

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“ESTUDOS BIOQUÍMICOS E CINÉTICOS DE
ACETILCOLINESTERASES DE FORMIGAS
CORTADEIRAS (*ATTA SEXDENS*)”**

Adriana Miranda dos Santos

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS,
área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientadora: Dulce Helena Ferreira de Souza

*** bolsista (FAPESP)**

São Carlos - SP
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Adriana Miranda dos Santos, realizada em 29/09/2017:

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza
UFSCar

Prof. Dr. Odair Correa Bueno
UNESP

Prof. Dr. Julio Cesar Borges
USP

Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira
UFSCar

Prof. Dr. Andrea Nastro de Luca Batista
UFSCar

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João B. dos Santos e Eliza M. dos Santos. Aos meus irmãos Wilian e Eduardo. Ao meu marido John. Ao meu filho Pedro.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Dulce Helena Ferreira de Souza pela excelente orientação, paciência, ensinamentos e amizade;

À Profª Drª Quezia B. Cass pela co-orientação, conselhos, discussões e amizade;

Ao Prof. Dr. Odair Correa Bueno por ter gentilmente cedido as formigas cortadeiras.

Aos meus queridos amigos de laboratório (LBFE, CLAE e SEPARARE) pelo clima agradável e descontraído de trabalho;

Agradeço em especial à Ariele, Mariana, Priscila, Camilla, Evandro, Kátia, Paulo, Bianca, Kenia, Marili, Bruno e Welma por toda a ajuda que foi indispensável na realização deste trabalho.

Ao meu marido John Cass pelo apoio incondicional;

À FAPESP pela ajuda financeira.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.3 Oligonucleotídeos para amplificação do DNA do gene AChE.....	14
TABELA 2.3 Condições da reação de amplificação do DNA AChE com a DNA polimerase e os oligos mencionados anteriormente para a clonagem no pPICZ α -A.....	15
TABELA 3.3 Condições dos ciclos da reação de PCR para amplificação do DNA AChE	15
TABELA 4.3 Condições dos ciclos da reação de PCR para amplificação do DNA AChE	17
TABELA 5.4 Valores e médias de A260/A280, A260/A230 e concentrações das amostras de RNA total	35
TABELA 6.4 Resultado do teste de atividade após clivagem com trombina	44
TABELA 7.4 Resultado do teste de atividade após 16 horas clivando com trombina	45
TABELA 8.4 Teste de atividade da precipitação com SA	58
TABELA 9.4 Procedimentos de purificação de AChE de <i>A. sexdens</i>	61
TABELA 10.4 Parâmetros cinéticos da AsAChE-A e AsAChE-B.....	67
TABELA 11.4 Peptídeos identificados por LC-MS/MS da AsAChE-A e AsAChE-B.....	69
TABELA 12.4 Concentração de Ch produzida pelos IMERs após a imobilização a partir da injeção de ACh 85,5 μ M no sistema LC-MS	78
TABELA 13.4 Parâmetros cinéticos da AsAChE-A e AsAChE-B imobilizadas.....	80

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Demonstração das estruturas 3D de diferentes AChEs. -----	4
FIGURA 2.1 Representação dos dois sub sítios da molécula de AChE -----	5
FIGURA 3.1 Representação esquemática da região do sítio catalítico de AChE de mamíferos (esquerda) e de insetos (direita), mostrando os resíduos diferentes nas duas espécies (Phe e Cys, respectivamente). Figura baseada em Pang et al., 2012. -----	8
FIGURA 4.3 Esquema do preparo do meio reacional para a avaliação da atividade de AChE. -----	22
FIGURA 5.4 Análise da qualidade das amostras de RNA total por eletroforese em gel de agarose 1 %. -----	34
FIGURA 6.4 Gel de agarose 1 % da amplificação do gene AChE de <i>Atta sexdens</i> . 1: Padrão de massa molecular O'Gene Ruler™ 3000 pb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). 2: Branco. 3: amplificação utilizando partindo de 5µl de cDNA na reação de PCR. -----	36
FIGURA 7.4 Gel de agarose 1% da purificação de produtos de PCR (reamplificação do gene AChE de <i>Atta sexdens</i>). 1: Padrão de massa molecular O'Gene Ruler™ 3000 pb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). 2: produtos de PCR. -----	36
FIGURA 8.4 Representação do vetor pPICZα-A. -----	37
FIGURA 9.4 Gel de agarose 1% de DNA plasmidial extraído de algumas colônias de <i>E. coli</i> DH5α. -----	38
FIGURA 10.4 Gel de agarose 1% da confirmação da clonagem em <i>E. coli</i> DH5α por PCR utilizando os <i>primers</i> específicos para AChE. -----	38
FIGURA 11.4 Eletroforese em gel de agarose 1 % da PCR do DNA genômico de pPICZαAChE. -----	40
FIGURA 12.4 Sequência da proteína heteróloga AChE de <i>A. sexdens</i> deduzida a partir do sequenciamento do clone. -----	42
FIGURA 13.4 Eletroforese em gel SDS-PAGE dos sobrenadantes da expressão em X33 induzida por metanol à 30°C por 144 horas corado com comassie. -----	43
FIGURA 14.4 Eletroforese em gel SDS-PAGE dos sobrenadantes concentrados da expressão em X33 induzida por metanol à 30°C por 144 horas corado com comassie. -----	43
FIGURA 15.4 Resultado do teste de atividade para amostra AChE e controle nos tempos de indução: tempo 0 hora (T0) ao tempo 144 horas (T144). -----	44
FIGURA 16.4 Alinhamento obtido pelo programa MultAling entre as sequências de aminoácidos da AChE de <i>A. echinaior</i> e de <i>A. sexdens</i> . -----	46
FIGURA 17.4 Alinhamento obtido pelo programa MultAling entre as sequências de aminoácidos da AChE de <i>Atta sexdens</i> e <i>Drosophila melanogaster</i> . -----	47

- FIGURA 18.4 Árvore filogenética de sequências de aminoácidos de AChE de alguns insetos já classificados em AChE1 ou AChE2, sequências de AChE de formigas (asterísticos) e da sequência heteróloga (seta vermelha). -----49
- FIGURA 19.4 Mapa de Ramachandran do modelo da AChE de *A. sexdens*. Os ângulos Phi e Psi estão em graus. Os triângulos representam os resíduos de glicina. -----51
- FIGURA 20.4 Estatísticas de alguns parâmetros estereoquímicos da cadeia principal (representado pelo quadrado em preto) do modelo 3D da AChE de *A. sexdens* quando comparados com estruturas refinadas na mesma resolução: -----52
- FIGURA 21.4 Mapa de Ramachandran do molde (PDB 1QO) de *D. melanogaster*. Os ângulos Phi e Psi estão em graus. -----53
- FIGURA 22.4 Modelo da estrutura 3D da AChE de *A. sexdens*. Em forma de stick rosa a tríade catalítica e em forma de linha amarela as ligações de dissulfeto. 54
- FIGURA 23.4 Em evidência o sítio catalítico da estrutura 3D da AChE de *A. sexdens* formado pela tríade catalítica (Ser239, Glu327 e His481) em forma de *stick* rosa.55
- FIGURA 24.4. Sobreposição das estruturas 3D de AChE *A. sexdens* (em azul) com a de *D. melanogaster* (em vermelho).-----55
- FIGURA 25.4. Sobreposição das estruturas 3D de AChE *A. sexdens* (em azul) com a de *Homo sapiens* (em laranja). Em A a sobreposição das estruturas e em B o sítio catalítico é colocado em evidência. -----56
- FIGURA 26.4 Gel SDS-PAGE 15 % corado com comassie das precipitações a 50 %, 55 % e 60 % de SA. Sendo ppt: precipitado e S: sobrenadante. Padrão de alta massa molecular (GE). -----59
- FIGURA 27.4 Cromatograma obtido da aplicação do sobrenadante após precipitação com sulfato de amônio na coluna de troca iônica GE HiTrap DEAE-FF. -----60
- FIGURA 28.4 Gel de SDS-PAGE 15 % das frações ativas da cromatografia em coluna de troca iônica GE HiTrap DEAE-FF. O gel foi corado com comassie. ----60
- FIGURA 29.4 Gel de native-PAGE 15 % do extrato bruto, pré coluna da DEAE, AsAChE-A e AsAChE-B. -----63
- FIGURA 30.4 Cromatograma obtido da aplicação das amostras BSA, AsAChE-A e AsAChE-B na coluna de exclusão molecular Superose™ 12. -----65
- FIGURA 31.4. Curvas de atividade relativa em função do pH e da temperatura para as enzimas AsAChE-A e AsAChE-B.-----66
- FIGURA 32.4 Gráficos obtidos pela equação de Michaelis-Menten pelo método de regressão não-linear de melhor ajuste pelo software GraphPad Prism para a produção de tiocolina pela AsAChE-A e AsAChE-B -----67
- FIGURA 33.4. Árvore filogenética construída a partir de sequências de AChE1, sequências de AChE2 e os peptídeos identificados por LC-MS/MS para AsChE-A.72
- FIGURA 34.4. Árvore filogenética construída a partir de sequências de AChE1, sequências de AChE2 e os peptídeos identificados por LC-MS/MS para AsChE-B.73
- FIGURA 35.4 Cromatograma do íon extraído e espectro de massas referente a injeção de ACh 85,5µM no sistema LC-MS com o IMER- AsAChE-A monitorando o

íon fragmento da colina produzida, $[C_2H_3OH]^- [M]^+$ 60.10 m/z. Parâmetros do LC-MS descritos na seção 3.2.11. -----77

FIGURA 36.4 Gráfico referente aos resultados obtidos do ensaio de atividade utilizando acetilcolina como substrato sendo a colina produzida na hidrólise quantificada diretamente pelo sistema LC-MS. A esquerda está representado os cromatogramas do íon extraído referente ao ensaio de atividade em solução para ambas as enzimas (AsAChE-A e AsAChE-B) utilizando acetilcolina (68,4 μ M) como substrato. Parâmetros do LC-MS descritos na seção 3.3.14. -----79

FIGURA 37.4 Gráficos obtidos pela equação de Michaelis-Menten pelo método de regressão não-linear de melhor ajuste pelo software GraphPad Prism para a produção de colina pelo AsAChE-A_IMER e AsAChE-B_IMER, variando-se a concentração de acetilcolina. -----80

FIGURA 38.4 Estrutura geral da hidantoína-----83

RESUMO

ESTUDOS BIOQUÍMICOS E CINÉTICOS DE ACETILCOLINESTERASES DE FORMIGAS CORTADEIRAS (*ATTA SEXDENS*). Acetilcolinesterase (AChE) (EC 3.1.1.7) é a enzima responsável por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina levando a liberação de acetato e colina. Nos insetos, a acetilcolina é um dos mais importantes neurotransmissores, e a inibição da AChE produz um colapso sináptico generalizado que leva o inseto a morte. A AChE é, assim, um alvo importante para o desenvolvimento de novos inseticidas. Neste contexto, este trabalho descreve os resultados obtidos na produção da enzima recombinante ativa, expressa em *Pichia pastoris* e obtida através do gene codificante para AChE de *A. sexdens*, clonado no vetor pPICZ α -A. Através do sequenciamento do clone positivo a sequência da AChE recombinante foi obtida e, por método de modelagem por homologia, um modelo tridimensional foi construído e validado. Ademais, este trabalho apresenta de forma inédita, o isolamento, purificação e caracterização bioquímica de duas AChE nativas de *Atta sexdens* (AsAChE-A e AsAChE-B). As constantes cinéticas foram determinadas usando o método colorimétrico com as enzimas em solução e acetiltiocolina como substrato. Além disso, as enzimas isoladas foram imobilizadas em capilar de sílica fundida para produzir AsAChE-A e AsAChE-B IMER. As atividades dos IMER foram mensuradas através da quantificação do produto de hidrólise da acetilcolina por cromatografia zonal de bioafinidade, com detecção por espectrometria de massas (LC-MS), para o cálculo das constantes de Michaelis-Menten. As diferenças de afinidade pelos substratos usados: acetiltiocolina (método colorimétrico) e acetilcolina (LC-MS) revelam a AsAChE-B como a enzima de maior afinidade pelo substrato natural (acetilcolina), resultado confirmado, também, mensurando a produção de colina com a enzima em solução. Além disso, foi realizado um ensaio de triagem que foi validado usando tacrina e galantamina como inibidores padrão de AChE e os IMER produzidos foram usados para triagem de inibidores em uma coleção sintética de hidantoínas (n= 12). Os resultados apresentados neste trabalho mostram a importância do uso da acetilcolina, substrato natural, nos ensaios de atividade e inibição de AChE.

ABSTRACT

BIOCHEMICAL AND KINETIC STUDIES OF ACETYLCHOLINESTERASES OF LEAF-CUTTING ANTS. Acetylcholinesterase (AChE) (EC 3.1.1.7) is the enzyme responsible for catalyzing the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine leading to the release of acetate and choline. In insects, acetylcholine is one of the most important neurotransmitters, and inhibition of AChE produces a generalized synaptic collapse causing the insect death. AChE is, thus, an important target for the development of new insecticides. In this context, this work describes the results obtained in the production of the active recombinant enzyme, expressed in *Pichia pastoris* and obtained through the gene coding for AChE of *A. sexdens*, cloned in the pPICZ α -A vector. By sequencing the positive clone the sequence of the recombinant AChE was obtained and, by homology, a three-dimensional model was constructed and validated. In addition, this work presents, for the first time, the isolation, purification and biochemical characterization of two native AChE from *Atta sexdens* (AsAChE-A and AsAChE-B). The kinetic constants were determined using the colorimetric method with the enzymes in solution and acetylthiocholine as the substrate. The isolated enzymes were immobilized on fused silica capillary to produce AsAChE-A and AsAChE-B IMER. IMER activities were measured by quantification of the hydrolysis product of acetylcholine by zonal bioaffinity chromatography with mass spectrometry detection (LC-MS) to produce Michaelis-Menten constants. The differences in affinity for the substrates used: acetylthiocholine (colorimetric method) and acetylcholine (LC-MS) reveal AsAChE-B as the enzyme with the highest affinity for the natural substrate, a result confirmed, also, by measuring choline production with the enzyme in solution. The screening assay was validated using tacrine and galantamine as standard inhibitors of AChE, and the IMERs produced were used for screening inhibitors in a synthetic hydantoin (n = 12) collection. The results presented in this work show the importance of the use of acetylcholine (natural substrate) in AChE activity and inhibition assays.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Formigas cortadeiras	1
1.2 - Acetilcolinesterase	3
1.3 - Mecanismo de ação da AChE	5
1.4 - Inibidores da AChE	6
1.5 - Cromatografia zonal de bioafinidade	8
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS	10
CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA	12
3.1 - Estudos com a enzima AChE recombinante	12
3.1.1 - Amostras de <i>Atta sexdens</i>	12
3.1.2 - Extração de RNA total de <i>A. sexdens</i>	12
3.1.2.1 - Preparo do material livre de RNase	12
3.1.2.2 - Extração de RNA total	13
3.1.3 - Reação de transcrição reversa (RT-PCR)	13
3.1.4 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	14
3.1.5 - Digestão do produto de PCR e do vetor pPICZ α -A com as enzimas de restrição	15
3.1.6 - Reação de ligação do inserto ao pPICZ α -A.....	16
3.1.7 - Transformação do produto de reação em linhagem DH5 α de <i>E. coli</i> e confirmação da clonagem.....	16
3.1.8 - Transformação do clone pPICZ α -A-AChE em linhagem X33 de <i>P. pastoris</i> eletrocompetentes.....	17
3.1.8.1 - Preparação de células eletrocompetentes	17
3.1.8.2 - Transformação do clone pPICZ α -A-AChE por eletroporação	18
3.1.9 - Análise das colônias transformantes	19
3.1.10 - Extração do DNA genômico.....	19
3.1.11 - Expressão da AChE em linhagem X33 de <i>P. pastoris</i>	20
3.1.12 - Clivagem da AChE recombinante com trombina	21
3.1.13 - Ensaio enzimático para determinação de atividade para acetilcolinesterase.....	21
3.2 - Estudos Teóricos.....	23
3.2.1 - Modelagem Molecular	23
3.2.2 - Validação do modelo tridimensional	23

3.2.2.1 - PROCHECK	23
3.2.2.2 - VERIFY 3D	24
3.2.3 - Árvores filogenéticas	24
3.3 - Estudos com as AChEs nativas	25
3.3.1 - Amostras biológicas	25
3.3.2 - Ensaio enzimáticos para determinação de atividade para acetilcolinesterase.....	25
3.3.3 - Precipitação com sulfato de amônio	25
3.3.4 - Cromatografia de troca iônica	26
3.3.5 - Determinação da atividade de AChE em gel de poliacrilamida após eletroforese em condições não desnaturante	26
3.3.6 - Dosagem de proteínas totais	27
3.3.7 - Cromatografia de exclusão molecular	27
3.3.8 - Influência da temperatura e pH na atividade das enzimas isoladas.....	28
3.3.9 - Determinação dos parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ e K_M	28
3.3.10 - Imobilização das enzimas isoladas	28
3.3.11 - Condições de análise LC-MS	28
3.3.12 - Ensaio de estabilidade das soluções de trabalho.....	29
3.3.13 - Validação do método analítico	29
3.3.14 - Ensaio enzimático para determinação de atividade para AChE por LC-MS.....	30
3.3.15 - Atividade e caracterização cinética dos IMERs por LC-MS	31
3.3.16 - Triagem	32
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
4.1 - Estudos com a AChE recombinante	33
4.1.1 - Extração de RNA total da AChE de <i>Atta sexdens</i> e obtenção de cDNA.....	33
4.1.2 - Amplificação por PCR da sequência que codifica para a síntese da AChE de <i>A. sexdens</i>	35
4.1.3 - Construção do pPICZ α -A-AChE	37
4.1.4 - Transformação do clone pPICZ α -A-AChE em linhagem X-33 de <i>P. pastoris</i>	39
4.1.5 - Análise da transformação	39
4.1.5.1 - Extração de DNA genômico.....	39
4.1.5.2 - Seleção de clones recombinantes na presença de maior concentração de antibiótico	40

4.1.6 - Expressão da AChE em <i>P. pastoris</i> X33.....	41
4.2 - Estudos <i>in silico</i> da AChE.....	46
4.2.1 - Alinhamentos.....	46
4.2.2 - A qual classe de genes (ace1 ou ace2) pertence a AChE de <i>A. sexdens</i> ?	47
4.2.3 - Modelagem molecular: obtenção do modelo 3D da AChE de <i>A. sexdens</i>	50
4.2.4 - Validação do modelo tridimensional.....	50
4.2.5 - O modelo estrutural da AChE de <i>A. sexdens</i> e o sítio ativo da enzima	54
4.3 - Estudo de obtenção das AChEs nativas.....	58
4.3.1 - Obtenção e purificação de AChEs nativas.....	58
4.3.2 - Determinação da atividade de AChE em gel de poliacrilamida.....	61
4.3.3 - Caracterização enzimática	63
4.3.3.1 - Determinação da massa molecular AsChE-A e AsChE-B	64
4.3.3.2 - Influência do pH e temperatura na atividade enzimática	65
4.3.3.3 - Determinação dos parâmetros cinéticos para AsAChE-A e AsAChE-B	66
4.3.3.4 - Análise das enzimas AsAChE-A e AsAChE-B por espectrometria de massas (LC-MS/MS).....	68
4.3.3.5 - Classificação das enzimas AsAChE-A e AsAChE-B.....	70
4.4 - Cromatografia de bioafinidade	74
4.4.1 - Preparo dos IMERs-AChE.....	74
4.4.2 - Qualificação do método LC-MS.....	75
4.4.3 - Atividade dos IMERs preparados.....	77
4.4.4 - Estudos cinéticos dos IMERs preparados.....	79
4.4.5 - Triagem de ligantes com o IMER_AsAChE-A e AsAChE-B.....	81
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	86
CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXO I	101

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Formigas-cortadeiras

As formigas pertencem à classe Insecta, ordem Hymenoptera e à família Formicidae. Dentro da subfamília Myrmicinae, a tribo Attini inclui dois gêneros de formigas, *Atta* (no Brasil conhecidas como saúvas) e *Acromirmex* (conhecidas como quenquéns). Ambos os gêneros cortam partes frescas de vegetais, principalmente folhas, para o cultivo do fungo pertencente ao filo basidiomycota do qual se alimentam e cultivam nas câmaras subterrâneas de seus ninhos (MUELLER et al., 2005; SCHULTZ & BRADY, 2008; MEHDIABADI & SCHULTZ, 2009), sendo por isso popularmente conhecidas como formigas cortadeiras.

As formigas-cortadeiras encontram-se distribuídas desde o sul dos Estados Unidos até a região central da Argentina (FARJI-BRENNER & RUGGIERO, 1994), sua importância ecológica se resume à realizarem a aeração e incorporação de nutrientes ao solo, polinização - possibilitando assim a germinação de algumas plantas, dispersão de sementes (PIKARTI et al., 2010) e são tidas como predadoras de aranhas, centopeias, gafanhotos e outros artrópodes. Por outro lado, apresentam grande importância econômica devido ao seu poder de destruição de um grande número de espécies vegetais (LIMA, 2001; DELLA LUCIA et al., 2011) causando prejuízo econômico à agricultura (MARICONI, 1970; BERTI FILHO et al., 1992) e silvicultura (ANTUNES & DELLA LUCIA, 1999). Em pastagem, além dos danos diretos devido ao corte de forrageiras, as formigas cortadeiras podem provocar danos indiretos, como a erosão do solo ao redor dos formigueiros, danos físicos aos animais e aos implementos agrícolas e a possível redução no valor das terras de pastagens infestadas (ANTUNES & DELLA LUCIA, 1999). O solo sobre formigueiros pode, com o peso dos animais ou de um implemento agrícola, ceder abruptamente, causando danos aos animais e aos implementos.

