmetro) de uma partição de Teflon<sup>®</sup> que separa dois compartimentos idênticos de uma câmara experimental de Teflon<sup>®</sup>, contendo solução eletrolítica. Antes da formação da bicamada, o orifício foi pré-tratado com uma solução de 1% (v/v) de hexadecano (Sigma) em hexano (Merck). Após formada a membrana, foi realizada a medida da sua capacitância que mostrou um valor próximo a 40 pF, indicando que a membrana foi formada de maneira adequada. Os dois compartimentos da câmara continham solução eletrolítica composta por 4 M de KCl, 5 mM de tampão Tris-ácido cítrico (pH 7.5). Polyethylene Glycol (PEG) monodisperso 1294 (Polypure, Oslo, Norway) foi usado como um analito representativo de polímeros neutros por causa de sua ampla aplicabilidade em estudos científicos e tecnológicos. PEG 1294 foi adicionado no lado *trans* da membrana. Alfa-hemolisina ( $\alpha$ HL) de *Staphylococcus aureus* (Calbiochem, Madison, WI) foi adicionada no lado *cis* em concentração suficiente para formar um único nanoporo proteico na bicamada lipídica. Foram aplicados potenciais de +20 a + 100 mV (em incrementos de 20 mV). Uma corrente positiva é definida pelo fluxo de cátions do lado *trans* para *cis*. Todos os experimentos foram realizados usando um amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA) em modo de fixação de voltagem. Potencial de membrana foi mantido usando eletrodos prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) em pontes salinas de 3% de Ágar em 3M KCl. Os sinais eletrofisiológicos foram filtrados por um filtro passa-baixa Butterworth (model 9002; Frequency Devices, Haverhill, MA) a 15 kHz e diretamente salvas na memória de um computador com uma taxa de amostragem de 250 kHz. A concentração de PEG

1294 utilizada no experimento foi de 2 mM. Todos os experimentos foram realizados a  $25 \pm 1$  °C.

## 2. Ferramentas matemáticas

### 2.1 Entropia Aproximada (ApEn)

A ApEn é uma medida estatística para descrever a complexidade de sinais em diversos processos, incluindo os fisiológicos, ou seja, é um índice estatístico utilizado para quantificar a regularidade ou irregularidade numa série de dados (SAMPAIO; NICOLETTI, 2016). Para uma série temporal de  $N$  amostras, a entropia é expressa em ApEn ( $m$ ,  $r$ ,  $a$ ), a qual mede a probabilidade condicional de que duas sequências de comprimento  $a$ , que são semelhantes para  $m$  pontos permanecem semelhantes no próximo ponto de amostragem, dentro de uma tolerância  $r$ . Deste modo, um baixo valor de entropia aproximada reflete um elevado grau de regularidade (LÓPEZ-DE-IPÍÑA et al., 2016; WU et al., 2017).

De acordo com Pincus (1991),  $m$  pode ser admitido como 2 e  $r$  como 10 % a 25 % do desvio padrão dos dados escolhidos para o cálculo do ApEn. O  $r$  define o critério de semelhança e atua como um filtro de ruído,  $m$  especifica o comprimento padrão, e  $a$  determina o comprimento dos dados (largura da janela) utilizadas para calcular cada valor ApEn.

O algoritmo do ApEn pode ser descrito como (PINCUS, 1991):

3. Dado  $A_N$ , uma série temporal com  $N$  amostras;
4. Determina-se os parâmetros de entrada  $m$  e  $r$  para o cálculo da entropia aproximada ApEn ( $m, r, A$ );

De acordo com Pincus,  $m$  pode ser admitido como 2 e  $r$  como 0,1 a 0,25 do desvio padrão dos dados escolhidos para o cálculo do ApEn (Pincus, 1991). O parâmetro  $m$  é o comprimento de um subconjunto de amostras de  $A_N$ , o  $r$  é o parâmetro

denominado de critério de similaridade (CUKIERT; DIAMBRA, 2006; CHEN; CHANG, 2013).

Subsequência ou padrão de  $m$  amostras de  $A_N$  que se inicia no índice  $i$  é denominada de  $P_{m(i)}$  (Pincus, 1991). Sejam dois padrões  $P_{m(i)}$  e  $P_{m(j)}$ , que se iniciam, respectivamente nos índices  $i$  e  $j$ . Tais padrões são considerados similares caso o módulo da diferença entre quaisquer pares de amostras correspondentes for menor do que  $r$ , ou seja:

$$|A_{i+k} - A_{j+k}| < r, \text{ para } 0 \leq k \leq m. \quad (\text{Eq.1})$$

Considere  $P_m$  o conjunto de todos os padrões de comprimentos  $m$  de  $A_N$ , pode-se então definir a relação:

$$C_{i,m}(r) = \frac{n_{i,m}(r)}{N-m+1} \quad (\text{Eq.2})$$

Em que  $n_{i,m}(r)$  é o número de padrões em  $P_m$  similares a  $P_{m(i)}$ , de acordo com o critério de similaridade  $r$ . Calcula-se, então,  $C_{i,m}(r)$  para cada padrão pertencente a  $P_m$ . Ao final, calcula-se também a média de todos os  $C_{i,m}(r)$ , denominada de  $C_m(r)$ . Esta média representa o nível de predominância de padrões similares de tamanho  $m$  em  $A_n$ . Define-se a entropia aproximada da série  $A_n$  para padrões de comprimento  $m$  e critério de similaridade  $r$ , por:

$$ApEn(m, r, A_n) = \ln \frac{C_m(r)}{C_{m+1}(r)} \quad (\text{Eq.3})$$

Portanto, a  $ApEn$  é o logaritmo natural da razão entre o nível de predominância de padrões repetidos de tamanho  $m$  e de tamanho  $m+1$ . Grandes valores de  $ApEn$  corresponde a processos randômicos ou irregularidade da série e pequenos valores sinais determinístico (Figura 15) ((CULLEN et al., 2010; SAMPAIO; JIN et al., 2016; TSUJI et al., 2016; NICOLETTI, 2016; WU et al., 2017).

## 2.2 Gráfico de recorrência

Recorrência é uma propriedade fundamental de muitos sistemas dinâmicos e de vários processos da natureza estudado por Poincaré (MARWAN et al., 2002,

2007, 2009). O gráfico de recorrência (GR) foi introduzido por Eckmann e tem sido muito utilizado para análise de sistemas dinâmicos (ECKMANN; KAMPHORST; RUEELLE, 1987).

O GR é uma ferramenta que mostra os tempos em que uma trajetória do espaço de fase do sistema dinâmico visita aproximadamente a mesma área no espaço de fase, através dos eixos horizontal e vertical. Ou seja, é uma matriz bidimensional, quadrada, na qual seus eixos representam a evolução dos estados do sistema dinâmico (ECKMANN; KAMPHORST; RUEELLE, 1987). Eles têm uma construção bastante simples: é baseada em um quadrado no qual tanto o eixo x quanto o eixo y contém os elementos da série temporal. A partir disso e de acordo com a dimensão e distâncias (raio) é verificado se há ou não recorrência de valores. O GR é definido pela seguinte equação (MARWAN et al., 2007):

$$\bar{R}_{i,j}^{m,\varepsilon} = \theta(\varepsilon - \|\bar{x}_i - \bar{x}_j\|), \bar{x}_i \in \mathcal{R}^m, i, j = 1, \dots, N. \quad (\text{Eq.4})$$

Onde  $\bar{x}_i$  representa cada um dos N estados formados do sistema, que são obtidos por meio do método de atrasos temporais.  $\varepsilon$  é o raio de vizinhança,  $\theta(\cdot)$  função de Heaviside (ex.  $\theta(x) = 1$  se  $x > 0$ , e  $\theta(x) = 0$  se  $x < 0$ ) a qual mapeia os pontos recorrentes dentro do gráfico e  $\|\cdot\|$  é a norma. Através da avaliação de Quantificação da Análise de Recorrência (RQA) definimos medidas do determinismo (DET) por meio da densidade dos pontos e diagonais do gráfico de recorrência (WEBBER; ZBILUT, 2005).

### 2.2.1 Determinismo

Consiste na razão entre o número de pontos pertencentes a diagonais e o número total de pontos recorrentes. Séries temporais com comportamento estocástico não apresentam linhas diagonais ou apresenta linhas curtas, já um evento determinístico apresenta linhas diagonais longas e menos pontos de recorrência isolados e simples. Quanto maior o DET%, mais previsível será o sistema. Para sistemas com comportamentos periódicos a previsibilidade é 1. Séries completamente estocásticas e imprevisíveis tendem a gerar gráficos de recorrência homogêneos, quase sem diagonais, com um valor de DET baixo.

É dado pela função:

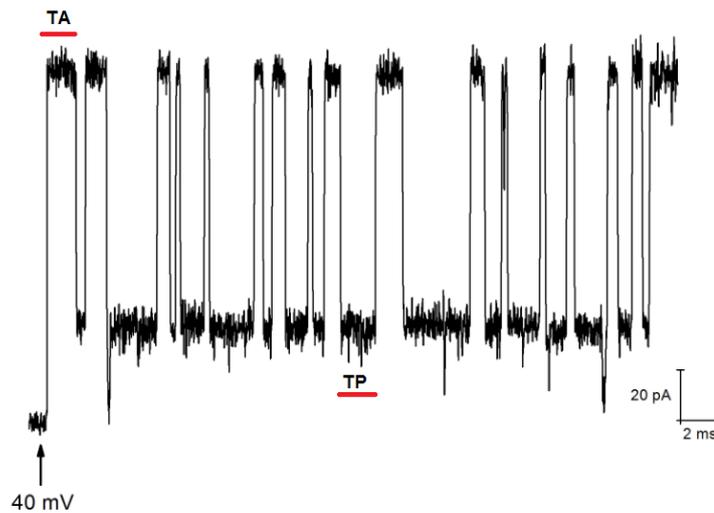
$$DET = \frac{\sum_{l=l_{min}}^N lP(l)}{\sum_{i,j}^N lP(l)} \quad \text{(Eq.5)}$$

Onde  $l$  é o comprimento da linha diagonal,  $N$  a dimensão do gráfico de recorrência,  $P(l)$  a probabilidade de existência de linhas diagonais com comprimento  $l$  e  $l_{min}$  é o menor tamanho para uma linha ser considerada uma diagonal (XU; SHANG; LIN, 2017).