Os prejuízos à agricultura e silvicultura, de maneira geral, estão associados ao período em que ocorrem os ataques das formigas cortadeiras, se os mesmos ocorrerem na fase inicial do plantio os danos serão irreparáveis devido à fragilidade das plantas (ANJOS et al., 1993; CANTARELLI et al., 2008; DELLA LUCIA et al., 2011), no caso de plantas adultas, o ataque leva à diminuição da produção além de deixá-la mais suscetíveis ao ataque de outros insetos e doenças

(FERREIRA, 1989). Além disso, ataques intensos e frequentes pode levar a perda de 100 % da produção (ZANETTI et al., 2003; VITORINO et al., 2015).

O Brasil é o país que possui o maior número de espécies de saúvas na América do Sul, seguido da Argentina e do Paraguai. De acordo com COSTA e colaboradores (2008) em áreas do cerrado brasileiro as saúvas consumiram 17 % das folhas produzidas por árvores, arbustos e cipós, representando de duas a três vezes mais que o dano causado por todos os outros herbívoros. Nos cultivos de cana-de-açúcar elas são uma das principais pragas, atribuindo à elas perdas de três toneladas por ano, devido à presença de um ninho por hectare (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2007). No entanto, os principais alvos das formigas-cortadeiras, que acarreta em prejuízo financeiro importante, são as espécies de *Eucalyptus* e *Pinus* (BOARETTO & FORTI, 1997). Segundo dados da IBÁ (2015), 98% da produção de celulose e 100 % da produção de papel no Brasil são oriundos de florestas plantadas dessas espécies que são cultivadas em áreas específicas, colhidas para uso industrial e em seguida uma nova floresta é plantada. O saldo da balança comercial do setor brasileiro dessas árvores plantadas atingiu US\$ 2,9 bilhões de janeiro a maio de 2017, uma alta de 4,9 % em relação ao mesmo período do ano passado (IBÁ, 2017), estes dados demonstram crescimento e importância financeira no setor. De acordo com AMANTE (1967), um sauveiro adulto necessita do material vegetal de aproximadamente 86 árvores de eucaliptos, ou 186 de pinus para abastecer seu fungo durante um ano, isto corresponde a cerca de uma tonelada de folhas cortadas das árvores. Estima-se também que as formigas cortadeiras consomem de 12 a 17 % da produção florestal proveniente das florestas plantadas além dos trópicos (DELLA LÚCIA, 2011). Assim, sem o devido controle as saúvas prejudicam os empreendimentos florestais inteiros e, conseqüentemente, inviabilizam a produção. A importância das formigas cortadeiras levou as empresas florestais a formarem equipes exclusivas para o combate dessas formigas (NICKELE et al., 2013).

O controle das formigas cortadeiras pode ser realizado através de métodos mecânicos (por ocasião da instalação dos formigueiros novos é possível identificá-los e destruí-los mecanicamente cavando-os), biológicos e naturais (que envolvem fatores climáticos e ação de predadores e parasitóides, como pássaros e moscas da família Phoridae, ou com a utilização de fungos entomopatogênicos) e

químicos, que consistem na utilização de produtos químicos. Este último é o único com tecnologia disponível para uso em grande escala (ARAÚJO et al., 2003).

O controle químico de formigas cortadeiras pode ser realizado com o uso de inseticidas que atuam bloqueando a hidrólise do neurotransmissor de acetilcolina, através da inibição da enzima acetilcolinesterase (SANTOS et al., 2013; ZANETTI et al., 2014).

1.2 - Acetilcolinesterase

Acetilcolinesterase, também conhecida como AChE (EC 3.1.1.7), é a enzima responsável por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) levando a liberação de acetato e colina. A ACh é encontrada no cérebro e nas junções neuromusculares e tem como efeitos a contração dos músculos lisos, dilatação dos vasos sanguíneos e regulação da taxa de batimentos cardíacos; no cérebro está envolvida nas sinapses associadas ao controle motor, memória e cognição. Sua atividade e permanência na fenda sináptica são reguladas por hidrólise catalisada pela AChE, que regenera a colina, seu precursor (VIEGAS JÚNIOR et al., 2004).

Durante a neurotransmissão, a ACh é liberada do nervo terminal e se liga a receptores na membrana pós-sináptica, retransmitindo o sinal do nervo. A AChE, localizada na membrana pós-sináptica, é responsável por terminar a transmissão do sinal hidrolisando a ACh. A colina liberada é retomada novamente pelo nervo pré-sináptico e a ACh é sintetizada a partir da acetil-CoA pela ação da enzima colina acetil transferase (KATZUNG, 2001). Quando a enzima é inibida, ocorre um acúmulo do neurotransmissor na fenda levando a um colapso sináptico generalizado, que no inseto leva-o a morte. A AChE é um dos mais importantes neurotransmissores no inseto e por isso os inseticidas têm como alvo a sua inibição.

A AChE é uma serino hidrolase que apresenta diversas formas moleculares que se dividem em formas assimétricas e formas globulares (MASSOULIÉ & BON, 1982). Em insetos são encontradas apenas as formas globulares: monómeros, dímeros ou tetrâmeros. Estas são secretadas como formas solúveis ou ancoradas à membrana por um domínio hidrofóbico (KIM et al., 2010).

A primeira estrutura tridimensional (3D), obtida por difração de raios-X, de AChE foi do peixe elétrico *Torpedo californica* (SUSSMAN et al., 1991). Embora outras estruturas 3D da AChE sejam conhecidas, atualmente só há uma única estrutura da AChE de inseto conhecida, a da *Drosophila melanogaster* (PDB 1QO9), que foi obtida por HAREL e colaboradores (2000). Apesar da identidade sequencial entre a AChE do *Torpedo californica* e a da *Drosophila melanogaster* ser somente de 36 %, a comparação dessas estruturas 3D com as estruturas 3D de AChE de *Mus musculus* (BOURNE et al., 1995, 1999) e *Homo sapiens* (KRYGER et al., 1998) mostram que as estruturas se enovelam de maneira semelhante (Figura 1.1) e o sítio catalítico se sobrepõem de maneira efetiva. De acordo com HAREL e colaboradores (2000), as principais diferenças entre a estrutura 3D de AChE de *Torpedo californica* e de *Drosophila melanogaster* encontram-se nos seus *loops* externos e na inclinação da hélice localizada no C-terminal da molécula, mas isso não afeta de maneira direta a função catalítica das moléculas.

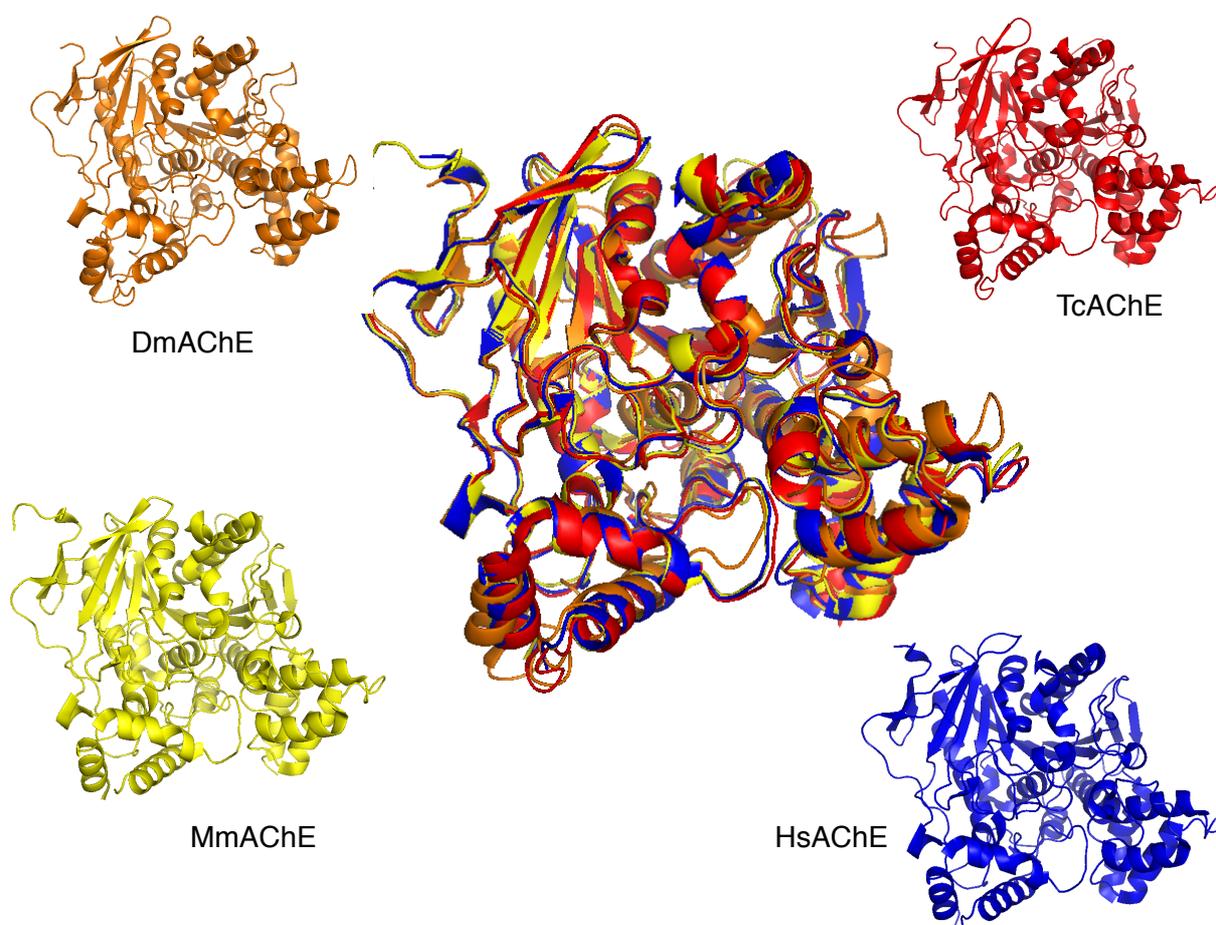


FIGURA 1.1 Demonstração das estruturas 3D de diferentes AChEs. Enovelam-se de maneira semelhante. Ao meio as estruturas sobrepostas. DmAChE: *Drosophila melanogaster* (PDB 1QO9); TcAChE: *Torpedo californica* (PDB 1E3Q); MmAChE: *Mus musculus* (PDB 5FUM) e HsAChE: *Homo sapiens* (PDB 4EY4).

1.3 - Mecanismo de ação da AChE

A AChE apresenta em seu sítio ativo a tríade catalítica formada pelos resíduos de glutamato (Glu), serina (Ser) e histidina (His) (SUSSMAN et al. 1991).

Este sítio é dividido em dois sub sítios (Figura 2.1): o sub sítio aniônico onde encontra-se o resíduo de aminoácido glutamato (Glu), que interage com um grupo nitrogênio quaternário da molécula de acetilcolina, e o sub sítio estérico/ catalítico onde encontram-se os resíduos de aminoácidos serina (Ser) e histidina (His) que interagem com o grupo éster da acetilcolina sendo responsáveis pela catálise do substrato (NACHMANSOHN & WILSON, 1951).

A hidrólise da acetilcolina é realizada em um ciclo de acetilação-desacetilação, onde após a formação do complexo enzima-substrato o resíduo de Ser é acetilado e a porção colina do substrato é liberada. Em seguida, a enzima acetilada sofre um ataque nucleofílico por uma molécula de água liberando ácido acético. A enzima então fica pronta para uma nova hidrólise fechando assim o ciclo (SILMAN et al., 1999).

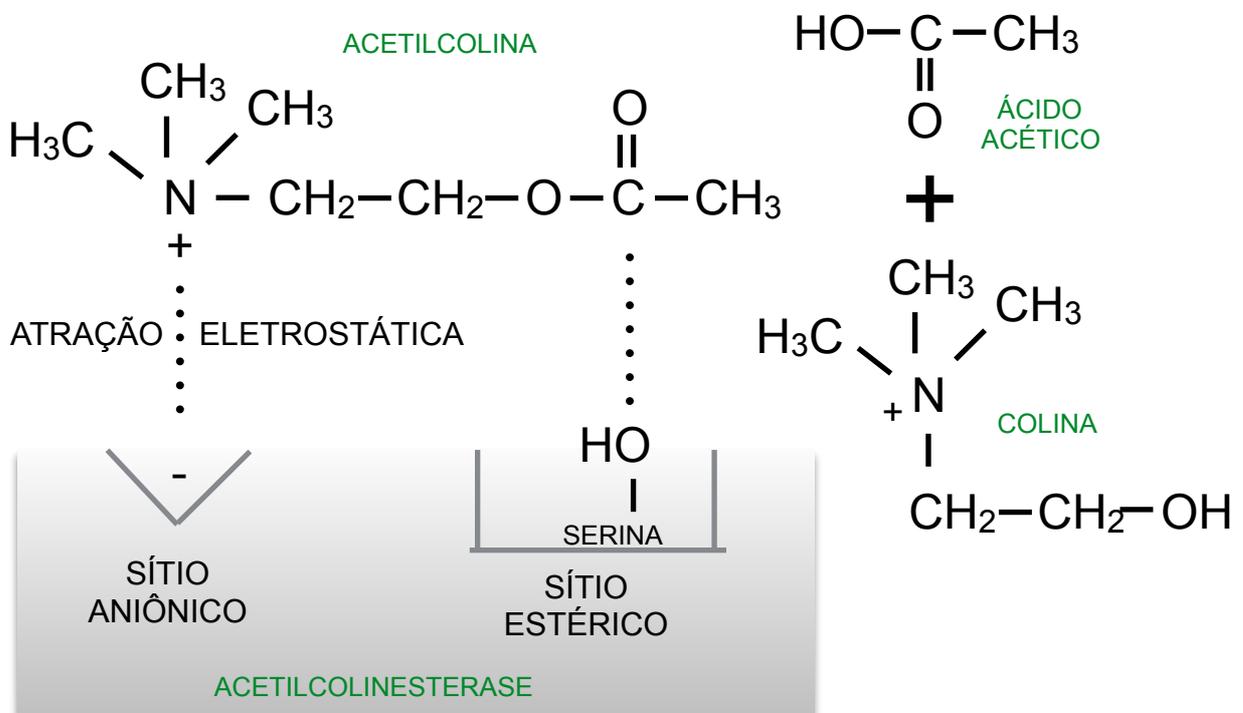


FIGURA 2.1 Representação dos dois sub sítios da molécula de AChE
Modificada de <http://analytical.wikia.com/wiki/File:Acetylcholinesterase.png>

1.4 - Inibidores da AChE

A inibição da atividade da AChE também tem sido explorada para o desenvolvimento de inseticidas, uma vez que a inativação da enzima pode levar à um colapso sináptico generalizado levando o inseto à morte (FOURNIER & MUTÉRO, 1994; CHARPENTIER et al., 2000). Duas classes de inseticidas baseados na inibição da AChE têm sido descritas, os organofosforados (OF) e os carbamatos (CARB), sendo que ambos atuam através da inativação do resíduo de serina da AChE (resíduo presente no sítio ativo e importante para a catálise).

Os inseticidas OF são ésteres amido tiol derivados dos ácidos fosfóricos, fosfônico, fosforotióico, tiofosfórico e ditiofosfórico (SARAIVA, 2009). Esses compostos inibem a AChE por meio de uma reação química onde a porção hidroxila do resíduo de serina no sítio ativo da enzima é fosforilada de maneira análoga à acetilação da AChE (FUKUTO, 1990). No entanto, diferente da enzima acetilada, que rapidamente decompõe o substrato, a enzima fosforilada é altamente estável, assim o grupo hidroxila da serina, bloqueada por uma porção fosforil, já não é capaz de participar na hidrólise da acetilcolina o que resulta no acúmulo deste neurotransmissor na fenda sináptica. Além disso, dependendo dos grupos ligados ao átomo de fósforo, a enzima torna-se irreversivelmente inibida.

O grupo dos inseticidas CARB é formado por derivados de ésteres do ácido carbâmico (NH_2COOH) como os N-substituídos ou metil carbamatos (carbanil), carbamatos fenil substituídos (propoxur) e os carbamatos cíclicos (carbofuran) (SARAIVA, 2009). A inibição da AChE pelos CARB ocorre de maneira reversível, o que torna esses inseticidas menos perigosos com relação à exposição humana e animal do que os OF.

As duas classes de compostos são as principais classes de pesticidas em uso em todo o mundo. Segundo ASSIS e colaboradores (2010) as duas classes juntas compartilham cerca de 50 % do mercado mundial de inseticidas / acaricidas. O amplo emprego desses compostos na agricultura e também no controle de vetores como o da malária e dengue se deve à sua eficácia como inseticidas, assim como ao fato de que estes compostos não se acumulam na natureza por apresentarem decomposição relativamente rápida após a aplicação. Embora ofereçam menor risco para o meio ambiente, os inseticidas OF e CARB são

altamente tóxicos para animais e humanos (SHADNIA et al., 2005; RAHIMI et al., 2006; LOPEZ et al., 2013; YE et al., 2013), uma vez que a AChE de vertebrados são similares, em termos de estrutura e função, a dos insetos.

Devido a incidência de resistência dos insetos e a toxicidade aos animais e humanos questiona-se se a inibição da AChE é realmente um bom alvo para exploração no desenvolvimento de novos inseticidas. Quando analisada somente pelo lado de eficiência de morte do inseto é, sem dúvida, muito eficaz. Além disso, a redução do impacto ambiental e questões econômicas têm levado empresas do setor florestal a buscar alternativas para melhorar as técnicas de controle químico e reduzir os efeitos dos inseticidas no ambiente (VITORINO et al., 2015) acelerando a busca por novos inseticidas.

O estudo funcional e estrutural de AChE de diferentes espécies tem permitido o melhor entendimento de sua atuação e determinado as semelhanças e/ou diferenças entre as AChEs. Uma abordagem bastante interessante, que tem sido levantada, é explorar outras regiões do sítio ativo da AChE. Apesar da grande similaridade nesta região, AChE de humano e de insetos apresentam diferenças importantes (PANG et al., 2012). Foi observada, através de alinhamento sequencial de diferentes AChE, a presença de um resíduo cisteína (Cys), localizado próximo ao sítio ativo da AChE de insetos (Figura 3.1), mas ausente em AChE de mamíferos e aves (PEZZEMENTI et al., 2006; PANG, 2006; PANG, 2007). Este resíduo tem sido considerado muito promissor para ligação com inibidores específicos para AChE de insetos o que torna este resíduo um novo alvo para desenvolvimento de novos inseticidas (PANG et al., 2012). Tais inseticidas apresentariam maior segurança no que diz respeito à intoxicação uma vez que o alvo está ausente em mamíferos. Quanto à resistência dos insetos frente aos inseticidas que atuam inibindo a AChE, os insetos não tiveram tempo de apresentarem resistência ao resíduo de Cys-alvo como tem sido observado para o resíduo de serina que é o alvo da maioria dos inseticidas que são utilizados por décadas (PANG et al., 2009).

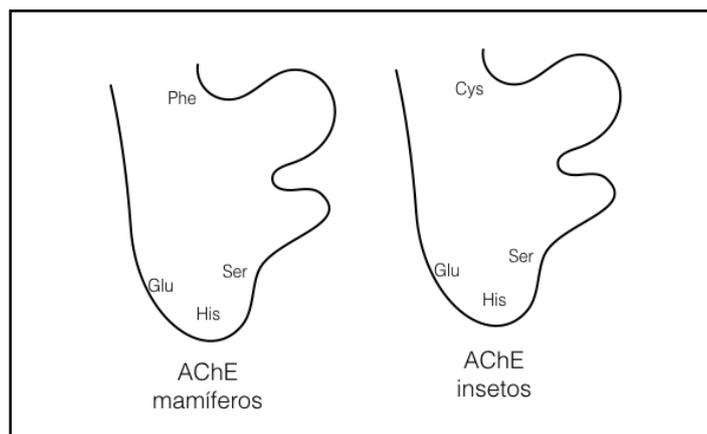


FIGURA 3.1 Representação esquemática da região do sítio catalítico de AChE de mamíferos (esquerda) e de insetos (direita), mostrando os resíduos diferentes nas duas classes (Phe e Cys, respectivamente). Figura baseada em PANG et al., 2012.

1.5 - Cromatografia zonal de bioafinidade

Cromatografia de bioafinidade zonal linear e não linear com eluição frontal têm sido amplamente utilizadas para triagens de ligantes de proteínas. A cromatografia de bioafinidade oferece fácil caracterização cinética, termodinâmica e química de um ligante em eluição através de sistemas de cromatografia líquida hifenados a uma variedade de detectores (MORAES et al., 2014).

Uma variedade de suportes cromatográficos e procedimentos têm sido eficientemente usados para imobilização de proteína, e embora possam afetar a conformação e/ou a atividade, no caso de enzimas, o importante é que o reconhecimento pelo substrato e/ou ligante padrão estejam preservados. No que concerne o suporte cromatográfico, ele não pode interferir através de interações hidrofóbicas/hidrofílicas alterando assim as constantes de afinidade ou cinéticas da proteína (SINGH et al., 2014).

Cromatografia zonal de bioafinidade tem sido usada para triagem e caracterização de inibidores enzimáticos (MORAES et al., 2016). Neste contexto, o produto da reação enzimática é quantificado na presença e ausência da molécula em triagem. A limitação dessa proposta, é que a enzima precisa ter alta capacidade de produção (*turnover*) devido ao baixo tempo de contato do substrato/inibidor com a enzima imobilizada. De todo modo, um número elevado de trabalhos tem demonstrado a viabilidade desses ensaios não só para identificação de inibidores, mas também para caracterização dos mecanismos de inibição (RODRIGUES et al., 2015).

No que diz respeito ao isolamento e purificação de enzimas naturais e/ou recombinantes, os IMERs (*Immobilized Enzyme Reactors*) tornam-se uma alternativa atraente por se tratar de um método analítico econômico, usado em processos contínuos, onde a atividade enzimática no mesmo é conservada e a estabilidade da enzima aumenta significativamente além de apresentar vantagens adicionais no que diz respeito à precisão e reprodutividade do ensaio. (CARDOSO et al., 2012).

Cromatografia zonal de bioafinidade com a AChE de *Electrophorus electricus* imobilizada em capilar de sílica fundida foi usada, com detecção baseado no método de Ellman (ELLMAN et al., 1961) onde se utiliza ACh como substrato, para caracterização do eeAChE-IMER produzido e, para a triagem de uma coleção de derivados de cumarina (SILVA et al., 2013), com a identificação e caracterização mecanística de um potente inibidor.

Como avanço aos métodos de triagem usando AChE-IMER (VILELA et al., 2014) e detecção por ultravioleta, VANZOLINI e colaboradores (2013) quantificaram a colina produzida a partir da hidrólise enzimática da acetilcolina (substrato natural da enzima) usando um ion-trap como espectrômetro de massa. O método foi validado com a triagem de inibidores padrão da AChE e aplicado na triagem de 17 derivados da coleção de cumarinas anteriormente triadas (SILVA et al., 2013).

Visto que a AChE é um bom alvo para desenvolvimento de novos inseticidas somado ao desenvolvimento de projetos de pesquisa na busca de controle de formigas cortadeiras pelo Grupo de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química (DQ) UFSCar em colaboração com pesquisadores do campus de Rio Claro da UNESP, este trabalho de doutorado teve por objetivo primordial a obtenção da enzima AChE de *Atta sexdens* e sua caracterização.

Ademais, estudos de imobilização, desenvolvimento e validação do ensaio de triagem de ligantes com a enzima imobilizada em capilar de sílica fundida (IMER) baseando-se na quantificação direta da colina produzida pelo AsAChE-IMER por LC-MS/MS são detalhadamente discutidas nesse trabalho.

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

Geral:

- Obter a enzima recombinante AChE de *Atta sexdens*, caracterizá-la cineticamente e desenvolver um sistema de imobilização da enzima, que permitirá a busca de inibidores.
- Isolar a AChE nativa de *A. sexdens*, caracterizá-la cineticamente e desenvolver um sistema de imobilização da enzima, que permitirá a busca de inibidores.

Específico:

Estudos com enzima recombinante:

- Amplificar o gene que codifica a síntese de AChE de *A. sexdens*, partindo de RNA de *A. sexdens* e *primers* desenhados baseados nas sequências de AChE de *Acromirmex* depositada em banco de dados;
- clonar o gene da AChE em vetor de expressão e expressar a enzima em *Pichia pastoris*;
- purificar a AChE e caracterizá-la cineticamente;
- imobilizar a AChE recombinante e
- testar o sistema com alguns compostos

Estudo com enzima nativa:

- Isolar a enzima nativa por meio de técnicas cromatográficas e de precipitação;

- Caracterizar bioquimicamente e cineticamente a enzima isolada;
- imobilizar a AChE nativa e
- testar o sistema com alguns compostos.

CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA

3.1 - Estudos com a enzima AChE recombinante

3.1.1 - Amostras de *Atta sexdens*

A formiga-cortadeira (*A. sexdens rubropilosa*) utilizada na pesquisa foi proveniente de ninhos artificiais do Centro de Estudos de Insetos Sociais – CEIS – UNESP – Rio Claro/SP. Após a coleta do ninho elas foram armazenadas à -80°C.

A mistura formada por cabeças de formigas maceradas em tampão foi denominada de extrato bruto.

3.1.2 - Extração de RNA total de *A. sexdens*

3.1.2.1 - Preparo do material livre de RNase

A fim de deixar o material livre de enzima que cliva RNA (RNase), todo o material foi tratado da maneira descrita a seguir. A saber, durante o decorrer do procedimento, bem como em todos os momentos em que o RNA foi manipulado, fez-se com luvas descartáveis e máscara. Primeiramente preparou-se solução de água DEPC (dietipirocarbonato) 0,05 % (v/v) que ficou sob agitação durante à noite. Os materiais a serem usados para a extração ficaram submersos na solução aquosa de SDS 0,01 % (p/v) por aproximadamente 2 horas. Em seguida foram enxaguados com água destilada e ultrapura. Terminado o enxágue, todo o material ficou submerso em solução de DEPC 0,05 % durante à noite. No dia seguinte os materiais foram embalados em papel alumínio e papel pardo. Depois de embalados, eles foram autoclavados por 30 minutos a 120 °C e secos em estufa por 24 horas a 75 °C.

3.1.2.2 - Extração de RNA total

Para extração de RNA total, aproximadamente 120 mg de cabeças de formigas foram maceradas em um procedimento utilizando TRIzol®, procedimento este melhorado para a metodologia de extração de RNA em uma única etapa desenvolvido por CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987). Seguiu-se o protocolo, sendo a única diferença a inclusão de mais uma etapa de purificação por partição com um volume de ácido fenol:clorofórmio (mistura de fenol, clorofórmio, álcool isoamílico pH 4,3-4,7- Ambion). A amostra foi incubada por 1 minuto à temperatura ambiente e então foi centrifugada à 12.000 g a 4 °C por 15 minutos. Após esta etapa o sobrenadante foi transferida para um tubo limpo e a metodologia foi seguida com a precipitação do RNA com isopropanol segundo o protocolo descrito pelo fabricante do TRIzol®. O *pellet* de RNA total foi ressuscitado em 40 µL de água tratada com DEPC (dietipirocarbonato) e posteriormente foi incubada por 10 minutos a 60 °C.

A qualidade e quantificação de RNA total isolado foi estimada através das relações das absorbâncias da amostra medidas em 230, 260 e 280 nm (A260/A280 e A260/A230) utilizando BioSpec-nano (Shimadzu). A integridade da amostra de RNA foi verificada por gel de agarose 1 % em tampão TAE em água tratada com DEPC (SAMBROOK & RUSSELL, 2001) contendo brometo de etídio (0,1 µg/mL). O gel foi submetido à eletroforese a 120 V por 30 minutos e posteriormente visualizado e fotografado através do sistema de foto documentação computadorizado (Gel Doc™ Ez System – Bio-Rad).

3.1.3 - Reação de transcrição reversa (RT-PCR)

Obteve-se o cDNA (DNA complementar) utilizando o RNA total extraído como descrito no item 3.1.2.2. Para isto foi feita a seguinte reação: em um tubo de PCR foram adicionados 4 µg de RNA total, 2 µL de Oligo(dT) primer 0,5 µg/µL (Promega) e o volume foi completado para 13 µL com água tratada com DEPC. A amostra foi incubada por 5 minutos a 65 °C e resfriada imediatamente após o tempo de incubação em banho de gelo. Então foram adicionados 4 µL de 5X Reaction Buffer, 2 µL de uma mistura de dNTPs 10 mM cada (Thermo Scientific) e 1 µL de RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). A amostra foi homogeneizada

e incubada por 60 minutos a 42 °C. A reação foi interrompida por aquecimento a 70 °C por 10 minutos.

3.1.4 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do DNA que codifica a síntese de AChE foi realizada através de reação em cadeia da polimerase (PCR) usando como molécula molde o cDNA, obtido a partir de RNA total isolado da formiga *A. sexdens*, e os *primers forward* e *reverse* sintetizados. A síntese de *primers* foi realizada baseada na sequência de DNA do gene da AChE de formiga do gênero *Acromyrmex echinator* depositada no banco de dados (GenBank GL888116.1) com a inclusão de sítios de clivagem com enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* (Tabela 1.3), para a clonagem no vetor pPICZ α -A e expressão em *P. pastoris*. Foi verificado, utilizando o programa SignalP 4.0 (PETERSEN et al., 2011), que a sequência depositada no banco de dado possui um peptídeo sinal na região N-terminal, sendo este provavelmente clivado entre os resíduos de aminoácidos 35 e 36. Assim o *primer* foi desenhado com os aminoácidos que vem em seguida do peptídeo sinal.

A clonagem no vetor pPICZ α -A permite que a proteína de interesse seja expressa em fusão com seis resíduos de histidina na região C-terminal, entretanto o vetor não possui sítio de reconhecimento para proteases para separar a enzima de estudo da fusão, logo, foi proposto que o *primer reverse* deveria apresentar uma sequência de resíduos de nucleotídeo codificante para a trombina (em vermelho na Tabela 1.3), o que permitirá separar a proteína de fusão e obter a AChE isolada.

TABELA 1.3 Oligonucleotídeos para amplificação do DNA do gene AChE. Os nucleotídeos sublinhados representam aqueles dos sítios de restrição das enzimas. Os nucleotídeos em vermelho são referentes ao sítio de reconhecimento para a trombina.

Foward(5'-3') (EcoRI)	5'3' -GCC <u>GAA TCC</u> ATG TCG AGA AAC TCA AGT TCC TGG CGA ACC GGC AGA CTG GAG GCC
Reverse (5'-3') (NotI)	5'3' GCC <u>GCG GCC GC</u> GGA TCC ACG CGG AAC CAG AAC GAT ACC TCT GAC GTC GTG CTG GAT

Para a amplificação do gene AChE foi realizada a PCR utilizando a *Taq DNA Polymerase* (Thermo Scientific), o cDNA como molde e o par de *primer*. As

concentrações dos reagentes utilizados na PCR para amplificação do gene AChE estão descritas na Tabela 2.3.

TABELA 2.3 Condições da reação de amplificação do DNA AChE com a DNA polimerase e os oligonucleotídeos mencionados anteriormente para a clonagem no pPICZ α -A.

Reagentes da amplificação	Reação/Volume (μ L)	Branco/Volume (μ L)
cDNA	5	#
<i>Primer foward</i> (10 μ M)	1	1
<i>Primer reverse</i> (10 μ M)	1	1
dNTP mix (10mM)	1	1
Tampão 10X com MgSO ₄ (25 mM MgSO ₄)	4	4
Taq DNA <i>Polymerase</i> (2,5 U/ μ L)	1	1
H ₂ O milliQ	32	37

A reação foi realizada em um termociclador T100TM Thermal Cycler BIO-RAD utilizando o programa descrito na Tabela 3.3. Após a reação de PCR, 5 μ L das amostras foram aplicadas em gel de agarose 1 % para verificar se o inserto de DNA amplificado corresponde ao tamanho de fragmento esperado. Posteriormente a reação foi purificada utilizando o kit *Wizard SV gel and PCR clean-UP System* (Promega) como descrito pelo fabricante.

TABELA 3.3 Condições dos ciclos da reação de PCR para amplificação do DNA AChE.

Ciclo	1X	30X			1X	Hold
T(°C)	94	94	63	72	72	4
Tempo	5 min	1 min	1 min	3 min	10 min	∞

3.1.5 - Digestão do produto de PCR e do vetor pPICZ α -A com as enzimas de restrição

Ambos o pPICZ α -A como o produto de PCR amplificado (inserto) com os *primers* desenhados especificamente para clonar neste vetor foram digeridos com *FastDigest EcoRI* (Thermo Scientific) e *FastDigest NotI* (Thermo Scientific). A reação de digestão foi realizada de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante e

mantida a 37 °C por 5 horas. Em seguida as amostras foram aplicadas em um gel preparativo de agarose 1 % e foi feita a purificação do DNA de interesse com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega) como descrito pelo fabricante.

3.1.6 - Reação de ligação do inserto ao pPICZ α -A

O vetor pPICZ α -A é usado para expressar e secretar proteínas recombinantes em *P. pastoris*. As proteínas recombinantes são expressas em fusão com um peptídeo N-terminal, codificado pelo sinal de secreção fator α de *Saccharomyces cerevisiae*, que direciona a secreção de proteínas recombinantes expressas. O vetor permite alto nível de expressão induzida por metanol do gene de interesse em *Pichia*, devido ao fragmento 5' contendo o promotor AOX1, promovendo uma regulação rigorosa da expressão e podendo ser usado em várias cepas de *Pichia*. Este vetor também possui um gene de resistência a Zeocina™ para seleção em *Escherichia coli* e *P. pastoris*, além de um peptídeo C terminal contendo uma cauda de 6 histidinas para detecção e purificação de proteína de fusão recombinante.

Depois de quantificar o DNA pelo BioSpec-nano (Shimadzu) – absorvância à 260 nm – foi montada uma reação de ligação na proporção de 1:1 de vetor e inserto, ambos previamente digeridos e purificados. A reação de ligação foi feita com um volume final de 10 μ L, contendo vetor e inserto digeridos na proporção acima descrita, 1 μ L de 10X T4 DNA ligase *buffer* e 1 μ L de T4 DNA ligase (5 U/ μ L). A reação de ligação foi incubada a 16°C por 16 horas.

3.1.7 - Transformação do produto de reação em linhagem DH5 α de *E. coli* e confirmação da clonagem

O produto de ligação no vetor pPICZ α -A (descrito no subitem 3.1.6 e aqui chamado de pPICZ α -A-AChE) foi transformado em células competentes de linhagem DH5 α *E. coli*. O processo de transformação utilizado foi o do cloreto de cálcio e choque térmico. O produto da ligação foi adicionado às células competentes na proporção de 1:10 (v/v) e a mistura foi mantida no gelo por 30 minutos. Após a incubação, foi realizado o choque térmico por 2 minutos a 42 °C. Em seguida o tubo

de 1,5 mL contendo a reação foi mantido por 2 minutos no gelo. Então, foram adicionados 4 vezes o volume de células competentes de meio LB e o tubo de 1,5 mL foi incubado à 37 °C por uma hora sob agitação de 200 rpm. A mistura foi centrifugada por 1 minuto, o sobrenadante foi desprezado e o restante de cada transformação (aproximadamente 100 µL) foi semeado em placas de Petri individuais contendo 25 mL de meio LB *low salt* e 100 mg/mL de Zeocina™. As placas foram mantidas na estufa a 37 °C por 16 horas.

As colônias obtidas nesta etapa foram cultivadas em meio líquido, contendo Zeocina™ na concentração descrita, sob agitação de 250 rpm a 37 °C por 16 horas. A extração do DNA plasmidial foi feita com a utilização do *kit Wizard® Plus SV Miniprep* (Promega) de acordo com o fabricante. Um gel de agarose 1 % foi realizado para verificar a presença de DNA plasmidial.

A clonagem foi confirmada por PCR utilizando como DNA molde o DNA plasmidial, *Taq* DNA polimerase (Thermo Scientific) em uma reação de 25 µL, como sugerido pelo fabricante e o programa descrito na Tabela 4.3. A reação de digestão foi realizada com as respectivas enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* para confirmar a clonagem. As amostras foram encaminhadas para sequenciamento em colaboração com a Profª Drª Ana Paula Ulian de Araújo do Instituto de Física de São Carlos, USP.

TABELA 4.3 Condições dos ciclos da reação de PCR para amplificação do DNA AChE.

Ciclo	1X	30X			1X	Hold
T(°C)	94	94	63	72	72	4
Tempo	5 min	1 min	1 min	3 min	10 min	∞

3.1.8 - Transformação do clone pPICZα-A-AChE em linhagem X33 de *P. pastoris* eletrocompetentes

3.1.8.1 - Preparação de células eletrocompetentes

Células de *P. pastoris* X-33 eletrocompetentes foram preparadas de acordo com o manual *EasySelect™ Pichia Expression Kit* (Invitrogen™), com algumas modificações. A preparação das células eletrocompetentes foi feita

inoculando-se uma colônia isolada de *P. pastoris* X-33 em 5 mL de meio YPD, o pré-inóculo foi mantido a 30 °C, 250 rpm por 16 horas.

Então foram inoculados 250 mL de meio YPD em frasco de 1 L com 250 µL do pré-inóculo. A cultura foi mantida a 30 °C, 250 rpm por aproximadamente 14 horas até que sua DO_{600nm} atingisse de 1,3 a 1,5. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 5.000 x g a 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 200 mL de água ultrapura estéril e gelada. Centrifugou-se novamente a cultura a 5.000 x g a 4 °C por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante e ressuscitou-se o *pellet* em 50 mL de água ultrapura estéril e gelada. Centrifugou-se a cultura a 5.000 g a 4 °C por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante e ressuscitou-se o *pellet* em 10 mL de sorbitol 1 M (molar) estéril e gelado. Centrifugou-se novamente a cultura a 5.000 x g a 4 °C por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante e ressuscitou-se o *pellet* em 1 mL de sorbitol 1 M estéril e gelado, para um volume final de aproximadamente 1,5 mL. As células foram mantidas no gelo na geladeira e utilizadas no mesmo dia.

3.1.8.2 - Transformação do clone pPICZα-A-AChE por eletroporação

Em *Saccharomyces cerevisiae* um DNA linear pode integrar-se via recombinação homóloga entre o DNA transformado e regiões de homologia no genoma do *Saccharomyces cerevisiae*. A integração do DNA pode ocorrer somente no *AOX1 locus*. O vetor linearizado na região 5' *AOX1* irá integrar-se por inserção genômica na região 5' *AOX1* do hospedeiro. Para isto foi realizada a linearização de aproximadamente 10 µg de DNA plasmidial do clone pPICZα-A-AChE com *Bst*XI (Fermentas) por 16 horas à 55 °C. Posteriormente uma alíquota da amostra foi aplicada em gel de agarose 1 %. Os DNAs linearizados foram precipitados com 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M e 2,5 do volume de etanol 100 %, ambos gelados. A amostra foi homogeneizada e mantida a -20 °C por 16 horas. A solução foi centrifugada a 15.000 x g, 4 °C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão rápida do tudo e deixou-se o *pellet* secando sobre papel absorvente por 5 minutos. Então 1 mL de etanol 70 % gelado foi adicionado e centrifugado novamente a 15.000 x g, 4 °C por 2 minutos. O sobrenadante foi vertido e seco à 37 °C por 30 minutos. O *pellet* foi ressuscitado em 10 µL de água ultrapura

autoclavada e os DNAs foram utilizados para transformação em *P. pastoris* eletrocompetente.

A transformação por eletroporação em *P. pastoris* eletrocompetentes foi realizado incubando 10 µl de DNA linearizado (de 5-10 µg) com 80 µL de células. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm gelada e foi mantida no gelo por 5 minutos. As células foram pulsadas de acordo com os parâmetros para *P. pastoris*: 2.000 V, 200 Ω, 25 µF e tempo de choque de 4,9 ms, utilizando um eletroporador GenePulser (BioRad).

Imediatamente após o choque foi adicionado à cubeta 1 mL de sorbitol 1 M (molar) estéril e gelado, esta mistura foi homogeneizada lentamente. O conteúdo da cubeta foi transferido para um tubo de 15 mL estéril e este foi incubado por 1 hora e meia a 30 °C, sem agitação. Então 50, 75, 100 e 150 µL de células transformadas foram semeadas em placas de Petri contendo 25 mL meio YPDS ágar com 100 µg.mL⁻¹ de Zeocina™. Foi realizada uma seleção inicial de transformantes resistentes à Zeocina™ em placas de Petri contendo 25 mL meio YPDS ágar com 500 µg.mL⁻¹ de Zeocina™. As placas foram incubadas por 2 a 3 dias a 30 °C até a formação de colônias. Após o crescimento das colônias, fez-se o repique das colônias para placas de meio YPD com 1000 µg.mL⁻¹ de Zeocina™. As placas ficaram na estufa a 30 °C por 2 dias.

3.1.9 - Análise das colônias transformantes

Na placa cresceu uma única colônia transformante. Esta colônia transformante obtida foi confirmada sendo crescida *overnight* para extração de DNA genômico e posteriormente foi submetida à análise por PCR. Todas estas análises da colônia recombinante foram feitas com *primers* contendo sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *NotI* para a construção pPICZα-A-AChE que flanqueiam o inserto AChE.

3.1.10 - Extração do DNA genômico

A única colônia transformante foi selecionada e utilizada para inocular 600 µL de tampão de extração em tubo de 1,5 mL. Adicionou-se 50 µL de SDS 20 % e agitou-se. Incubou-se a solução a 60 °C por 15 minutos. Adicionou-se 300 µL de

acetato de potássio 5 M e agitou-se. Centrifugou-se a 15000 x g por 10 minutos. Retirou-se 700 µL do sobrenadante e transferiu-se o conteúdo para um tubo de 1,5 mL limpo. Adicionou-se 700 µL de isopropanol e agitou-se brevemente. Centrifugou-se a 15000 x g por 10 minutos. Verteu-se o sobrenadante, adicionou-se 500 µL de etanol 70 % e centrifugou-se a 15000 x g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se em repouso por 20 minutos a 60 °C para completa secagem do DNA. Ressuspendeu-se o *pellet* de DNA em 50 µL de água ultrapura autoclavada e foi realizada a análise do DNA extraído em gel de agarose 1 %.