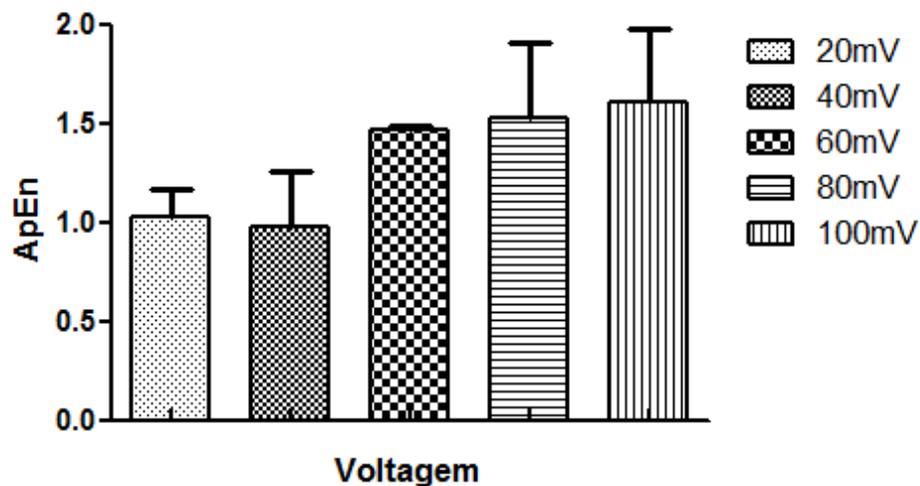
## RESULTADOS

### 1. Análise do ApEn

A figura 1 mostra o registro da corrente iônica através do canal formado pela alfa-hemolisina numa bicamada lipídica, para uma sequência de estados bloqueados e não bloqueados pelo PEG1294 na concentração de 2000  $\mu$ . A análise do ApEn foi inicialmente aplicada para sequências de 1000 valores de tempos de permanência nos estados bloqueados e 1000 nos estados não bloqueados. A ApEn foi aplicada a 2000 estados não segmentados. Os dados foram analisados para as voltagens de 20mV até 100mV com incrementos de 20mV. A ApEn mostrou valores de expoentes na faixa de 0-2. Nossos resultados são apresentados na figura 2, onde os valores de ApEn para os tempos de permanência nos estados TA e TP ficaram maior que 1. O teste de Kruskal-Wallis e pos hoc de Dunn mostra que não houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) nas voltagens estudadas.



**Figura 1.** Registro experimental da corrente gerada pelos eventos de não bloqueios – TA e bloqueios –TP da alfa-hemolisina pelo PEG1294. Através do registro obtivemos a série temporal segmentada e os dwell-times.



**Figura 2.** Variação (média ± desvio padrão) do ApEn para os tempos de permanências (n=3) não segmentados nas voltagens de 20-100mV.

Analisando os estados de bloqueio e não-bloqueio separadamente foi visto que todos os expoentes ficaram próximos de 2. Para quantificar o comportamento do sinal do PEG no nanoporo de alfa-hemolisina, aleatorizamos séries experimentais de

bloqueio e obtivemos seus ApEn's (Tabela 1). Foi visto que as séries aleatórias apresentaram um expoente do ApEn próximo a 2. Comparando os ApEn dos dados aleatórios ( $Apen_{ale}$ ) com os do experimentais ( $Apen_{exp}$ ) foi visto através da diferença entre eles ( $Apen_{ale} - Apen_{exp}$ ) que os expoentes de ApEn ficaram muito próximos, o que indica os estados ocupados e não-ocupados apresentam um comportamento altamente complexo, o que tende a ser randômico (Tabela 2). A diferença entre os expoentes experimentais e aleatorizados não foi significativa em todas as voltagens estudadas. O teste de Kruskal-Wallis e pos-hoc de Dunn mostraram que TP e TA não apresentaram diferença entre os resultados ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 1.** Comparação dos ApEn's médios das séries de bloqueio experimental ( $Apen_{exp}$ ), experimental aleatorizada ( $Apen_{ale}$ ) e a diferença entre os pontos experimentais e aleatórios ( $Apen_{ale} - Apen_{exp}$ ) nas voltagens de 20 a 100mV. O teste estatístico confirma que não há diferença entre os

Voltagem(mV)	$Apen_{exp}$ (média $\pm$ desvio padrão)	$Apen_{ale}$ (média $\pm$ desvio padrão)	$Apen_{ale} - Apen_{exp}$
20	1.720 $\pm$ 0.016	1.773 $\pm$ 0.045	0.053
40	1.686 $\pm$ 0.019	1.705 $\pm$ 0.041	0.019
60	1.707 $\pm$ 0.037	1.705 $\pm$ 0.024	0.001
80	1.752 $\pm$ 0.030	1.728 $\pm$ 0.020	0.023
100	1.702 $\pm$ 0.002	1.713 $\pm$ 0.046	0.011

grupos experimentais e aleatórios ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 2.** ApEn dos Tempos de ausência e presença do analito no nanoporo na concentração de 2000 $\mu$ M (média  $\pm$  desvio padrão).