3.1.11 - Expressão da AChE em linhagem X33 de *P. pastoris*

Inoculou-se colônia isolada da linhagem X33 de *P. pastoris* contendo inserto AChE em 5 mL de meio BMGY (1 % (m/v) extrato de levedura, 2 % (m/v) peptona, 100 mM fosfato de potássio (pH 6,0), 1,34 % (m/v) YNB, 0,0004 % (m/v) biotina e 1 % (v/v) glicerol) e Zeocina™ 100 mg/mL. Deixou este pré inoculo crescer a 30 °C e 250 rpm durante à noite. Inoculou-se também uma colônia de *P. pastoris* X33 transformada com o vetor pPICZα-A como controle. No dia seguinte foi transferido 50 µL do pré inoculo para 50 mL de meio BMGY e deixou-se a 30 °C a 250 rpm até que a cultura atingisse DO 600 nm = 2-6 (aproximadamente 16 horas). Quando a cultura atingiu a DO esperada a cultura foi centrifugada a 1.500 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado celular foi ressuspendido em 200 mL meio BMMY (1 % (m/v) extrato de levedura, 2 % (m/v) peptona, 100 mM fosfato de potássio (pH 6,0), 1,34 % (m/v) YNB, 0,0004 % (m/v) biotina e 0,5 % (v/v) metanol) em *erlenmeyer* de 2 L para induzir a expressão heteróloga. A cultura foi mantida sob agitação de 250 rpm à 30 °C por 144 horas, sendo que a cada 24 horas a cultura foi induzida com 1 % de metanol e alíquotas de 1 mL em cada um destes intervalos foram retiradas. As alíquotas nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas foram transferidas para um tubo (*ependorf*) de 1,5 mL. Centrifugou-se as alíquotas a 13500 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos e transferiu-se o sobrenadante para outro tubo de 1,5 mL. Armazenou-se o sobrenadante a -20 °C e os *pellets* celulares a -80 °C para os ensaios de proteínas expressas por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Electrophoresis*) 15 % (Laemmli, 1970) e ensaio de atividade.

3.1.12 - Clivagem da AChE recombinante com trombina

Em uma amostra de 500 μL do sobrenadante final da expressão foram adicionados 5 μL de trombina (1 U/ μL) da marca Sigma. Deixou-se agitando por 3h à 37°C (temperatura ideal de clivagem segundo o fabricante - Sigma). Como a princípio não se tinha o conhecimento se a proteína de interesse aguentava ou não esta temperatura foi feito também uma clivagem a temperatura ambiente - e em seguida realizou-se o ensaio de atividade (subitem 3.1.13).

3.1.13 - Ensaio enzimático para determinação de atividade para acetilcolinesterase

O ensaio enzimático para AChE foi avaliado espectrofotometricamente (DU 800 UV/Vis Detector DTX 880 Beckman Coulter) pelo método de Ellman (ELLMAN et al, 1961). Neste método, a reação da acetilticolina (substrato) com ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) na presença da enzima, produz um ânion amarelo, o ácido 5-tio-2-nitro-benzóico (TNB), que absorve em 412 nm. O meio reacional é composto pelo substrato, iodeto de acetilticolina (6 mM), o reagente de Ellman - DNTB (6 mM), e tampão Tris/HCl (0,5 M; pH 8.0). A Figura 4.3 mostra o preparo do meio reacional. A quantidade de amostra enzimática foi de 30 μL , sendo 0,84 U para AsAChE-A e 0,17 U para AsAChE-B, para amostras de enzimas nativas. No caso de amostra recombinante, usou-se 50 μL . Para realizar a leitura foram esperados 30 minutos para as amostras recombinantes e 10 minutos para amostras nativas. Os valores de absorbância foram convertidos em unidade enzimática (U) de acordo com a equação 1.3 (ELLMAN et al. 1961).

$$U \text{ (M/min)} = \text{Absorbância/min}/\varepsilon \quad \text{Equação 1.3}$$

Onde ε é coeficiente de extinção de valor 13600 do íon amarelo DTNB



FIGURA 4.3 Esquema do preparo do meio reacional para a avaliação da atividade de AChE.

3.2 - Estudos Teóricos

3.2.1 - Modelagem Molecular

O modelo tridimensional da AChE de *A. sexdens* foi construído por meio do programa computacional SWISS-MODEL (ARNOLD et al., 2006). Este programa constrói o modelo baseando-se no fato de que moléculas com bom grau de semelhança sequencial (identidade) apresentam enovelamento (estrutura 3D) semelhante. Assim, uma proteína de estrutura tridimensional conhecida pode servir de molde para a construção da proteína homóloga com base na sequência primária da mesma. A estrutura tridimensional resolvida da AChE de *Drosophila melanogaster* (PDB:1QO9, resolução de 2,7 Å) foi utilizada como molde por apresentar uma identidade sequencial de 40 % com a sequência da AChE de *A. sexdens* obtida pelo sequenciamento (subitem 3.1.7), e por ser até o momento a única estrutura de AChE de inseto conhecida.

3.2.2 - Validação do modelo tridimensional

3.2.2.1 - PROCHECK

Foi utilizado o programa computacional PROCHECK desenvolvido por LASKOWSKI e colaboradores (1993) que avalia os parâmetros estereoquímicos tais como os comprimentos de ligação; ângulos planos; planaridade dos anéis de cadeias laterais, das ligações peptídicas; quiralidade; conformações das cadeias laterais; ângulos torcionais da cadeia principal e das cadeias laterais; impedimento estérico entre pares de átomos não-ligados e qualidade do mapa de Ramachandran. Este último é particularmente útil porque define os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis e orienta a avaliação da qualidade de modelos sejam eles teóricos ou experimentais. (RAMACHANDRAM et al., 1963).

3.2.2.2 - VERIFY 3D

O programa VERIFY 3D (LUTHY et al, 1992) mede a compatibilidade entre a estrutura tridimensional de uma proteína com a sua própria sequência de aminoácidos. Isso é feito atribuindo uma classe estrutural com base em sua localização e ambiente (alfa, beta, loop, polar, não-polar) e comparando os resultados com boas estruturas.

Como resultado a maioria dessas medidas deve ficar acima de 0,2 e nunca abaixo de zero.

3.2.3 - Árvores filogenéticas

As relações filogenéticas podem ser representadas em forma de árvore chamada árvore filogenética. Estas são construídas a partir de uma matriz contendo dados que podem ser morfológicos, genéticos ou protéicos. Tais dados são comparados e então agrupados em clados de acordo com as semelhanças e diferenças existentes entre eles.

As árvores foram obtidas por meio dos programas computacionais *Phylogeny.fr* (DEREEPER et al., 2008) e *MEGA7* (KUMAR et al., 2016).

3.3 - Estudos com as AChEs nativas

3.3.1 - Amostras biológicas

As amostras biológicas utilizadas neste estudo estão descritas no subitem 3.1.1.

3.3.2 - Ensaio enzimático para determinação de atividade para acetilcolinesterase

Procedimento já descrito no subitem 3.1.13.

3.3.3 - Precipitação com sulfato de amônio

Partindo de um extrato bruto composto de 0,01 g de formigas maceradas em 7 mL de tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 8,0) foi feita a precipitação com sulfato de amônio (SA) a 50 %, 55 % e 60 % (m/v), a saber que a precipitação se deu de maneira independente. Para cada uma das concentrações salinas foram usados 2 mL do extrato bruto. O sal foi adicionado aos poucos mantendo agitação lenta. Todo o processo foi realizado à temperatura ambiente. A agitação durou 5 minutos para permitir o completo equilíbrio entre proteínas dissolvidas e agregadas. As soluções ficaram em repouso por 60 minutos. Decorrido esse tempo, a solução foi centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos. Separou-se o sobrenadante do precipitado, sendo o último ressuspensionado em 1 mL do mesmo tampão usado no preparo do extrato bruto (EB). Ambas as soluções foram submetidas à diálise sob refrigeração utilizando tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 8,0) durante à noite. Terminada a diálise, as soluções foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % e pela atividade da AChE descrita anteriormente (subitem 3.1.13).

Após determinar que a melhor condição de precipitação era a de 55 % (m/v) de sulfato de amônio, o extrato bruto para purificação da AChE de *A. sexdens* foi obtido através da maceração de 1,0 g de cabeças de formigas com 10 mL de tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 8,0) (tampão A) e este foi submetido à

precipitação com sulfato de amônio (SA) a 55 % (m/v). O sal foi adicionado aos poucos mantendo agitação lenta. Todo o processo foi realizado à temperatura ambiente. A agitação durou 5 minutos para permitir o completo equilíbrio entre proteínas dissolvidas e agregadas. As soluções ficaram em repouso por 60 minutos. Decorrido esse tempo, a solução foi centrifugada a 10.300 x g por 60 minutos. Separou-se o sobrenadante do precipitado, sendo o último ressuspendido em 2,5 mL de tampão A. O precipitado ressuspendido foi submetido à diálise contra o tampão A. O tampão da diálise foi trocado 3 vezes e deixado sob refrigeração e agitação durante à noite. Após a diálise a amostra foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % e pela atividade da AChE descrita anteriormente (subitem 3.1.13).

3.3.4 - Cromatografia de troca iônica

A amostra dialisada foi purificada por troca aniônica em uma coluna GE HiTrap DEAE-FF (1 mL) acoplada a um sistema ÄKTA FPLC™ (GE Healthcare Sciences). A coluna foi previamente equilibrada em tampão A. As amostras foram eluídas por meio de gradiente não linear constituído de 5 etapas a 10, 20, 40, 60 e 100 % de tampão B (tampão A com 1 M de NaCl) mantendo 10 CV (volume da coluna) em cada etapa e um gradiente linear de 2 CV para chegar à próxima etapa. Foram coletadas frações de 1 mL em uma vazão de 0,6 mL/min. As frações ativas para AChE a partir do mesmo de *pool* foram reunidas e, em seguida, concentradas e dialisadas contra tampão A usando um Amicon® ultra-15-10,000NMWL (Millipore) para o volume final de 1 mL. As amostras foram utilizadas para caracterização enzimática e imobilização.

3.3.5 - Determinação da atividade de AChE em gel de poliacrilamida após eletroforese em condições não desnaturante

Para determinar a atividade da AChE em gel de poliacrilamida, amostras ativas foram aplicadas num gel de poliacrilamida 15 % nativo (LAEMMLI, 1970). As mesmas foram preparadas com tampão da amostra na ausência de β -mercaptoetanol e SDS. Além disso, as amostras não foram fervidas. Após o término da corrida eletroforética o gel foi incubado por 45 minutos em tampão Tris/HCl (0,5

M; pH 8,0) em temperatura ambiente, sendo a troca feita a cada 15 minutos. Em seguida o gel foi incubado com o meio reacional (descrito no subitem 3.1.13) por 30 min. O contato do meio reacional com a AChE ativa resulta numa banda de cor amarela (reação da acetilcolina com o DTNB na presença da enzima que produz um ânion amarelo TNB) no gel, não sendo necessário corá-lo.

3.3.6 - Dosagem de proteínas totais

As concentrações de proteínas nas amostras foram determinadas de acordo com o método descrito por BRADFORD (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA – Sigma) como padrão. O reagente de Bradford contém o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução ácida. Este ao se ligar às proteínas forma um complexo aniônico estável, causando uma visível mudança na coloração de castanho para tons de azul, de acordo com a concentração da proteína. Amostras protéicas de 800 µL foram misturadas a 200 µL da solução de Bradford. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, leu-se a absorbância a 595 nm. Os ensaios foram feitos em duplicata.

3.3.7 - Cromatografia de exclusão molecular

As frações ativas que eluíram da coluna DEAE foram unidas e concentradas para 200 µL com o concentrador Amicon® Ultra-15-10000NMWL da marca Millipore. Em seguida as amostras foram aplicadas numa coluna de exclusão molecular Superose™ 12 (GE Healthcare Life Sciences) acoplada a um ÄKTA FPLC (GE). A coluna foi previamente equilibrada em tampão A (fosfato de potássio (50 mM; pH 8,0)) acrescido de NaCl 150 mM e as frações foram eluídas isocriticamente numa vazão de 0,3 mL/min e analisadas por teste de atividade da AChE descrito no subitem 3.1.13. A BSA (Bovine serum albumin 66 kDa) também foi aplicada na coluna nas mesmas condições da amostra.

3.3.8 - Influência da temperatura e pH na atividade das enzimas isoladas

A avaliação da influência da temperatura na atividade enzimática foi realizada por meio do ensaio enzimático (subitem 3.1.13) incubando as amostras em diferentes temperaturas de 10 °C a 60 °C. Para o efeito do pH na atividade foram utilizados três diferentes tampões com dois pontos de interseção entre dois deles. Os tampões usados foram: McIlvaine pH 5.0-6.5; fosfato de sódio (50 mM; pH 6,5-8,0) e Tris-HCl (50 mM; pH 8,0-9,5). O experimento foi realizado em triplicata e os dados foram analisados e representados em gráficos que foram gerados pelo software GraphPad Prism 5.0.

3.3.9 - Determinação dos parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_M

Os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten foram determinados nas condições ótimas de pH e temperatura pré-estabelecidas (subitens 3.3.8 e 3.1.13) variando a concentração do substrato iodeto de acetiltiocolina (10 a 250 μ M). As medidas foram realizadas em triplicata e os dados analisados segundo o modelo de Michaelis-Menten através do software GraphPad Prism 5.0.

3.3.10 - Imobilização das enzimas isoladas

As frações ativas eluídas da coluna DEAE, após unidas e concentradas para 1 mL foram utilizadas para imobilização em capilar de sílica fundida (100 μ m I.D. x 0,375 mm x 40 cm). Os capilares foram previamente preparado como já descrito na literatura (da SILVA et al., 2013). As soluções enzimáticas (AsAChE-A e AsAChE-B) foram aplicadas no capilar por meio de uma bomba seringa *Harvard Apparatus* modelo 11Plus possibilitando a imobilização das AChE nativas.

3.3.11 - Condições de análise LC-MS/MS

Foi utilizado o sistema cromatográfico de ultra eficiência Waters ACQUITY UPLC (Milford, USA) sendo o mesmo composto por uma bomba binária

(BSM), uma quaternária (QSM), com injetor automático Waters 2777C, acoplado a um espectrômetro de massa modelo Xevo TQ-MS (Waters, Milford, USA) com ionização por eletrospray (ESI) operando no modo positivo para análise de acetilcolina e colina.

Para a otimização das condições de ionização soluções aquosas, individuais de cada composto (100 ng/mL), foram infundidas no sistema no modo *combined* com vazão de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ de MeOH/tampão acetato de amônio (15 mM; pH 8) (50:50 v/v) vinda do sistema cromatográfico combinada com uma vazão de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ da bomba seringa contendo as soluções aquosas. As condições estabelecidas foram: voltagem do capilar: 2,0 kV; voltagem do cone: 10 V; temperatura de dessolvatação: 350 °C; vazão do gás de dessolvatação: 800 L/Hr.

O espectrômetro de massa operou no modo *selected reaction monitoring* (SRM) monitorando-se as transições de cada analito: 146,1>87,02 para acetilcolina e 104,07>60,1 para colina.

3.3.12 - Ensaio de estabilidade das soluções de trabalho

A possibilidade de hidrólise espontânea da solução de acetilcolina no auto-injetor do sistema cromatográfico e no capilar pré-tratado foi avaliada injetando-se em uma coluna Acquity UPLC® BEH Hilic 1,7 μm (2,1 X 100 mm) uma solução de acetilcolina numa concentração de 60 μM preparada em tampão acetato de amônio (15 mM; pH 5). Monitorando os íons precursores para a acetilcolina $[\text{M}-\text{H}]^+ 87.02 \text{ m/z}$ e colina $[\text{M}-\text{H}]^+ 60.10 \text{ m/z}$ foram realizadas injeções consecutivas a cada 10 minutos (com um volume de 10 μL por injeção), totalizando um período de 360 minutos.

3.3.13 - Validação do método analítico

Para a validação do método foram construídas curvas de calibração com padrão externo, em duas faixas de concentração (alta e baixa). Para isso, uma solução padrão de colina na concentração de 32 mM foi preparada em água. A partir de alíquotas apropriadas da solução padrão, foram preparadas (em água) as soluções estoques na concentração de 100 μM para a curva baixa e 25600 μM para a curva alta.

As soluções de trabalho para as curvas de calibração e controles de qualidade (CQs) foram preparadas (em água) a partir das soluções estoque.

Os valores de concentrações dos CQs do método foram calculados da seguinte forma:

1- O CQ de concentração mais baixa em torno de 110-120 %, em relação ao ponto de menor concentração da curva de calibração.

2- O CQ de concentração média em torno de 40-60 %, em relação a ponto de maior concentração da curva de calibração.

3- O CQ de concentração alta, em torno de 75-95 %, em relação a ponto de mais alta concentração da curva de calibração.

Para preparar os padrões de calibração e as amostras CQ, alíquotas (10 µL) da solução de trabalho apropriada foram adicionadas a 90 µL de água. As soluções foram homogeneizadas e transferidas para os *vials* do auto-injetor. Amostras de 10 µL foram injetadas em coluna Acquity UPLC® BEH Hilic 1,7 µm (2,1 X 100 mm) no sistema LC-MS.

Os padrões de calibração foram preparados em duplicatas e a curva de calibração construída através de regressão não-linear do tipo logarítmica, a partir da área da banda cromatográfica em função de uma dada concentração de colina.

A precisão e exatidão intra e inter- lotes do método foi determinada pela análise das amostras CQs. Cinco amostras de cada concentração foram preparadas em água. A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação (CV %) das replicatas. A exatidão foi calculada para as concentrações examinadas pelo cálculo de volta e, expressa como o percentual de desvio entre as concentrações encontradas e as concentrações nominais.

A seletividade do método foi verificada com a injeção de amostras branco (água).

3.3.14 - Ensaio enzimático para determinação de atividade para AChE por LC-MS.

Manteve-se a configuração de análise por LC-MS (seção 3.3.11) com os seguintes ajustes: sistema no modo *combined* com vazão de 0,5 mL/min de acetonitrila/tampão acetato de amônio (15 mM; pH 8.0) (30:70 v/v) vinda do sistema cromatográfico combinada com uma vazão de 200 mL/min da bomba seringa

contendo as soluções aquosas. O espectrômetro de massa operou no modo *selected reaction monitoring* (SRM) monitorando-se as transições de cada analíto: 146,1>87,02 para acetilcolina e 104,07>60,1 para colina.

As amostras foram preparadas em duplicatas alíquotando-se 10 μL das soluções enzimáticas (AsAChE-A e AsAChE-B) devidamente dialisadas em tampão acetato de amônio (15 mM; pH 5,0); 70 μL de tampão acetato de amônio (15 mM; pH 5,0) e 20 μL da solução de acetilcolina nas concentrações de 22,8 μM ; 34,2 μM ; 45,6 μM ; 68,4 μM ; 114 μM ; 159,6 μM ; 205,2 μM e 239,4 μM . Após 5 minutos foi adicionado às amostras 100 μL de acetonitrila e as amostras foram centrifugadas à 15000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram transferidos para *vials* e foram injetados com um volume de injeção igual a 10 μL em uma coluna CORTECS™UPLC HILIC 2,7 μm (2,1 X 100 mm) no sistema LC-MS. A área de colina produzida foi monitorada e correlacionadas às concentrações através das curvas de calibração.

3.3.15 - Atividade e caracterização cinética dos IMERs por LC-MS

O ensaio de atividade para os IMERs foi realizado injetando 10 μL de uma amostra de acetilcolina na concentração de 85,5 μM no sistema LC-MS sendo a colina produzida monitorada e correlacionada com a curva de calibração.

Para a obtenção da constante de Michaelis-Menten (K_M) dos IMERs foram utilizadas concentrações crescentes do substrato, na faixa de 10 μM a 200,0 μM , até que fosse atingido um patamar de saturação onde o aumento na concentração de acetilcolina não alterasse a velocidade da reação. As áreas das bandas de colina produzida durante o estudo cinético foram correlacionadas às concentrações através das curvas de calibração. As amostras empregadas nos estudos cinéticos foram injetadas em duplicata com um volume de injeção igual a 10 μL . Os valores obtidos de concentrações de colina foram relacionados às concentrações do substrato e o método de regressão não-linear de melhor ajuste, através do software GraphPad Prism 5.0, foi utilizado para se obter a curva de Michaelis-Menten, determinando-se assim os valores de K_M e $V_{\text{máx}}$.

3.3.16 - Triagem

Os IMERs produzidos foram usados para a triagem de inibidores padrões de AChE humana e de peixe elétrico assim como para uma coleção de 12 hidantoínas (Anexo I). A seletividade entre os IMERs de *A. sexdaxs* e peixe elétrico foi avaliada com uma mesma coleção, incluindo tacrina e galantamina, que são inibidores padrões de acetilcolinestrases.

A triagem dos compostos foi realizada avaliando-se o percentual de inibição a 100 μ M. A concentração de substrato utilizada foi de 1,5 vezes o valor de K_M garantindo assim a saturação do IMER. As soluções estoque de cada composto foi preparada numa concentração de 1 mg/mL e em seguida foram diluídas obtendo-se soluções de trabalho a 4 mM. As amostras foram preparadas aliquotando-se 2,5 μ L das respectivas soluções de trabalho, 25 μ L da solução de acetilcolina 580 μ M (para o capilar de peixe) / 1132 μ M (para o IMER_AsAChE-A) / 800 μ M (para o IMER_AsAChE-B) e 72,5 μ L de tampão acetato de amônio 15 mM pH 5,0. Sendo a concentração molar final do composto a ser analisado de 100 μ M e de acetilcolina 145 μ M para o capilar de peixe elétrico, 283 μ M para IMER_AsAChE-A e 200 μ M para IMER_AsAChE-B. Para cada amostra analisada foi utilizada uma amostra controle negativo (ausência de acetilcolina) e amostra controle positivo (ausência do composto em triagem). O percentual de inibição I (%) para cada composto foi calculado de acordo com a equação 2.3.

$$I (\%) = 100 - (P_i / P_0 * 100) \quad \text{Equação 2.3}$$

Onde, P_i é a produção de colina quantificada a partir da hidrólise da acetilcolina na presença dos triados e P_0 é a produção de colina da amostra controle positivo.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados dos experimentos realizados serão descritos em quatro tópicos: estudos realizados para obtenção da AChE recombinante, estudos *in silico*, estudos para obtenção de AChE nativa e cromatografia de bioafinidade.