Voltagem	20mV	40mV	60mV	80mV	100mV
TP	1.355 $\pm$ 0.271	1.112 $\pm$ 0.308	1.439 $\pm$ 0.148	1.601 $\pm$ 0.152	1.448 $\pm$ 0.473
TA	1.720 $\pm$ 0.016	1.686 $\pm$ 0.018	1.707 $\pm$ 0.037	1.752 $\pm$ 0.030	1.702 $\pm$ 0.002

## 2. Gráfico de Recorrência e RQA

O gráfico de recorrência e a análise de RQA corrobora com o ApEn dos tempos de permanências em todas as voltagens (Tabela 3). DET's muito pequenos e gráfico de recorrência sem caracterização (Figura 3) foram vistos nas voltagens estudadas

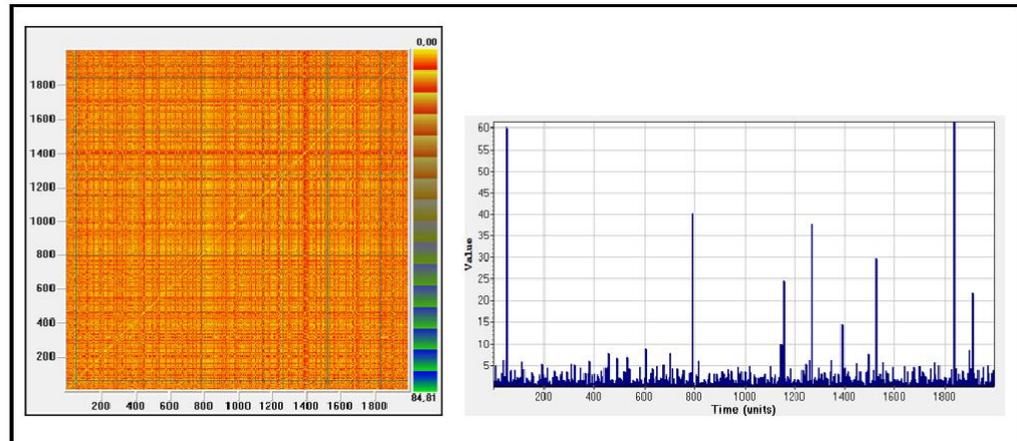
indicando aleatoriedade. De acordo com o teste de Kruskal-Wallis e pos-hoc de Dunn não há diferença significativa entre os DET's nas diferentes voltagens ( $p < 0.05$ ). Para comparar e testar o DET de uma série aleatorizada, nossos dados foram aleatorizados e obtido o GR e RQA (Figura 3). Através disso, mostramos que a análise visual e os DET são próximos aos experimentais, o que certifica a aleatoriedade dos dados experimentais nas condições de estudo.

RQA dos TP's e TA's caracterizaram os momentos como sendo aleatório, já que os DET's foram próximos a zero (Tabela 3). A partir do teste estatístico de Kruskal-Wallis e pos hoc de Dunn ( $p < 0.05$ ) foi visto que não há diferença entre as voltagens e concentrações para os TP's e TA's.

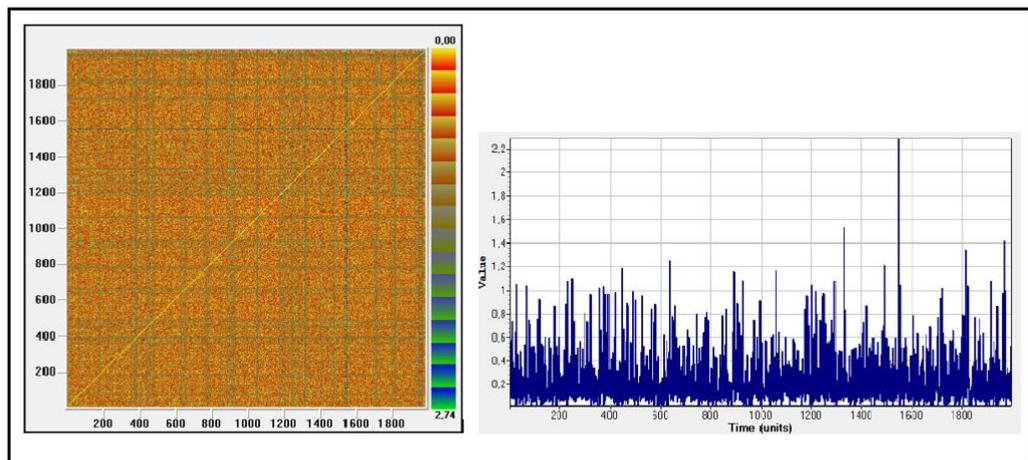
**Tabela 3.** Percentual de Determinismo (média  $\pm$  desvio padrão) dos tempos de permanências ( $DET(\%)_{Total}$ ) e dos estados TP e TA.

<b>Voltagem (mV)</b>	<b>DET(%)<sub>Total</sub></b>	<b>DET(%)<sub>(TP)</sub></b>	<b>DET(%)<sub>(TA)</sub></b>
<b>20</b>	0.473 $\pm$ 0.084	0.093 $\pm$ 0.130	0.106 $\pm$ 0.128
<b>40</b>	0.124 $\pm$ 0.162	0.248 $\pm$ 0.219	0.299 $\pm$ 0.256
<b>60</b>	0.469 $\pm$ 0.219	0.136 $\pm$ 0.095	0.169 $\pm$ 0.118
<b>80</b>	0.310 $\pm$ 0.295	0.323 $\pm$ 0.264	0.229 $\pm$ 0.169
<b>100</b>	0.031 $\pm$ 0.025	0.101 $\pm$ 0.158	0.268 $\pm$ 0.207

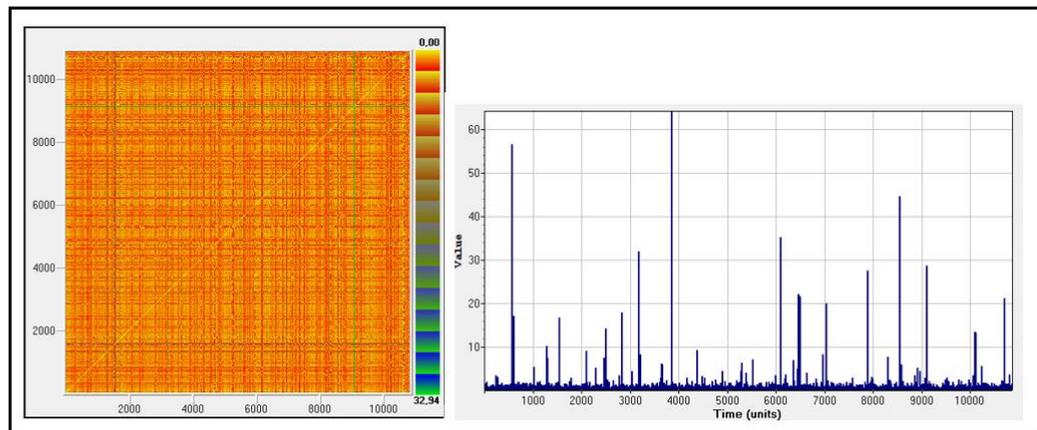
1.



2.



3.



**Figura 3.** Gráfico de recorrência dos dwell-times nas voltagens de 20, 100mV e aleatorizado e suas respectivas séries temporais: 1. GR experimental de 20mV (DET=16,6); 2. GR experimental de 100mV (DET=0.41); 3. GR de série experimental aleatorizada (DET=0.11).

## DISCUSSÃO

Diferentes plataformas têm sido utilizadas para detectar moléculas biológicas e caracterizar suas interações (JOKIĆ et al., 2012). O nanoporo de  $\alpha$ HL é uma ferramenta de estudo que apresenta alta sensibilidade para detecção de moléculas unitárias. A forma estrutural do analito e sua relação com o nanoporo faz gerar sinais característicos que permitem a identificação do analito (SQUIRES et al., 2017). A aplicação desse nanossensor nas diversas áreas tem crescido bastante nos últimos anos (MURMU; ADHIKARI, 2012). Diante disso, é relevante verificar através de estimadores matemáticos o comportamento do PEG1294 e sua chegada e passagem pelo lúmen da alfa-hemolisina. Estudo recente (Neves et al., 2017, prelo) mostrou através da análise da flutuação destendenciada e complexidade de Lempel-Ziv que o processo da interação analito-nanoporo não apresenta memória de curto ou longo alcance. Neves e colaboradores (2017), prelo, mostraram também que os bloqueios e não-bloqueios podem ser modelados por uma cadeia de Markov.

Várias medidas de complexidades foram desenvolvidas para comparar séries temporais e distinguir sua regularidade (por exemplo, periódica), caoticidade e comportamento aleatório. Os principais tipos de parâmetros de complexidade são as avaliações de entropias (PÉREZ-CANALES, 2011; ZHANG; LIANG; YUAN, 2014).

A ApEn foi proposta por Pincus para resolver problemas biológicos não detectados por outro método (SOKUNBI et al., 2015). A complexidade do sinal é descrita como a presença de padrões semelhantes em uma série temporal ou a irregularidade do sistema (complexidade) a partir de séries de dados (PÉREZ-CANALES, 2011). A entropia é um índice não linear que caracteriza o grau de caos em um sistema. As séries de tempo altamente irregulares dão um Apen alto e uma com mais padrões semelhantes, um Apen baixo (ACHARYA et al., 2015).

Os cálculos aproximados de entropia são baseados na probabilidade de que os modelos nas séries temporais que são semelhantes permanecem semelhantes nas próximas comparações incrementais. As séries temporais com grande entropia aproximada devem ter uma flutuação substancial de irregularidade (PÉREZ-CANALES, 2011). Não encontramos na literatura o ApEn como ferramenta para

caracterizar o comportamento em nanoporos, porém, devido a possibilidade da entropia caracterizar dados de séries temporais, usamos em nosso trabalho.