4.1 - Estudos com a AChE recombinante

4.1.1 - Extração de RNA total da AChE de *Atta sexdens* e obtenção de cDNA

A extração de RNA total foi realizada a partir de cabeças de formigas (*A. sexdens*) que estavam armazenadas a -80 °C. Várias tentativas de extração de RNA foram realizadas até a obtenção de um RNA parcialmente sem degradação. A extração de RNA total foi realizada partindo-se 120 mg de cabeças de formigas por cada mL de TRIzol® em cada extração, como sugerido pelo fabricante. Esta metodologia de extração de RNA em uma única etapa é um procedimento melhorado da desenvolvida por CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987). A extração envolve a adição de um volume de TRIzol® (solução contendo fenol e isotiocianato de guanidina) nas cabeças de formigas macerando-as em nitrogênio líquido. As fases são separadas por centrifugação, onde é possível distinguir três fases: uma fase superior aquosa (clara) onde estão contidos os ácidos nucleicos que são polares devido aos grupos fosfatos carregados negativamente; uma interface e a fase orgânica inferior (vermelha) que contém as proteínas, estas apresentam partes hidrofóbicas que interagem com o fenol e acabam precipitando. Além das proteínas, DNA e carboidratos também são retidos nesta fase. A utilização de clorofórmio favorece a separação da fase aquosa e orgânica, pois o clorofórmio além de apresentar maior densidade que o fenol, é miscível com este. O pH do fenol determina a partição de DNA e RNA na fase orgânica e fase aquosa. Isso porque em condições levemente alcalinas (pH 7-8) o fosfato diéster no ácido nucleico está negativamente carregado e então o DNA e RNA são ambos particionados na fase

aquosa. No entanto, quando ocorre diminuição do pH ($4 < \text{pH} < 6$) o DNA é removido da fase aquosa e fica retido na fase orgânica, deixando o RNA na fase aquosa. O RNA é precipitado da fase aquosa com isopropanol. O precipitado é lavado para a remoção de impurezas e ressuspenso em água tratada com DEPC.

A integridade da amostra (5 μL) de RNA extraído foi avaliada por gel de agarose 1 % em tampão TAE feito com água tratada com DEPC (SAMBROOK & RUSSELL, 2001) contendo brometo de etídio (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O gel foi submetido à eletroforese a 120 V por 30 minutos e posteriormente visualizado e fotografado através do sistema de foto documentação computadorizado (Figura 5.4). Nesta figura podemos verificar que a extração resultou em produtos parcialmente íntegros, onde podem ser observadas as bandas correspondentes às frações de RNA ribossômico 28S e 18S e o arraste de fundo no gel evidencia RNA parcialmente degradado.

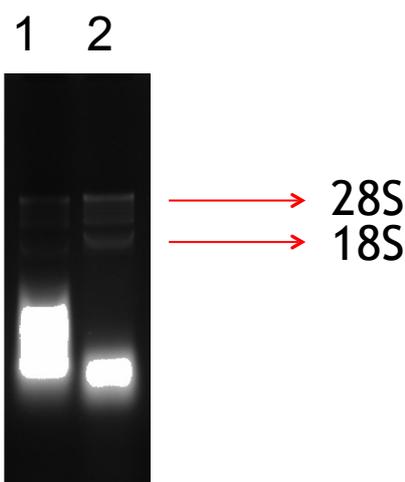


FIGURA 5.4 Análise da qualidade das amostras de RNA total por eletroforese em gel de agarose 1%. **1:** RNA1 e **2:** RNA2, ambos parcialmente íntegro mostrando a presença das bandas correspondentes às frações de RNA ribossômico 28S e 18S.

A quantidade de RNA total foi avaliada por espectrofotometria. Os valores obtidos de A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} bem como as concentrações das amostras de RNA total estão apresentados na Tabela 5.4. Um RNA pode ser considerado puro, livre de proteínas, se $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

TABELA 5.4 Valores e médias de A260/A280, A260/A230 e concentrações das amostras de RNA total.

RNA	Absorbância		Concentração (ng/ μ L)
	260/280	260/230	
1	1,9	1,0	67,0
2	2,0	1,0	870,0

Cerca de 4 μ g de RNA total foram utilizados como molde para a síntese de cDNA (DNA complementar) na presença do *primer* oligo(dT), dNTPS e transcriptase reversa (RT). A RT, como todas as DNA polimerases inicia sua síntese de DNA no *primer*, como apenas os mRNA possuem cauda poli(A), o oligo(dT) se hibridiza com as moléculas de mRNA na extremidade 3' e a RT catalisa a síntese de uma fita de DNA complementar ao mRNA, denominada de cDNA (NELSON & COX, 2011).

4.1.2 - Amplificação por PCR da sequência que codifica para a síntese da AChE de *A. sexdens*

O cDNA obtido foi utilizado como molde na reação de PCR (reação em cadeia da polimerase), pois o início da síntese da segunda fita de DNA ocorre com o uso de um oligonucleotídeo de sequência conhecida que se liga à extremidade 5' do cDNA e é alongada com a utilização de dNTPs pela polimerase, gerando um cDNA fita dupla que são amplificados por ciclo suplementares na reação da PCR (NELSON & COX, 2011). Para que ocorra a amplificação, ou seja, síntese de novas fitas de DNA, as amostras devem ser submetidas à combinação adequada de temperatura e de tempo. Cada ciclo da PCR apresenta três fases fundamentais: desnaturação, anelamento e extensão. Após o término de um ciclo (desnaturação, anelamento e extensão), todo o processo é repetido várias vezes (30 vezes, em média), até que se obtenha grande quantidade do DNA amplificado. A cada ciclo de amplificação, o número de cópias da sequência-alvo é duplicado, levando a um aumento exponencial do número dessas sequências.

A Figura 6.4 demonstra a amplificação por PCR a partir do cDNA da reação utilizando como molde 5 μ L de cDNA. Segundo a sequência de AChE de *Acromyrmex* depositada (GenBank GL888116.1) espera-se que o fragmento de DNA

contenha em torno de 1905 pb (pares de base) sendo que o fragmento amplificado de *A. sexdens* possui uma massa aparente de 2000 pb.

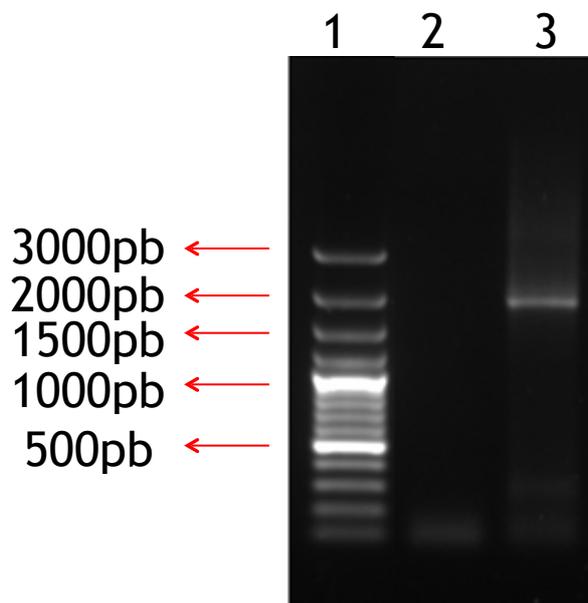


FIGURA 6.4 Gel de agarose 1 % da amplificação da ORF AChE de *Atta sexdens*. 1: Padrão de massa molecular O'Gene RulerTM 3000 pb (pares de base) Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). 2: Branco. 3: amplificação utilizando partindo de 5µl de cDNA na reação de PCR.

Com o objetivo de obter maior quantidade de produtos de PCR amplificado realizou-se uma reação de re-amplificação da ORF AChE e posteriormente a reação foi purificada utilizando o *kit Wizard SV gel and PCR clean-UP System* (Promega) como descrito pelo fabricante. A Figura 7.4 mostra a purificação dos produtos de PCR (pPCR).

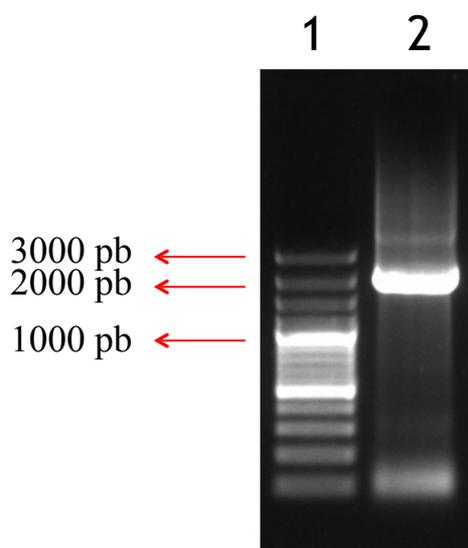


FIGURA 7.4 Gel de agarose 1% da purificação de produtos de PCR (reamplicação do gene AChE de *Atta sexdens*). 1: Padrão de massa molecular O'Gene RulerTM 3000 pb (pares de base) Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). 2: produtos de PCR.

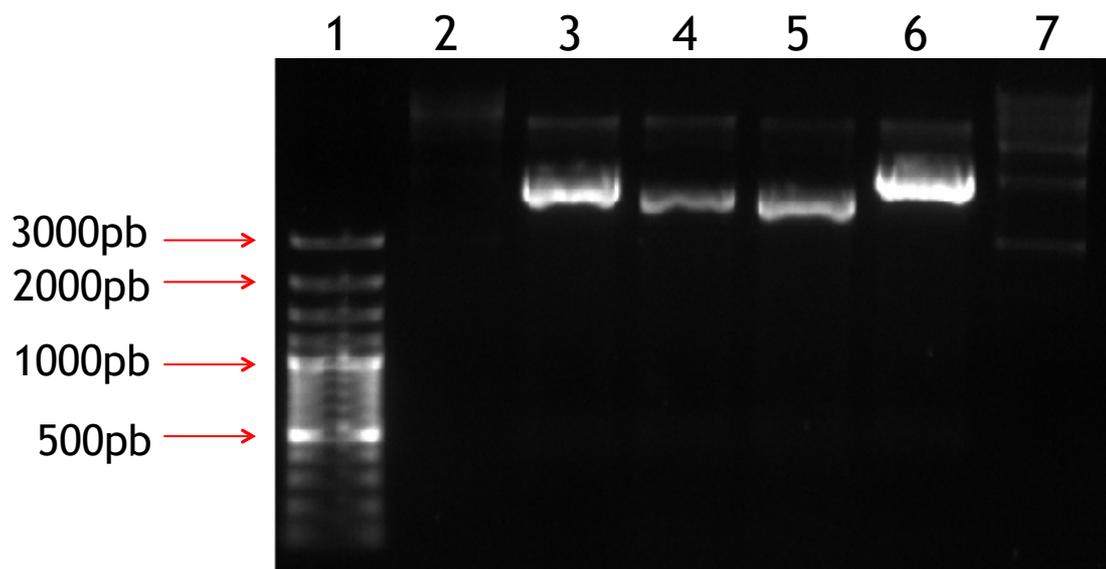


FIGURA 9.4 Gel de agarose 1% de DNA plasmidial extraído de algumas colônias de *E. coli* DH5 α . Verifica-se a presença de DNA nos poços 3, 4, 5 e 6. 1: Padrão de massa molecular O'Gene Ruler™ 3000 pb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). 2: Colônia 1. 3: Colônia 2. 4: colônia 3. 5: Colônia 4. 6: Colônia 5. 7: Colônia 6.

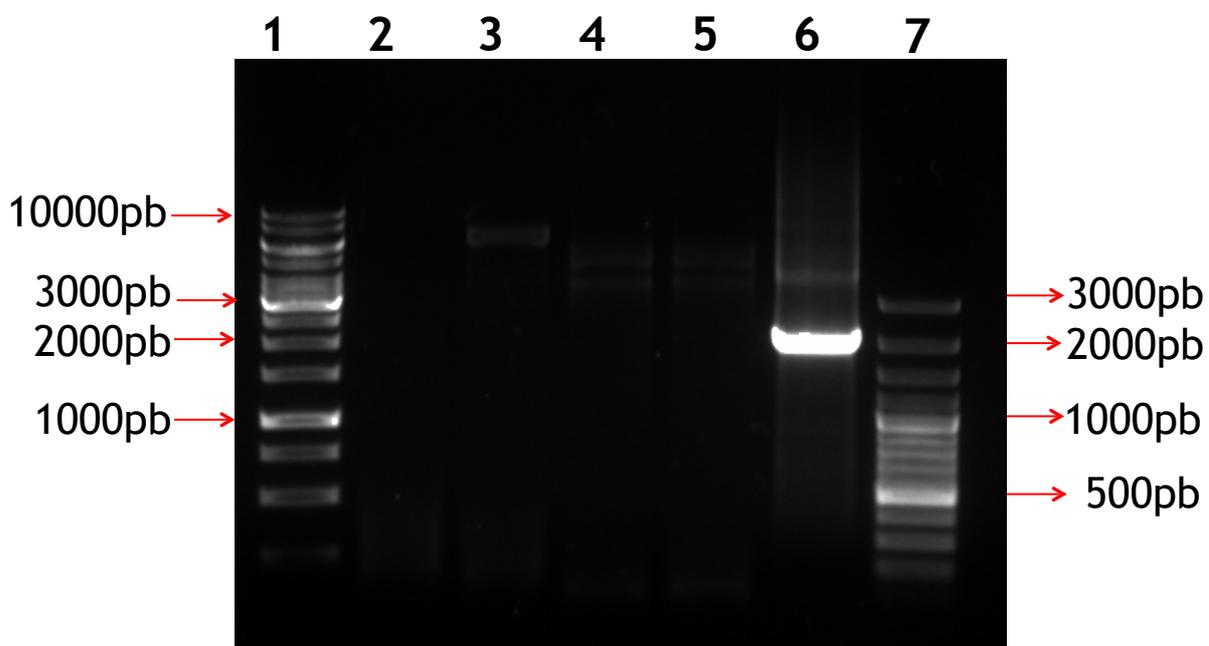


FIGURA 10.4 Gel de agarose 1% da confirmação da clonagem em *E. coli* DH5 α por PCR utilizando os *primers* específicos para AChE. 1: Padrão de massa molecular O'Gene Ruler™ 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). 2: Controle negativo. 3: Colônia 2. 4: Colônia 3. 5: Colônia 4. 6: Colônia 5. 7: Padrão de massa molecular O'Gene Ruler™ 3000 pb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

4.1.4 - Transformação do clone pPICZ α -A-AChE em linhagem X-33 de *P. pastoris*

Para a transformação em *P. pastoris*, por recombinação gênica, foi feita a linearização do vetor pPICZ α -A-AChE e posterior eletrochoque em células competentes X33 de *P. pastoris*.

4.1.5 - Análise da transformação

Somente uma colônia cresceu após 24 horas. A colônia transformante cresceu durante à noite para minipreparações, o DNA genômico foi extraído e posteriormente submetido à análise por PCR. Este último foi feito com *primers* contendo sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *NotI* que flaqueiam o inserto AChE.

4.1.5.1 - Extração de DNA genômico

Como cresceu uma única colônia de pPICZ α -A-AChE-X33 esta foi selecionada e crescida em 5 mL de meio YPD contendo 100 mg.mL⁻¹ de Zeocina™ a 30 °C a 250 rpm durante à noite. Centrifugou-se o inóculo e prosseguiu-se com o protocolo de extração de DNA genômico.

Para confirmar a clonagem, o DNA genômico foi usado como molde em PCR, utilizando-se os *primers* com sítios de *EcoRI* e *NotI* para amplificação da AChE, o resultado foi analisado em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo (Figura 11.4).

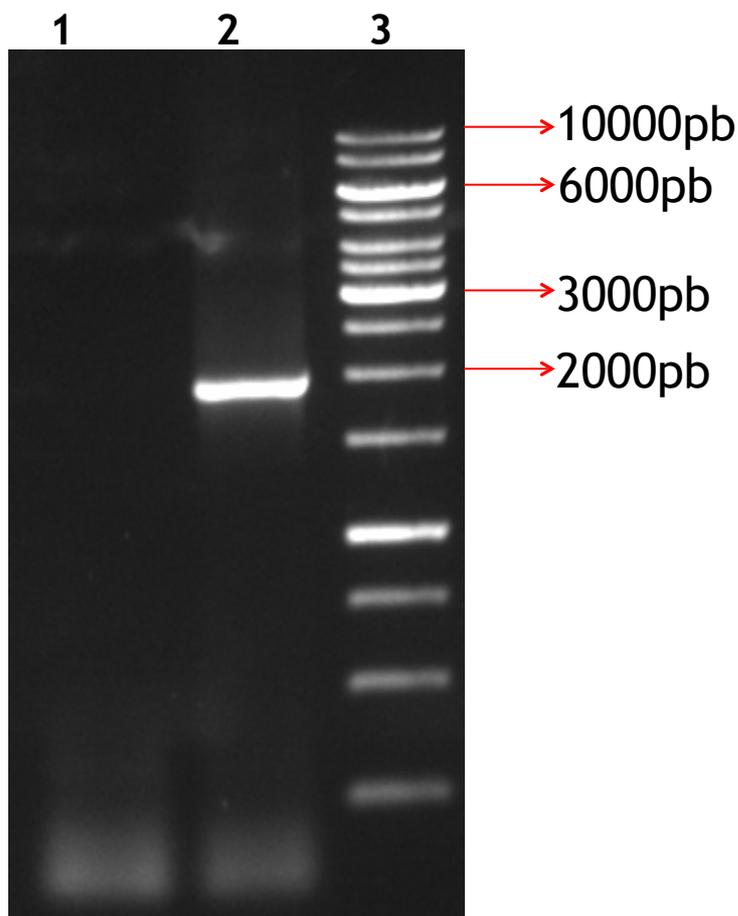


FIGURA 11.4 Eletroforese em gel de agarose 1 % da PCR do DNA genômico de pPICZ α AChE. 1: controle negativo da PCR; 2: produto de 2000 pb (pares de base) da amplificação por PCR do clone pPICZ α AChE; 3: Padrão de massa molecular O'Gene Ruler™ 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

Como é possível observar na Figura 11.4 a clonagem foi confirmada, uma vez que há presença de produto da amplificação em torno de 2000 pb (pares de base), o que é esperado para ORF AChE recombinante.

4.1.5.2 - Seleção de clones recombinantes na presença de maior concentração de antibiótico

Preparou-se uma placa com 25 mL de meio YPDS contendo 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Zeocina™ e estriou-se a colônia isolada da placa de YPDS contendo 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Zeocina™. Passados 5 dias a 30°C uma colônia cresceu em meio contendo 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Zeocina™, o que confirma a presença do vetor pPICZ α -A, que é resistente a este antibiótico. Passou-se então diretamente para os ensaios de expressão, selecionando-se para tal fim esta colônia.

4.1.6 - Expressão da AChE em *P. pastoris* X33

Inoculou-se a colônia transformante em 100 mL de meio BMGY em *erlenmeyer* de 500 mL. O mesmo procedimento foi feito com 1 colônia não transformante de *P. pastoris* X33 para controle. Após a fase *log* de crescimento, centrifugaram-se as culturas e ressuspendeu-se os *pellets* celulares em meio BMMY, adicionando-se metanol a cada 24 horas para manter a indução.

A proteína expressa neste sistema possui massa molecular esperada de 73,69 kDa, correspondente à soma das massa da fusão c-myc epitopo.Tag.His.Tag (3,63 kDa) e da AChE madura (70,06 kDa). Para confirmar a clonagem, o clone obtido foi sequenciado em colaboração com a Prof^a Dr^a Ana Paula Ulian de Araújo do Instituto de Física de São Carlos, USP. A sequência de nucleotídeo foi obtida e por tradução *in silico* foi obtida a sequência de aminoácido representada na Figura 12.4. Os peptídeos em azul são advindos do vetor pPICZ α A sendo processados na proteína madura. Os peptídeos em preto correspondem à proteína. Em vermelho está o sítio de clivagem da trombina e em verde c-Myc epitopo. Por meio de uma análise *in silico* da sequência através da ferramenta computacional *Protparam* obteve-se o número de aminoácidos (661) e massa molecular (73,695 kDa) da mesma.

Com o objetivo de analisar os níveis de expressão e determinar o tempo ideal pós-indução alíquotas de 1 mL foram retiradas nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas da expressão. Essas amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes analisados em SDS-PAGE 15 % e testados para a atividade na presença de acetilcolina como substrato.

```

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEG
DFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTASIAAKEEGVSLEKREAEAEFS
PSHRSRHHEHELHAAQETSHEDARSSRSSEELPRPAALVGHSG
DPLVVRTRKGMVRGKTMVAATGKSVDWFGIPYAQKPVGPLRF
RHPRPAERWSGVLNATTLPNSCVQILDVTFGGFPGATMWNPNP
PLNEDCLYVNVVVPRPRPRNAAVMVWIFGGGFYSGSATLDVYD
HKTLVSEENVIMVSMQYRVASLGFLFFGTSDVPGNAGPFDQMM
ALQWVRDNIAAFGGNPENVTLFGESAGAVSVSLHLLSPLSRHLF
NQAIMQSGSATAPWAIISRDESIVRGIRLAEAVGCPHDRHNLREAI
DCLLTKDAEELVKNEWGTLGICEFPFVVIDGAFLDETPQRSLAT
TSFKKTNILMGSNTEEGFYFIIYYLTELFRIDGAEDVKVTRDQFISA
VSELNPYVNQIGRHAIIEYSDWLHPEDPHANRDALDKIVGDYQF
TCNVNEFAGRYADTGHTVYMYYYKHSRNNPWPRWTGVMHAD
EISYIFGEPLDPSKGYTHEEIQLSKRMMRYWANFAKTGDPNIDES
GELSLAYWPSHTAVNKEYLTLNINSTEIGSGPRVRQCTFWKKYLP
QLLGATSKLEVGSKETCGSTSLADSGATRILLILLSLLLTGLTTLPHI
QHDVRGIVLVPRGSAASFLQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

```

FIGURA 12.4 Sequência da proteína heteróloga AChE de *A. sexdens* deduzida a partir do sequenciamento do clone.