A maior parte da atividade celular é regulada por transporte de substâncias através de poros proteicos. Para estudar o funcionamento e as propriedades dos nanoporos utilizam-se polímeros neutros, que consiste em uma ferramenta de grande importância para o estudo de canais iônicos e nanoporos (BEREZHKOVSII; WEISS, 1999). A translocação de polímeros gera variação de correntes a qual denominamos de *dwell-times* ou tempos de permanência. Em nosso trabalho foi visto que o ApEn caracterizou bem o comportamento complexo dos tempos de permanência. A complexidade desse comportamento, em relação a avaliação dos tempos segmentadas (TA e TP) foi baixa. Em concentração de PEG1294 alta, como a utilizada neste trabalho, Merzlyak e colaboradores (MERZLYAK et al. 1999) sugerem que o PEG interage com o nanoporo. O que é interessante sugerir uma possível perda do comportamento aleatório, da teoria que o PEG passa pelo nanocanal sem tocar as paredes ou realizar qualquer tipo de ligação no interior da alfa-hemolisina. Pela hidrofobicidade do PEG (HAMMES; SCHIMME, 1967), ele tende a ligar-se as paredes do nanoporo, isso gera uma menor complexidade, ou seja, mais determinístico.

No geral, houve tendências aleatórias para nossos dados. Através disto supomos que o fator voltagem também pode ser um influenciador da translocação. Estudos mais detalhados precisam ser feitos para o entendimento da relação voltagem-tamanho do PEG e complexidade resultante. Já foi visto que a concentração da solução banhante influencia na afinidade do PEG com o nanoporo (BEZRUKOV, SERGEY M ET. AL.; VODYANOY, IGOR; BRUTYAN A, RAFIK; KASIANOWICZ, 1996; RODRIGUES et al., 2008). É possível que regiões hidrofóbicas do nanoporo e a depender da voltagem, o PEG se ligue mais fortemente ou não, o que é suposto que já aconteça em PEG de alto peso molecular: quanto maior o peso molecular mais favorável é a interação com o poro (ARAKAWAT; TIMASHEFF, 1985; BEZRUKOV, SERGEY M et. al.1996; VODYANOY, IGOR; BRUTYAN A, RAFIK; KASIANOWICZ, 1996).

Porém, já foi visto que através da translocação há a possibilidade de determinar as propriedades cinéticas de diversos polímeros e foi possível visualizar o comportamento estocástico em poro unitário (BEZRUKOV, SERGEY M et. al.1996; VODYANOY, IGOR; BRUTYAN A, RAFIK; KASIANOWICZ, 1996). Um perfil mais complexo (aleatório) é visto quando segmentamos a série temporal e analisamos os estados TP's e TA's separadamente. No bloqueio, aparentemente, não houve interações intensas entre o poro e PEG1294 para se ter um comportamento determinístico, permanecendo aleatório em todas as voltagens. Comparando as séries experimentais e aleatórias vimos que o tempo de permanência fragmentado (TP/TA) não apresenta diferença significativa. O que podemos classificar, nas condições estudadas, que há alta complexidade e aleatoriedade na translocação.

O gráfico de recorrência é uma outra ferramenta que ainda não foi vista em trabalhos que envolvem nanoporos. Através dela foi possível quantificar quanto aleatório/determinístico é cada serie na sua condição experimental. O DET que foi visto para o tempo de permanência está de acordo com outros trabalhos que se referem ao biossensoriamento estocástico (DING et al., 2010; TAO; WU, 2015; CHANDRAMOULI et al., 2016). Os menores DET foram para 100mV e 40mV, apesar disso, o percentual de DET não alcançou 70%. E em algumas séries ele esteve próximo de 1% indicando que TA+TP é aleatório. O DET do bloqueio e não bloqueio separados foram ainda mais característicos, pois variaram de aproximadamente 1% a 30%. Pesquisas indicam que DET's baixos e gráfico de recorrência sem definição está sinalizando a propriedade estocástica do sinal (MARWAN et al., 2007; OUYANG et al., 2008; MARWAN; KURTHS, 2015).

## **CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados obtidos verificamos que a complexidade dos sinais dos tempos de permanência, TA e TP podem ter relação com a voltagem e o peso molecular do PEG. Estudos futuros serão desenvolvidos com a finalidade de esclarecer as possíveis relações do PEG1294 com a alfa-hemolisina e voltagens.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve suporte da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Agradecemos ao Laboratório de Análises Computacionais e Realidades Complexas (LACREC) do Centro de Apoio a Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Cenapesq), LABTEC (Laboratório de Biofísica Teórica e Computacional) da UFRPE e ao Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-Tronco – Dr. Oleg Krasilnikov da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pelo suporte técnico para o desenvolvimento desse trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, U. R. et al. Knowledge-Based Systems Application of entropies for automated diagnosis of epilepsy using EEG signals: A review. **Knowledge-Based Systems**, v. 88, p. 85–96, 2015.
- ANDRÉS, J. C.; JOSÉ-LEONEL TORRES; BARRERA, J. A Statistical Feature of Genetic Sequences. **Biometrical journal**, v. 40, p. 855–863, 1998.
- ARAKAWAT, T.; TIMASHEFF, S. N. Mechanism of Poly(ethylene glycol) Interaction with Proteins. **Biochemistry**, v. 24, n. 24, p. 6756–6762, 1985.
- BEREZHKOVSII, A. M.; WEISS, S. M. B. J. B. H. The influence of polymer on the diffusion of a spherical tracer. **The Journal of chemical physics**, v. 5641, 1999.
- BEZRUKOV, SERGEY M ET. AL.; VODYANOY, IGOR; BRUTYAN A, RAFIK; KASIANOWICZ, J. J. Dynamics and Free Energy of Polymers Partitioning into a Nanoscale Pore. **Macromolecules**, v. 29, n. 26, p. 8517–8522, 1996.
- BEZRUKOV, S. M.; KASIANOWICZ, J. J. Current noise reveals protonation kinetics and number of ionizable sites in an open protein ion channel. **Physical Review Letters**, v. 70, n. 15, p. 2352–2355, 1993.
- CALDIROLA, D. et al. Approximate Entropy of Respiratory Patterns in Panic Disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 161, n. 1, p. 79–87, 2004.
- CHANDRAMOULI, B. et al. Introducing an artificial photo-switch into a biological pore: A model study of an engineered  $\alpha$ -hemolysin. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 4, p. 689–697, 2016.
- CHEN, C. C.; CHANG, H. C. Predicting dengue outbreaks using approximate entropy algorithm and pattern recognition. **Journal of Infection**, v. 67, n. 1, p. 65–71, 2013.

CULLEN, J. et al. Measurement of cardiac synchrony using Approximate Entropy applied to nuclear medicine scans. **Biomedical Signal Processing and Control**, v. 5, n. 1, p. 32–36, 2010.

DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, A.; MERKOÇI, A. Nanochannels for electrical biosensing. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 134–150, 2016.

DI MARINO, D. et al. All-Atom Molecular Dynamics Simulation of Protein Translocation through an  $\alpha$ -Hemolysin Nanopore. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 6, n. 15, p. 2963–2968, 2015.

DING, K.-J. et al. Progress of Research on Nanopore-macromolecule Detection. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 280–285, 2010.

ECKMANN, J.-P.; KAMPHORST, S. O.; RUELLE, D. Recurrence Plots of Dynamical Systems. **Europhysics Letters (EPL)**, v. 4, n. 9, p. 973–977, 1987.

FENG, Y. et al. Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 4–16, 2015.

FILHO, A. P.; CUKIERT, A.; DIAMBRA, L. Peri-ictal complexity loss as determined by approximate entropy analysis in the electrocorticogram obtained from chronic subdural recordings in patients with refractory temporal lobe epilepsy. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, n. 4, p. 191–199, 2006.

FLEISHER, LEE A.; PINCUS, STEVEN M.; ROSENBAUM, S. H. Approximate Entropy of Heart Rate as a Correlate of Postoperative Ventricular Dysfunction. **Anesthesiology**, v. 78, p. 683–692, 1993.

GREINER, A. J. et al. Influence of lysophospholipid hydrolysis by the catalytic domain of neuropathy target esterase on the fluidity of bilayer lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1798, n. 8, p. 1533–1539, 2010.

HAMMES, G. G.; SCHIMME, P. R. An Investigation of Water-Urea and Water-Urea-Polyethylene Glycol Interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, n. 2, p. 442–446, 1967.

JIN, H. et al. The applicability of research on moving cut data-approximate entropy on abrupt climate change detection. **Theoretical and Applied Climatology**, v. 124, n. 1–2, p. 475–486, 2016.

JOKIĆ, I. et al. Fluctuations of the number of adsorbed molecules in biosensors due to stochastic adsorption-desorption processes coupled with mass transfer. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 166–167, p. 535–543, 2012.

KASIANOWICZ, J. J.; BEZRUKOV, S. M. Protonation dynamics of the alpha-toxin ion channel from spectral analysis of pH-dependent current fluctuations. **Biophys. J.**, v. 69, n. 1, p. 94–105, 1995.

KOSKINEN, M. et al. Monotonicity of approximate entropy during transition from

awareness to unresponsiveness due to propofol anesthetic induction. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 53, n. 4, p. 669–675, 2006.

LÓPEZ-DE-IPÍÑA, K. et al. Selection of Entropy Based Features for Automatic Analysis of Essential Tremor. **Entropy**, v. 18, n. 5, p. 184, 2016.

MARCELO, G. et al. Classification of cardiovascular time series based on different coupling structures using recurrence networks analysis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 371, n. 1997, p. 20110623, 2013.

MARTEY, P.; BILLIO, M.; GUÉGAN, D. North American Journal of Economics and Finance Nonlinear dynamics and recurrence plots for detecting financial crisis. **North American Journal of Economics and Finance**, v. 26, p. 416–435, 2013.