Os peptídeos em azul são advindos do vetor pPICZ α -A sendo processados na proteína madura. Em vermelho está o sítio de clivagem da trombina e em verde c-Myc epitopo.

Na Figura 13.4 está representado o gel obtido após eletroforese das alíquotas retiradas. As mesmas amostras aplicadas no gel da Figura 13.4 foram concentradas 4 vezes e aplicadas em outro gel (Figura 14.4). Observa-se na Figura 14.4 o aparecimento de banda com massa molecular aparente de um pouco mais de 70 kDa que não aparece no controle. É possível que esta banda seja da AChE recombinante já que teoricamente, espera-se que a AChE recombinante tenha uma massa molecular em torno de 74 kDa. Foi realizado *immunoblotting* (dados não demonstrados) utilizando *anti-His* como anticorpo com as mesmas amostras utilizadas para obtenção do gel da Figura 14.4, no entanto nenhuma banda foi marcada, exceto o controle positivo. Talvez a banda pertencente à AChE recombinante seja pouco intensa e a quantidade de proteína que passou para a membrana após a transferência foi pequena ao ponto do anticorpo não marcar. Por outro lado, sabe-se que a AChE na presença de SDS é clivada (TOUTANT, 1989) resultando na perda da cauda de histidina e conseqüentemente não marcando a banda no ensaio de *immunoblotting*.

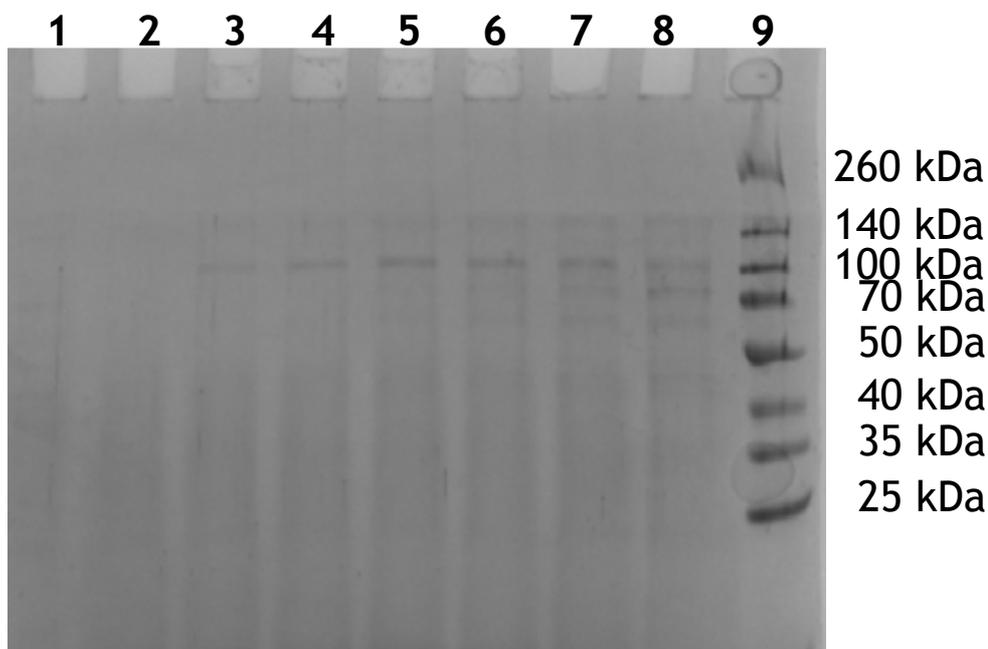


FIGURA 13.4 Eletroforese em gel SDS-PAGE dos sobrenadantes da expressão em X33 induzida por metanol à 30°C por 144 horas corado com comassie.

1: t_{144} controle – após 144 horas de indução do controle pPICZ α -A; **2 a 8:** referem-se à expressão extracelular do transformante; **2:** t_0 pPICZ α -A-AChE – antes da indução; **3:** t_{24} – após 24 horas de indução; **4:** t_{48} – após 48 horas de indução; **5:** t_{72} – após 72 horas de indução; **6:** t_{96} – após 96 horas de indução; **7:** t_{120} – após 120 horas de indução; **8:** t_{144} – após 144 horas de indução; **9:** Padrão de alto peso molecular Thermo scientific.

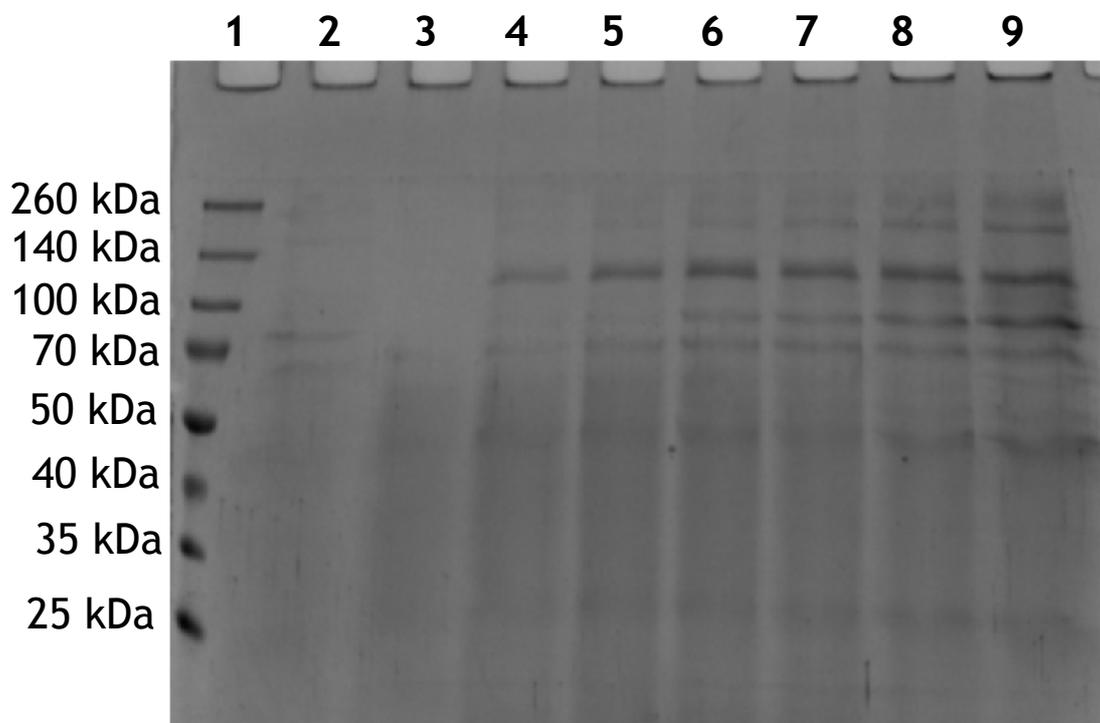


FIGURA 14.4 Eletroforese em gel SDS-PAGE dos sobrenadantes concentrados da expressão em X33 induzida por metanol à 30°C por 144 horas corado com comassie.

1: Padrão de alto peso molecular Thermo scientific; **2:** t_{144} controle – após 144 horas de indução do controle pPICZ α -A; **3 a 9:** referem-se à expressão extracelular do transformante; **3:** t_0 pPICZ α -A-AChE – antes da indução; **4:** t_{24} – após 24 horas de indução; **5:** t_{48} – após 48 horas de indução; **6:** t_{72} – após 72 horas de indução; **7:** t_{96} – após 96 horas de indução; **8:** t_{120} – após 120 horas de indução; **9:** t_{144} – após 144 horas de indução.

Em seguida foi realizado o ensaio de atividade (subitem 3.1.13) para todos os tempos de expressão. O gráfico (Figura 15.4) mostra os resultados obtidos.

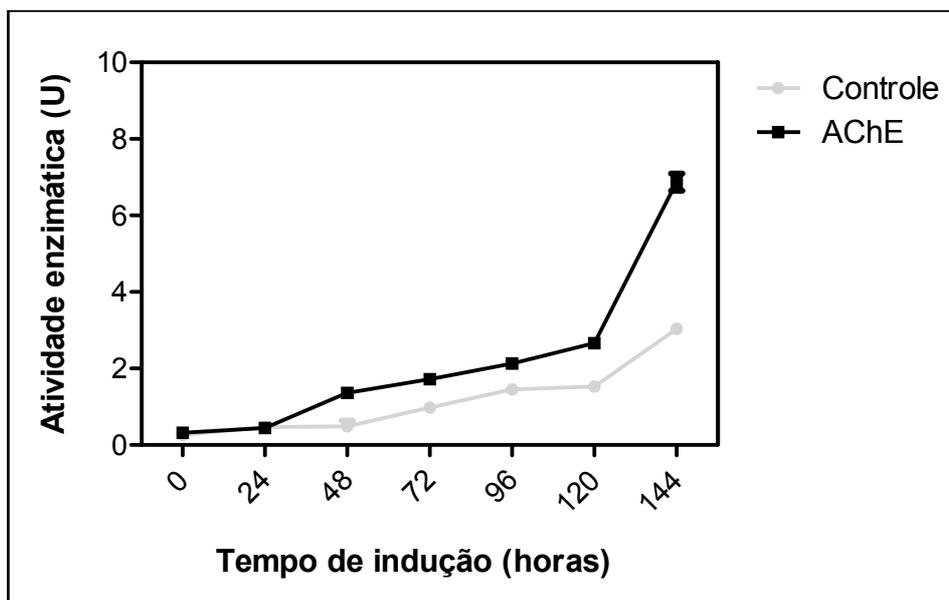


FIGURA 15.4 Resultado do teste de atividade para amostra AChE e controle nos tempos de indução: tempo 0 hora (T0) ao tempo 144 horas (T144). 1U = quantidade de AChE que catalisa a hidrólise de 1 μ M de acetilcolina por minuto.

Constata-se a expressão de AChE recombinante ativa a partir de 48 horas, sendo a expressão máxima de AChE obtida após 144 horas. No entanto a atividade verificada - não só nesta expressão, mas em inúmeras realizadas - não era suficiente para o processo de imobilização. Para avaliar se a proteína expressa poderia ter sua atividade diminuída pela presença do peptídeo de fusão (*his-tag*) resolveu-se realizar a clivagem da proteína expressa com trombina.

A Tabela 6.4 demonstra os resultados de atividade obtidos após clivagem com trombina.

Amostras	Atividade (U)*
AChE antes de clivar	6,86
AChE 25 °C	4,60
AChE 37 °C	4,69

*1U = quantidade de de AChE que catalisa a hidrólise de 1 μ M de acetilcolina por minuto.

Como é possível verificar pela Tabela 6.4, a atividade não aumentou com a clivagem. Na verdade observa-se que a atividade diminuiu. Outra amostra foi

preparada, porém deixando-a clivando por 16 horas em temperatura ambiente. A Tabela 7.4 demonstra o resultado e como é possível observar na mesma a enzima teve sua atividade diminuída drasticamente.

TABELA 7.4 Resultado do teste de atividade após 16 horas clivando com trombina	
Amostras	Atividade (U)*
AChE antes de clivar	6,86
AChE 25°C	0,25

*1U = quantidade de de AChE que catalisa a hidrólise de 1 μ M de acetilticolina por minuto.

Com o sequenciamento do clone de estudo foi possível verificar que a sequência estava de acordo com a esperada: identidade com demais AChE descritas na literatura. Portanto não havia nada de errado com o clone. Outras linhagens de *Pichia* foram utilizadas na tentativa de obter uma expressão melhor. No entanto a linhagem X33 foi a que apresentou melhores resultados de expressão. A resposta do porquê da expressão está sempre baixa veio com os experimentos realizados pela Dra Claudia A. Alves (processo FAPESP 14/21852-8) do nosso grupo de pesquisa: a enzima estava sendo expressa porém ela estava se ligando à membrana celular da *Pichia*. A AChE nativa é uma proteína que, naturalmente, se relaciona com a membrana celular por meio dos receptores ligados a ela. Portanto, interagir com a membrana celular da *Pichia* é um comportamento até previsível para AChE recombinante. Estratégias de solubilização para levar a enzima para o sobrenadante foram adotadas pela Dra Alves, mas sem sucesso no que diz respeito a obter a enzima em quantidade suficiente para caracterização bioquímica/ cinética e imobilização.

4.2 - Estudos *in silico* da AChE

4.2.1 - Alinhamentos

O alinhamento sequencial da proteína heteróloga com a AChE de formiga *Acromyrmex echinator* (EGL67049.1) apresentou identidade sequencial de 97 %. Uma identidade tão alta era esperada, ao passo que os *primers* foram desenhados com base na AChE de *A. echinator*. No entanto, a sequência heteróloga apresenta algumas peculiaridades: a presença do trecho RGKTMVAATGKSVDWFGIPYAQ e PENVTLF ausentes na sequência da AChE de *A. echinator* (Figura 16.4).

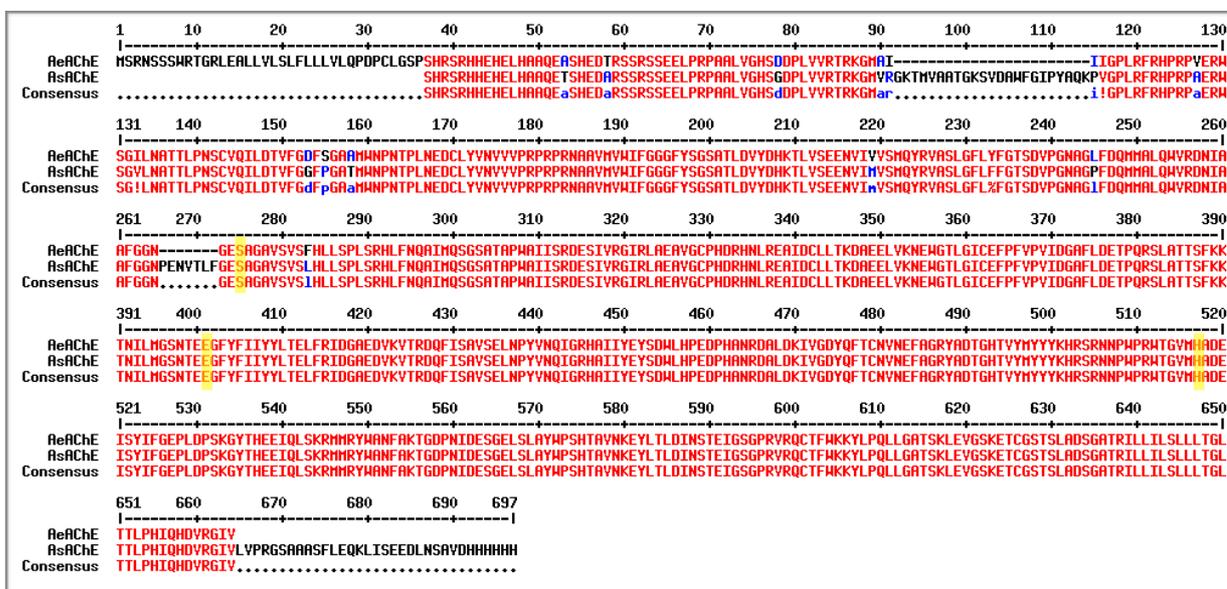


FIGURA 16.4 Alinhamento obtido pelo programa *MultAling* entre as sequências de aminoácidos da AChE de *A. echinator* e de *A. sexdens*. Identidade sequencial de 97 % obtida pelo programa *ClustalW*Omega. A tríade catalítica formada pelos resíduos de serina, glutamato e histitina estão grifados em amarelo.

Já o alinhamento sequencial da proteína heteróloga com a AChE de *Drosophila melanogaster* (PDB 1QO9) apresentou identidade sequencial de 40 % (Figura 17.4). A *D. melanogaster* é uma espécie de inseto (mosca) que por muito tempo foi popularmente chamada de “mosca-da-fruta”, o terno é agora usado para outra espécie de mosca da família *Tephritidae*. Por possuir um genoma simples, curto período de vida e ser facilmente reproduzida em cativeiro, a *Drosophila* se tornou uma forte candidata para as pesquisas genéticas (PATTERSON et al., 1943) a saber que o primeiro mapa genético foi obtido usando-a (SORSA, 1988). No que

diz respeito a AChE de *D. melanogaster*, até o momento, este é o único modelo tridimensional da AChE de inseto depositado no banco de dados. O fato da identidade sequencial ser de 40 % é animador pois torna possível seu uso como molde para o estudo de modelagem da AChE de *A. sexdens*.

Diferentemente do observado no alinhamento com a *A. echinator*, trechos semelhantes aos RGKTMVAATGKSVDWFGIPYAQ e PENVTLF estão presentes na sequência da AChE de *D. melanogaster* (Figura 17.4).

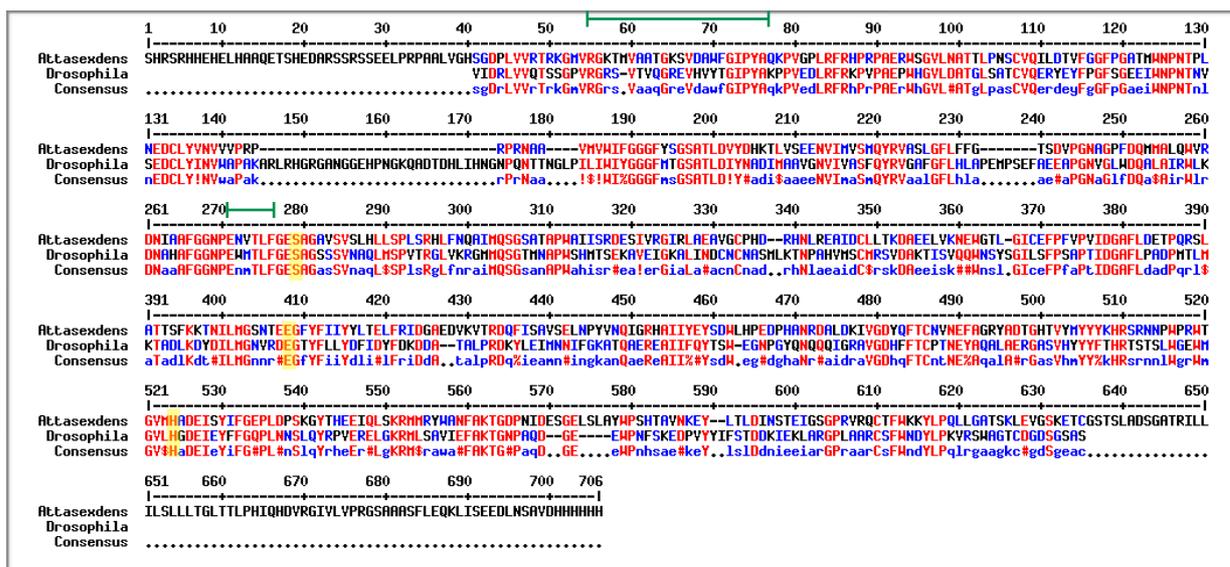


FIGURA 17.4 Alinhamento obtido pelo programa *MultAling* entre as sequências de aminoácidos da AChE de *Atta sexdens* e *Drosophila melanogaster*.

Identidade sequencial de 40 % obtida pelo programa *ClustalWOmega*. A triade catalítica formada pelos resíduos de serina, glutamato e histitina estão grifados em amarelo.

4.2.2 - A qual classe de genes (ace1 ou ace2) pertence a AChE de *A. sexdens*?

Estudos descritos na literatura demonstraram a presença de dois genes distintos envolvidos na síntese de AChE, denominados ace1 (codifica para AChE1) e ace2 (codifica para AChE2). A saber, enquanto para *D. melanogaster* foi encontrado apenas o gene ace2, para *Anopheles gambiae* foram encontrados ambos os genes. De acordo com KIM e LEE (2013) a presença destes dois genes foi observada em vários insetos o que torna o evento comum. O que chama a atenção é as diferentes propriedades farmacológica e toxicológica das AChEs (AChE1 e AChE2) demonstradas por KIM e colaboradores (2010), principalmente no que diz respeito à resistência aos inseticidas (organofosforados e carbamatos). Estudos indicam que essa

resistência está diretamente relacionada ao gene *ace1* (NABESHIMA et al., 2004; WEILL et al., 2004).

KIM e LEE (2013) demonstram por análise filogenética que a família Formicidae apresenta as duas enzimas, embora ainda não se tenha isolado e nem caracterizado nenhuma delas. O que se encontra no banco de dados de proteínas são AChE de formigas preditas e sem classificação. Com a finalidade de classificá-las juntamente com a sequência obtida de *A. sexdens*, uma árvore filogenética foi construída (Figura 18.4) com sequências de algumas AChEs de insetos já classificadas em AChE1 ou AChE2 e as sequências de AChE de formigas (em asterisco), incluindo a sequência da *A. sexdens* obtida neste estudo (AChE-*Atta-sexdens*).

A árvore filogenética permite demonstrar relações de semelhanças e diferenças entre as sequências filogeneticamente analisadas. Isso significa que sequências muito semelhantes serão distribuídas de tal maneira a ficarem próximas umas das outras enquanto que as dissimilares formarão grupos que serão afastados. Quando analisada a árvore filogenética representada na Figura 18.4, observa-se a separação das sequências em dois grandes clados: o superior formado por sequências ditas AChE1 e o inferior por sequências ditas AChE2. As sequências de AChE de formigas foram distribuídas pela árvore, sendo possível constatar a existência de AChE1 e AChE2 na família Formicidae como mencionado por KIM e LEE (2013). A sequência de AChE de *A. sexdens* foi classificada como pertencente a classe das AChE1, uma vez que apresentou melhores relações filogenéticas para com as sequências que formam o clado da AChE1.