MARWAN, N. et al. Recurrence-plot-based measures of complexity and their application to heart-rate-variability data. **Physical review E**, v. 66, n. 2, p. 026702, 2002.

MARWAN, N. et al. Recurrence plots for the analysis of complex systems. **Physics Reports**, v. 438, n. 5–6, p. 237–329, 2007.

MARWAN, N. et al. Complex network approach for recurrence analysis of time series. **Physics Letters A**, v. 373, n. 46, p. 4246–4254, 2009.

MARWAN, N.; KURTHS, J. Analysing spatially extended high-dimensional dynamics by recurrence plots. **Physics Letters A**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2015.

MERZLYAK, P. G. et al. Polymeric Nonelectrolytes to Probe Pore Geometry: Application to the  $\alpha$ -Toxin Transmembrane Channel. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 6, p. 3023-3033, 1999.

MONTAL, M.; MUELLER, P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 12, p. 3561–3566, 1972.

MURMU, T.; ADHIKARI, S. Nonlocal frequency analysis of nanoscale biosensors. **Sensors and Actuators, A: Physical**, v. 173, n. 1, p. 41–48, 2012.

OUYANG, G. et al. Using recurrence plot for determinism analysis of EEG recordings in genetic absence epilepsy rats. **Clinical neurophysiology**, v. 119, p. 1747–1755, 2008.

PÉREZ-CANALES, D. et al. Identification of dynamic instabilities in machining process using the approximate entropy method. **International Journal of Machine Tools and Manufacture**, v. 51, p. 556–564, 2011.

PINCUS, S. M. Approximate entropy in cardiology. **Herzschrittmachertherapie und Elektrophysiologie**, v. 11, p. 139–150, 2000.

PINCUS, S. M.; GLADSTONE, I. M.; EHRENKRANZ, R. A. A regularity statistic for medical data analysis. **Journal of Clinical Monitoring and Computing**, v. 7, n. 4, p.

335-345, 1991.

RICHARDSON, D. C.; DALE, R. Looking To Understand : The Coupling Between Speakers ' and Listeners ' Eye Movements and Its Relationship to Discourse Comprehension. **Cognitive science**, v. 29, p. 1045–1060, 2005.

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.

SAMPAIO, D. L.; NICOLETTI, R. Detection of cracks in shafts with the Approximated Entropy algorithm. **Mechanical Systems and Signal Processing**, v. 72–73, p. 286–302, 2016.

SCHMIDT, J. Membrane platforms for biological nanopore sensing and sequencing. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 39, p. 17–27, 2016.

SOKUNBI, M. O. et al. Fuzzy approximate entropy analysis of resting state fMRI signal complexity across the adult life span. **Medical Engineering & Physics**, v. 37, n. 11, p. 1082–1090, 2015.

SQUIRES, A. H. et al. Chapter Fourteen – Single-Molecule Characterization of DNA–Protein Interactions Using Nanopore Biosensors. **Methods in Enzymology**, v. 582, p. 353–385, 2017.

TAHMASEBPOUR, M.; ZARGHAMI, R.; MOSTOUFI, N. Particuology Characterization of various structures in gas-solid fluidized beds by recurrence quantification analysis. **Particuology**, v. 11, n. 6, p. 647–656, 2013.

TAO, B. G.; WU, Z. H. Recent advances of DNA sequencing via nanopore-based technologies. **Science Bulletin**, v. 60, n. 3, p. 287-295, 2015.

TSUJI, Y. et al. Quantification of autonomic nervous activity by heart rate variability and approximate entropy in high ultrafiltration rate during hemodialysis. **Clinical and Experimental Nephrology**, 2016.

WEBBER, C. L.; ZBILUT, J. P. Recurrence Quantification Analysis of Nonlinear Dynamical Systems. **Tutorials in contemporary nonlinear methods for the behavioral sciences**, p. 26–94, 2005.

WU, Y. et al. Measuring signal fluctuations in gait rhythm time series of patients with Parkinson's disease using entropy parameters. **Biomedical Signal Processing and Control**, v. 31, p. 265–271, 2017.

XU, M.; SHANG, P.; LIN, A. Multiscale recurrence quantification analysis of order recurrence plots. **Physica A**, v. 469, p. 381–389, 2017.

ZHANG, S.; LIANG, Y.; YUAN, X. Improving the prediction accuracy of protein structural class: Approached with alternating word frequency and normalized Lempel-Ziv complexity. **Journal of Theoretical Biology**, v. 341, p. 71–77, 2014.

ZHANG, Y.; LI, J.; WANG, J. Exploring stability of entropy analysis for signal with different trends. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 470, p.

60–67, 2017.

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados obtidos a partir de ferramentas de dinâmica não-linear mostraram que a ocupação e não ocupação do interior do nanoporo de alfa-hemolisina consiste em um bloqueio estocástico, possui alta complexidade e pode ser modelado pela cadeia de Markov. Portanto, na translocação de PEG1294 em concentrações de 400,1000 e 2000 $\mu$ M e voltagens de 20mV a 100mV, possivelmente, não há interação do analito com o nanoporo. Estudos futuros serão desenvolvidos para avaliar este comportamento em outras condições experimentais.