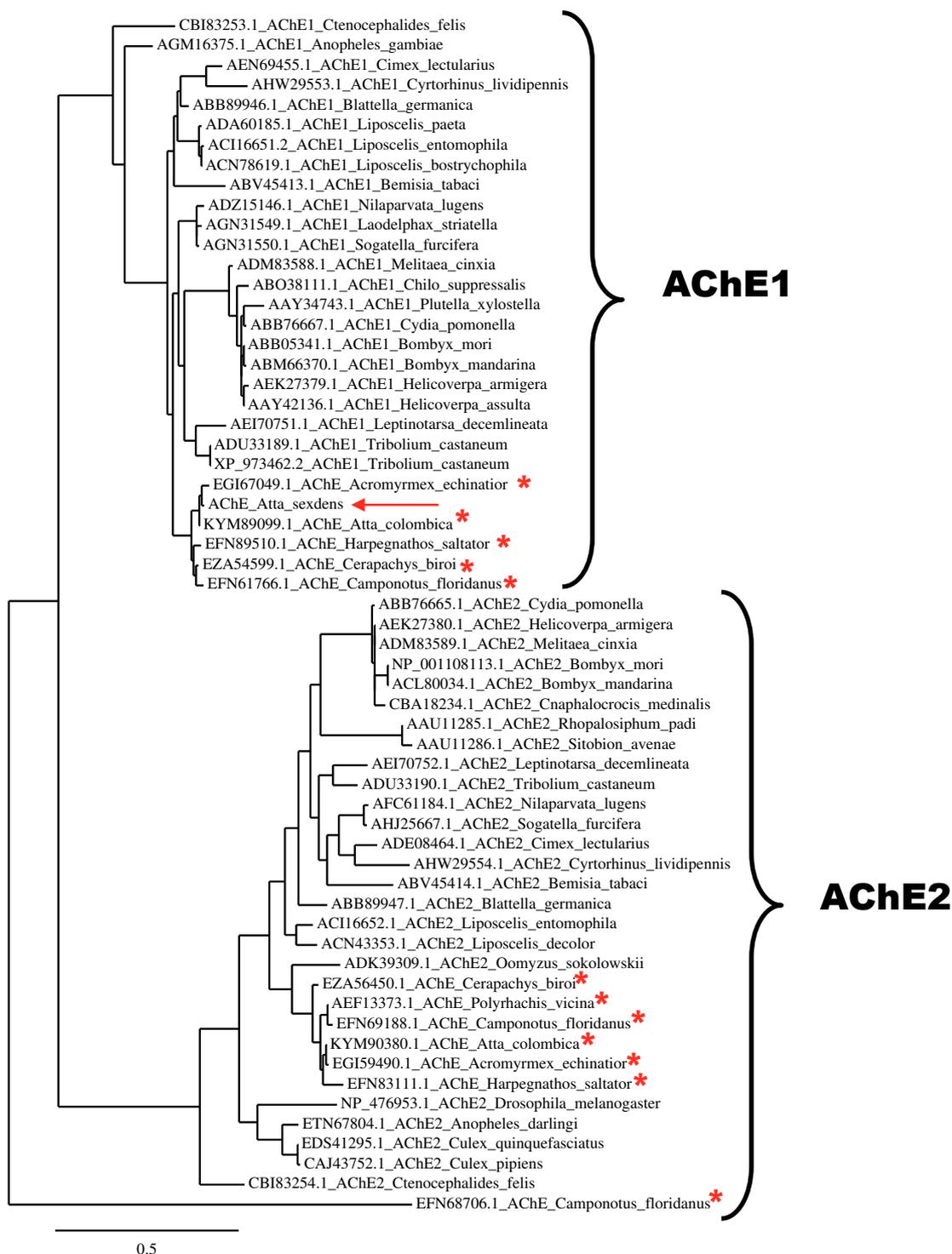


FIGURA 18.4 Árvore filogenética de seqüências de aminoácidos de AChE de alguns insetos já classificados em AChE1 ou AChE2, seqüências de AChE de formigas (asterísticos) e da seqüência heteróloga de *A. sexdens* (seta vermelha).

4.2.3 - Modelagem molecular: obtenção do modelo 3D da AChE de *A. sexdens*

O modelo tridimensional da AChE de *A. sexdens* foi construído por modelagem por homologia utilizando o programa computacional Swiss-Model (ARNOLD et al., 2006) que, como descrito no subitem 3.2.1, é uma técnica baseada na constatação de que moléculas com bom grau de semelhança sequencial (identidade) apresentam enovelamento (estrutura 3D) semelhantes. A utilização deste método somente seria possível se houvesse uma molécula de identidade razoável com a AChE de interesse, denominada molécula alvo, e que tivesse sua estrutura determinada (molécula molde). No caso, a molécula molde foi a estrutura de AChE de *Drosophila melanogaster* (PDB:1QO9).

4.2.4 - Validação do modelo tridimensional

Avaliou-se a qualidade, no que diz respeito aos fatores estereoquímicos, do modelo da AChE de *A. sexdens* com o programa PROCHECK (LASKOWSKI et al, 1993). Neste requisito, o modelo apresentou pelo mapa de Ramachandran (Figura 19.4) 83,7 % dos seus resíduos de aminoácidos em regiões consideradas muito favoráveis, 13,3 % em regiões favoráveis, 2,0 % em regiões generosamente permitidas e, finalmente, 1,1 % em regiões não permitidas. Os resíduos de glicina estão representados no mapa por triângulos.

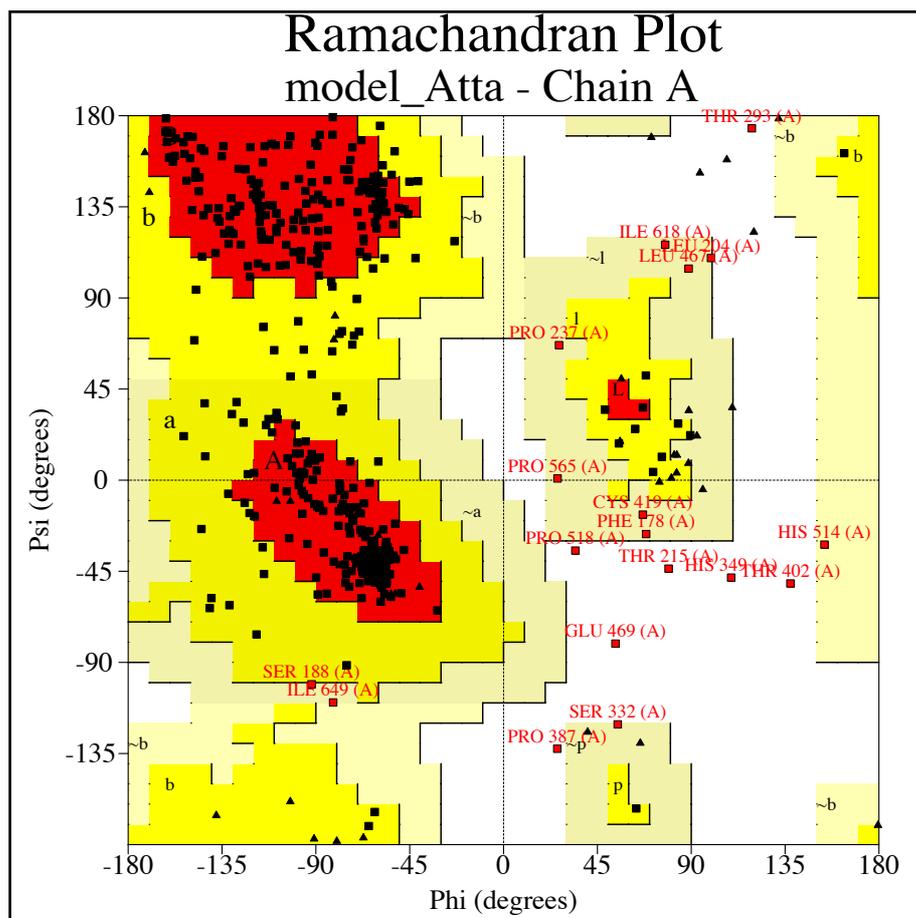


FIGURA 19.4 Mapa de Ramachandran do modelo da AChE de *A. sexdens*. Os ângulos Phi e Psi estão em graus. Os triângulos representam os resíduos de glicina.

A Figura 20.4 demonstra os parâmetros da cadeia principal obtidos pelo PROCHECK através da comparação estrutural do modelo com outras estruturas refinadas na resolução de 1,5 Å (por modelagem molecular a resolução de 2,0 Å é comumente usada). O símbolo de um quadrado preto mostra os dados para o modelo 3D obtido para AChE de *A. sexdens*. As regiões destacadas na cor roxa dos gráficos representam as faixas de resultados obtidos por essas estruturas. A linha central corresponde ao ajuste mínimo quadrático para a inclinação média em função da resolução enquanto que a largura da banda corresponde à variação de um desvio padrão em torno da média. A Figura 20.4 a ilustra a qualidade do mapa de Ramachandran com base no número de resíduos presentes nas regiões ditas mais favorecidas. A Figura 20.4 b ilustra a planaridade da ligação peptídica, ou seja, o desvio padrão para o ângulo torsional ômega (ω) da estrutura. Quanto menor for este desvio, mais próximo de 180° estará o ângulo, o que implica em uma ligação peptídica perfeitamente planar. A Figura 20.4 c representa as más interações de

não-ligantes medida pelo número de maus contatos por 100 resíduos. A distorção tetraédrica do C alfa (Figura 20.4 d) é medida por meio do cálculo do desvio padrão do ângulo de torção zeta, que é um ângulo de torção fictício na medida em que não está definida sobre qualquer ligação efetiva na estrutura. Sendo definido pelos seguintes átomos: C alfa, N, C, e C beta. A energia de ligação de hidrogênio da cadeia principal (Figura 20.4 e) é dada pelo desvio padrão das energias de ligação de hidrogênio para ligações da cadeia principal de hidrogênio. E finalmente, o parâmetro Gfactor (Figura 20.4 f), que é uma medida da normalidade total da estrutura. O valor global é obtido a partir de uma média de todos os diferentes G_{factor} para cada resíduo na estrutura.

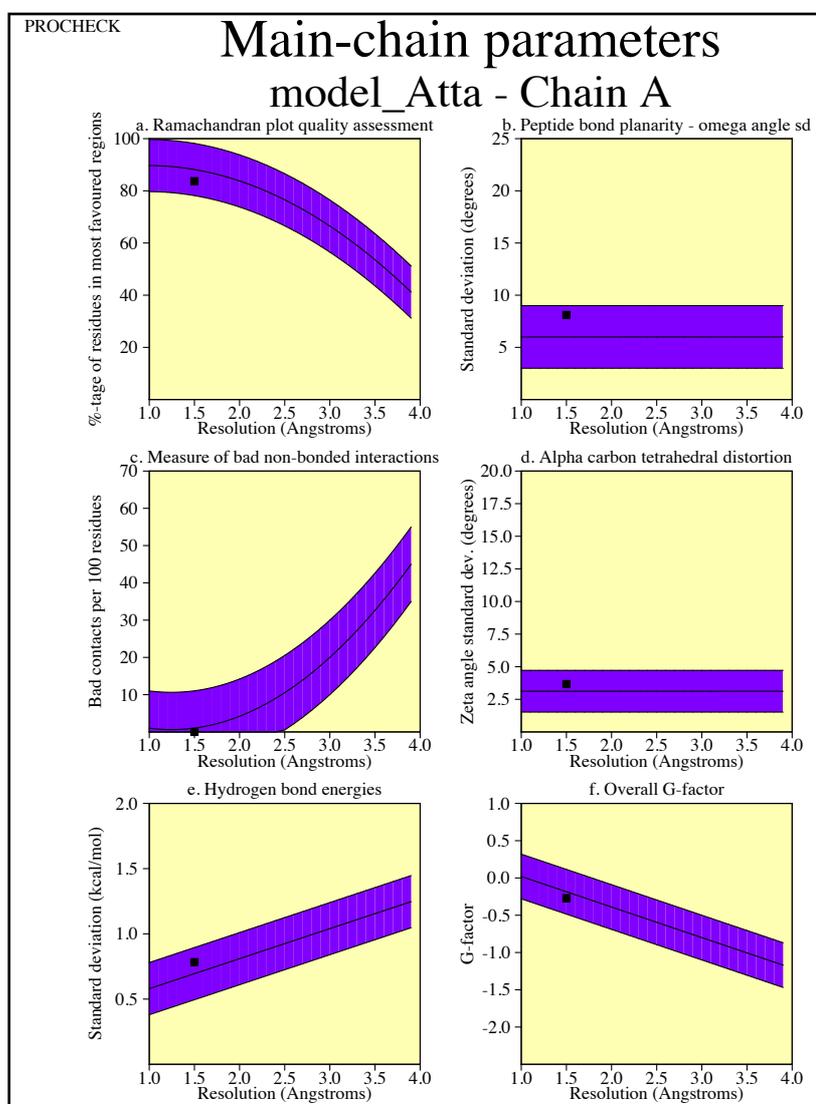


FIGURA 20.4 Estatísticas de alguns parâmetros estereoquímicos da cadeia principal (representado pelo quadrado em preto) do modelo 3D da AChE de *A. sexdens* quando comparados com estruturas refinadas na mesma resolução:

a. qualidade do mapa de Ramachandran, **b.** planaridade da ligação peptídica (ângulo ômega), **c.** medidas ruins de interações entre não-ligantes, **d.** distorção tetraédrica, **e.** energia de ligação de hidrogênio e **f.** G_{factor} .

Observando os gráficos (Figura 20.4) verifica-se que o modelo (dados para o modelo são mostrados como símbolo de quadrado preto) não apresenta nenhum fator estereoquímico fora dos padrões determinados para estruturas resolvidas a 1,5 Å.

Para fins comparativos, analisou-se também a qualidade do molde (PDB:1QO9) com o PROCHECK. Como resultado (Figura 21.4) 73 % dos resíduos de aminoácidos do molde encontra-se em regiões consideradas muito favoráveis, 23,3 % em regiões favoráveis, 2,2 % em regiões generosamente permitidas e, finalmente, 1,5 % em regiões não permitidas. Sendo os resultados próximos aos obtidos para o modelo, no que diz respeito aos resíduos adotarem conformações energeticamente favoráveis, o modelo pode ser comparado com à estrutura cristalográfica da AChE de *D. melanogaster*.

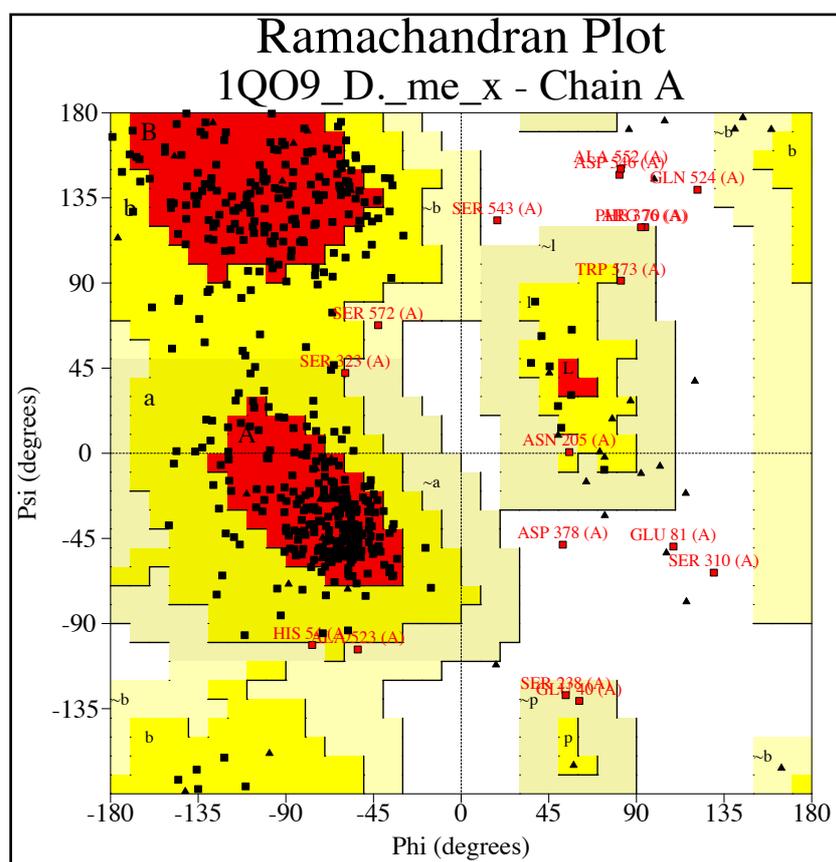


FIGURA 21.4 Mapa de Ramachandran do molde (PDB 1QO) de *D. melanogaster*. Os ângulos Phi e Psi estão em graus. Os triângulos representam os resíduos de glicina.

A análise do modelo pelo programa VERIFY 3D (LUTHY et al, 1992) mostrou-se satisfatória, pois 92,2 % dos resíduos tem uma pontuação média 3D-1D $\geq 0,2$ indicando que a maioria dos aminoácidos do modelo apresenta uma

conformação favorável. A mesma análise feita para o molde indicou que 97,6 % dos resíduos apresenta uma pontuação média 3D-1D $\geq 0,2$.

Estes resultados obtidos nas análises da qualidade estrutural demonstraram que o modelo proposto para a AChE de *A. sexdens* é confiável e representativo.

4.2.5 - O modelo estrutural da AChE de *A. sexdens* e o sítio ativo da enzima

As AChEs são enzimas pertencentes a superfamília das α/β -hidrolases com um núcleo formado por oito folhas- β conectada por α -hélices (OLLIS et al., 1992). Seu sítio ativo está localizado numa cavidade estreita e profunda que devido à presença de resíduos de aminoácidos aromáticos é conhecida como “cavidade aromática” (HAREL et al., 1993).

A Figura 22.4 mostra que o modelo estrutural da AChE de *A. sexdens* é constituída de 20 alfa-hélices e 11 folhas betas conectadas, além de três ligações dissulfeto.

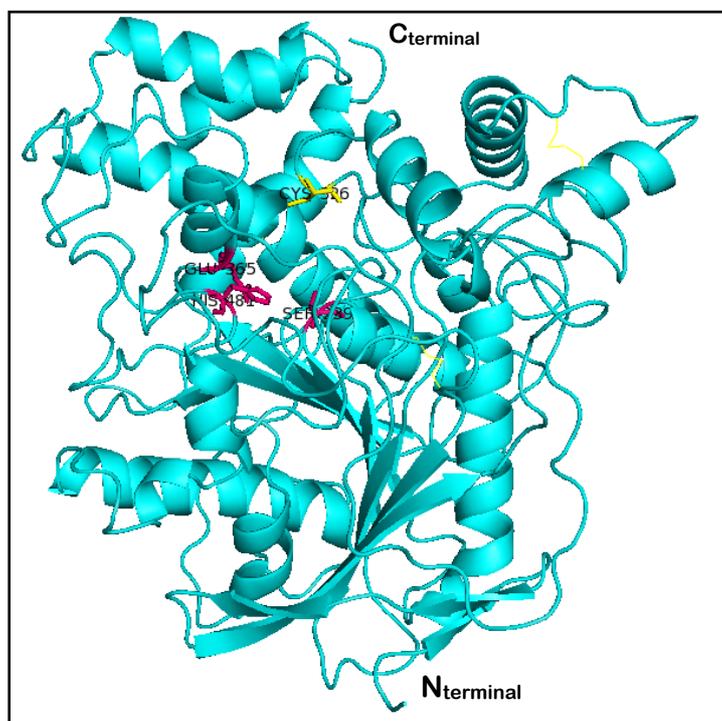


FIGURA 22.4 Modelo da estrutura 3D da AChE de *A. sexdens*. Em forma de *stick* rosa a tríade catalítica e em forma de *linha* amarela as ligações de dissulfeto.

Na Figura 23.4 é possível visualizar melhor os aminoácidos essenciais para a atividade catalítica da enzima, conhecidos como a “tríade catalítica” que é formado na AChE de *A. sexdens* pela Ser239, Glu327 e His481.

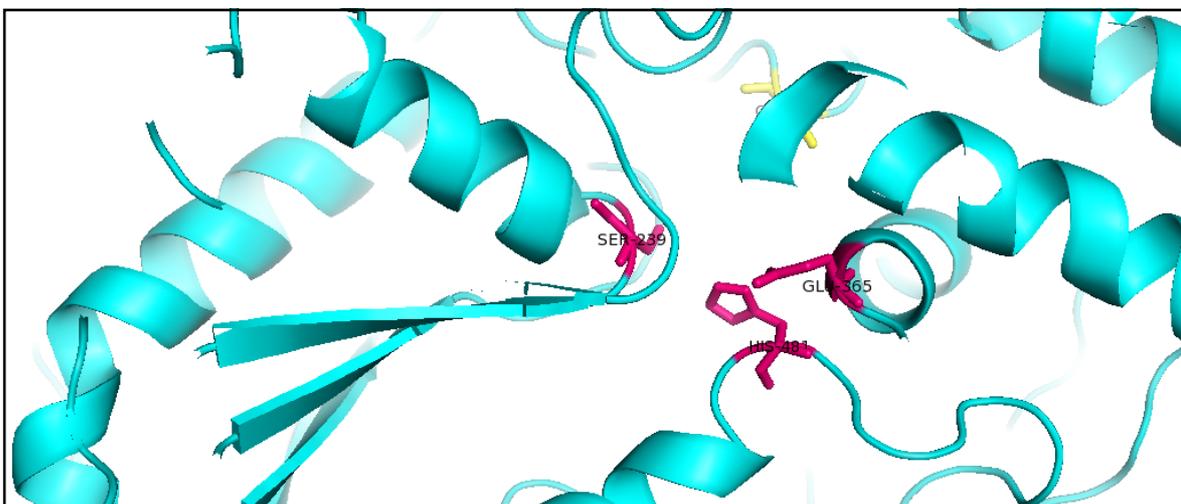


FIGURA 23.4 Em evidência o sítio catalítico da estrutura 3D da AChE de *A. sexdens* formado pela tríade catalítica (Ser239, Glu327 e His481) em forma de *stick* rosa.

Apesar da identidade sequencial da AChE de *A. sexdens* com a de *D. melanogaster* e *Homo sapiens* não ser muito alta (40 % e 43 % respectivamente), suas estruturas 3D apresentam enovelamento semelhante e os seus sítios ativos se sobrepõem (Figuras 24.4 e 25.4) sendo as principais diferenças observadas nos *loops*, o que não afeta a função catalítica da enzima de maneira direta.

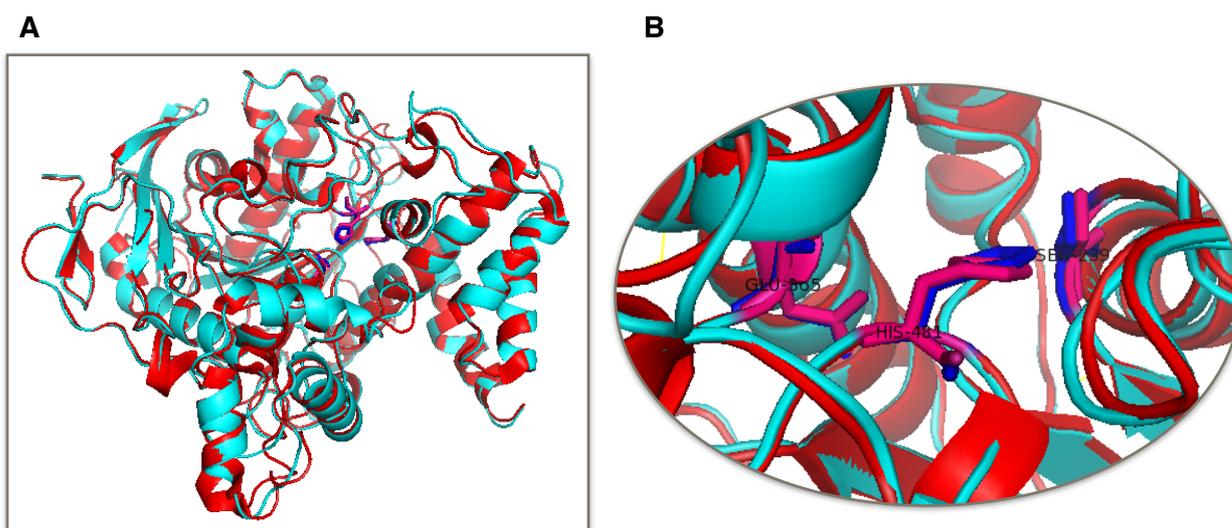


FIGURA 24.4. Sobreposição das estruturas 3D de AChE *A. sexdens* (em azul) com a de *D. melanogaster* (em vermelho). Em **A** a sobreposição das estruturas e em **B** o sítio catalítico é colocado em evidência.

A sobreposição entre o modelo 3D da AChE de *A. sexdens* e a AChE humana (Figura 25.4) não é tão semelhante quanto o observado para a de *D. melanogaster*, mas o que chama a atenção é a presença de um resíduo de Phe (fenilalanina) no lugar do resíduo de Cys (cisteína) próximo ao sítio catalítico. Essa diferença foi observada por meio de alinhamentos sequenciais múltiplos de diferentes AChEs, onde constatou-se a presença do resíduo de cisteína (Cys) em AChEs de insetos, porém ausente em AChEs de mamíferos e aves (PEZZEMENTI et al 2006; PANG, 2006; PANG, 2007).

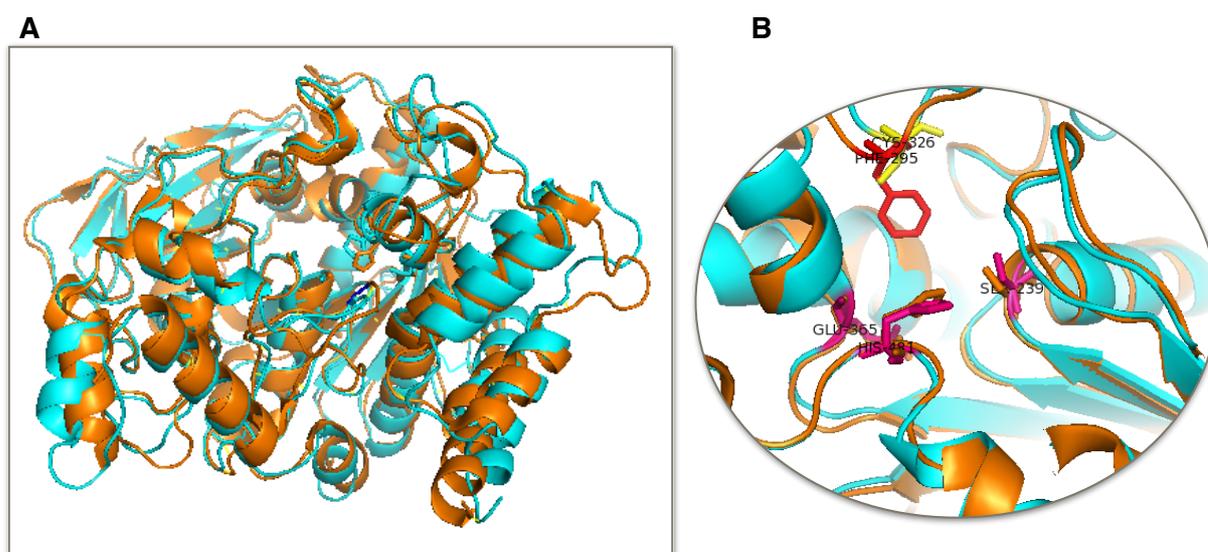


FIGURA 25.4. Sobreposição das estruturas 3D de AChE *A. sexdens* (em azul) com a de *Homo sapiens* (em laranja). Em **A** a sobreposição das estruturas e em **B** o sítio catalítico é colocado em evidência.

PANG e colaboradores (2006) descreve que tal resíduo de cisteína (Cys) está localizado próximo ao sítio ativo da AChE de insetos e ausente em AChE de mamíferos, aves e peixes. O curioso é que a presença deste resíduo de Cys só está presente nos insetos que possuem o gene *ace1* - confirmando mais uma vez que a AChE de *A. sexdens* expressa é uma AChE1. Este resíduo tem sido considerado muito promissor para ligação com inibidores específicos para AChE de insetos, tornando-o um novo alvo para desenvolvimento de novos inseticidas (PANG et al., 2012). Tais inseticidas apresentarão maior segurança no que diz respeito à intoxicação uma vez que o alvo está ausente em mamíferos. No que diz respeito à resistência PANG e colaboradores (2009) mencionam que os insetos ainda não tiveram tempo evolutivo de apresentarem resistência no resíduo de Cys-alvo como têm acontecido com o resíduo de serina, que é o alvo da maioria dos inseticidas que

são utilizados por décadas. Assim, inibidores da AChE desenvolvidos com base nessa cisteína podem ser mais específicos e apresentar menor efeito colateral.

4.3 - Estudo de obtenção das AChEs nativas

Os trabalhos que descrevem ensaios de triagem de inseticidas usam muitas vezes a AChE de *Electrophorus electricus* (GABROVSKA et al., 2008); baseando-se nos trabalhos de PANG e colaboradores (2012) sobre a diferença entre AChE de insetos e mamíferos e, considerando a falta de descrição na literatura sobre a AChE nativa de *A. sexdens*, independentemente dos esforços realizados para expressão desta enzima, o objetivo primordial desse trabalho foi isolar e caracterizar a AChE nativa de *A. sexdens*. Este tópico, descreve os resultados obtidos.

4.3.1 - Obtenção e purificação de AChEs nativas

A partir do macerado de cabeças de formigas cortadeira (saúva), chamado de extrato bruto (EB), como primeira etapa de purificação foi utilizada a técnica de precipitação com sulfato de amônio (SA) que é um processo de purificação baseada nas diferenças de solubilidade protéica. Sabe-se que a solubilidade de proteína geralmente é reduzida em elevadas concentrações salinas (*salting out*). A adição de certos sais, como o sulfato de amônio, em quantidades adequadas pode precipitar seletivamente algumas proteínas enquanto outras permanecem em solução. Assim, foram feitas precipitações independentes com sulfato de amônio 50 %, 55 % e 60 % (m/v). A Figura 26.4 e a Tabela 8.4 mostram os resultados obtidos destas precipitações.

TABELA 8.4 Teste de atividade antes e após a precipitação com sulfato de amônio em diferentes concentrações.

Amostra	EB	ppt50	S50	ppt55	S55	ppt60	S60
Atividade (U)*	29,20	6,64	4,58	19,53	1,49	19,02	0,59

EB: extrato bruto, ppt: precipitado e S: sobrenadante.

*1U = quantidade da AChE que catalisa a hidrólise de 1 μ M de acetilticolina por minuto.

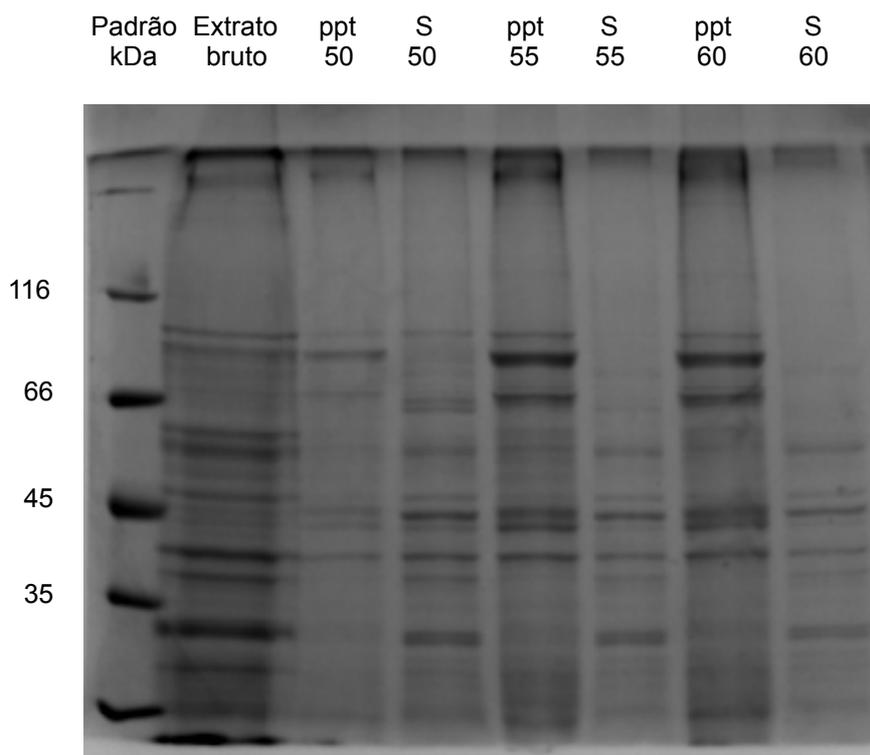


FIGURA 26.4 Gel SDS-PAGE 15 % corado com Comassie das precipitações a 50 %, 55 % e 60 % de SA. Sendo ppt: precipitado e S: sobrenadante. Padrão de alta massa molecular (GE).

Das precipitações realizadas optou-se pela precipitação com SA 55 % (m/v) para dar continuidade na purificação da AChE nativa uma vez que apresentou uma atividade melhor que para a precipitação com SA 50 % (m/v) e por possuir uma menor concentração salina quando comparada com a precipitação utilizando SA 60 % (m/v).

Foi realizada uma análise *in silico* de uma sequência de AChE da formiga *Acromyrmex echinator* (GenBank: EGI67049.1). Esta possui 634 aminoácidos, massa molecular estimada de 70884,2 Da e pI 5,86 (ProtParam tool).

Após realizar a precipitação com SA a 55 % (subitem 3.3.3), o precipitado foi ressuspendido e dialisado para a retirada do sal. Optou-se, com base nos dados *in silico* obtidos para AChE de *A. echinator*, por aplicar esta amostra em uma coluna de troca iônica GE HiTrap DEAE-FF (1 mL). Este tipo de cromatografia está baseada nas diferenças de carga e magnitude da carga elétrica líquida de proteínas em um dado pH. As colunas de troca aniônica são compostas por resina contendo grupos catiônicos. Como a AChE de *A. echinator* apresenta pI teórico de 5,86; em pH 8,0 a enzima deve apresentar carga líquida negativa, deste modo, espera-se que ela se ligue à resina de troca aniônica. Dois *pools* com atividade para AChE foram detectados: um deles sem afinidade com a coluna de troca aniônica

(aqui chamado de AsAChE-A que corresponde às frações 1, 2 e 3) e outro, eluído no gradiente salino, que possui afinidade (AsAChE-B que corresponde às frações 40, 41 e 42) (Figura 27.4). As amostras com atividade para acetilcolinesterase frente a acetiltiocolina foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 28.4).

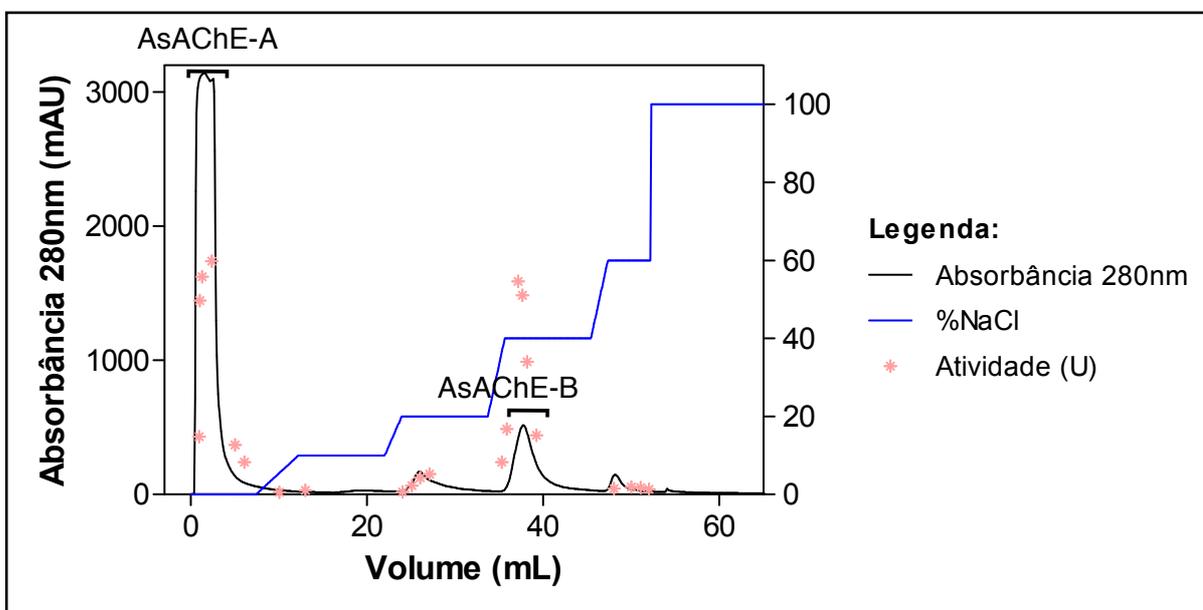


FIGURA 27.4 Cromatograma obtido do sobrenadante após precipitação com sulfato de amônio 55 % (m/v) na coluna de troca iônica GE HiTrap DEAE-FF. Os asteriscos correspondem à atividade para AChE das frações eluídas da coluna.

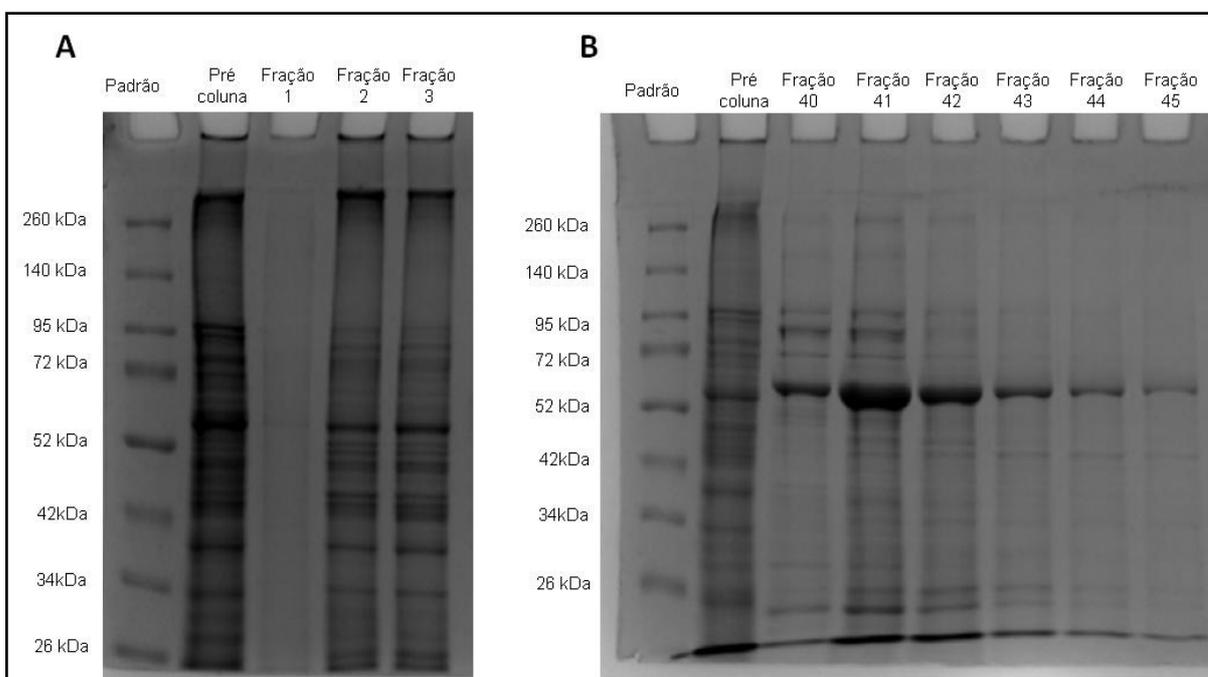


FIGURA 28.4 Gel de SDS-PAGE 15 % das frações ativas da cromatografia em coluna de troca iônica GE HiTrap DEAE-FF. O gel foi corado com azul de comassie. Foi usado o padrão de alto peso molecular Thermo scientific. Frações 1-3, que não se ligam na coluna; frações 40-45, frações eluídas no gradiente salino.

As etapas de purificação foram acompanhadas por ensaios de atividade utilizando o método de Ellman (ELLMAN et al., 1961) e os resultados estão sumariamente mostrados na Tabela 9.4. Observa-se que a quantidade de proteínas totais vai diminuindo ao longo do processo de purificação, uma vez que o processo vai eliminando proteínas não específicas. Por outro lado, a atividade específica da enzima aumenta. O que chama a atenção na Tabela 9.4 é o rendimento/recuperação ter resultado num valor acima de 100% após o processo de precipitação com sulfato de amônio. Como mencionado por CASS & CASSIANO (2015) quando tal evento acontece nos estágios iniciais do processo de purificação o fato se deve à remoção de inibidores e de interações intramoleculares da enzima.

Procedimentos	Volume (mL)	Teor protéico (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U*)	Atividade específica (U/mg proteína)	Recuperação (%)	Fator de purificação
Extração extrato bruto	10,0	191,5	1915,2	134	0,1	100	1
Precipitação sulfato de amônio	2,5	355,6	888,9	241	0,3	180	4
Cromatografia HiTrap DEAE-FF AsAChE-A	2,0	139,9	279,7	66	0,2	49	3
Cromatografia HiTrap DEAE-FF AsAChE-B	3,0	29,3	87,8	22	0,2	16	4

*1U= quantidade da AChE que catalisa a hidrólise de 1 μ M de acetilcolina por minuto.

4.3.2 - Determinação da atividade de AChE em gel de poliacrilamida

Analisando os resultados obtidos até o momento (cromatografia, ensaio de atividade e eletroforese) percebeu-se a possibilidade de existir duas enzimas de AChE ativas: uma que não tem afinidade com a coluna de troca aniônica (AsAChE-A) e outra que possui afinidade (AsAChE-B). Neste contexto, era necessário utilizar alguma técnica que permitisse descobrir a existência ou não de diferentes AChEs em *A. sexdens*. A técnica escolhida foi determinação da atividade de AChE em gel de poliacrilamida após eletroforese em condições não desnaturantes, pois a enzima

desnaturada perde sua função catalítica. Além disso, a AChE pode sofrer clivagens pelo SDS como demonstrado por TOUTANT (1989). Em seu estudo ele demonstra que a AChE dimérica de *Drosophila melanogaster* de massa molecular de 140 kDa na presença de SDS libera fragmentos de 16 kDa ao passo que no final do processo de clivagem pelo SDS a enzima passa a ser um monômero de massa molecular de 55 kDa. Assim, a não utilização de SDS, elimina a possibilidade do gel ser marcado por bandas diferentes, que pertencem à mesma molécula.

Para o experimento foram aplicados em géis nativos as amostras: extrato bruto e pré coluna da DEAE (sobrenadante após precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio), AsAChE-A e AsAChE-B. Cada amostra foi aplicada em dois poços diferentes do gel para que após a corrida cromatográfica uma parte do gel fosse corada com comassie. Ao final do experimento constatou-se a existência de duas enzimas.

Analisando o gel de atividade **A** (Figura 29.4) observa-se que as duas enzimas apresentam um padrão de migração distinto sendo possível distingui-las como sinalizado pelas setas no gel **A** (Figura 29.4). Além de constatar a existência de duas AChEs, a cromatografia de troca iônica usada na purificação resultou na separação das enzimas.

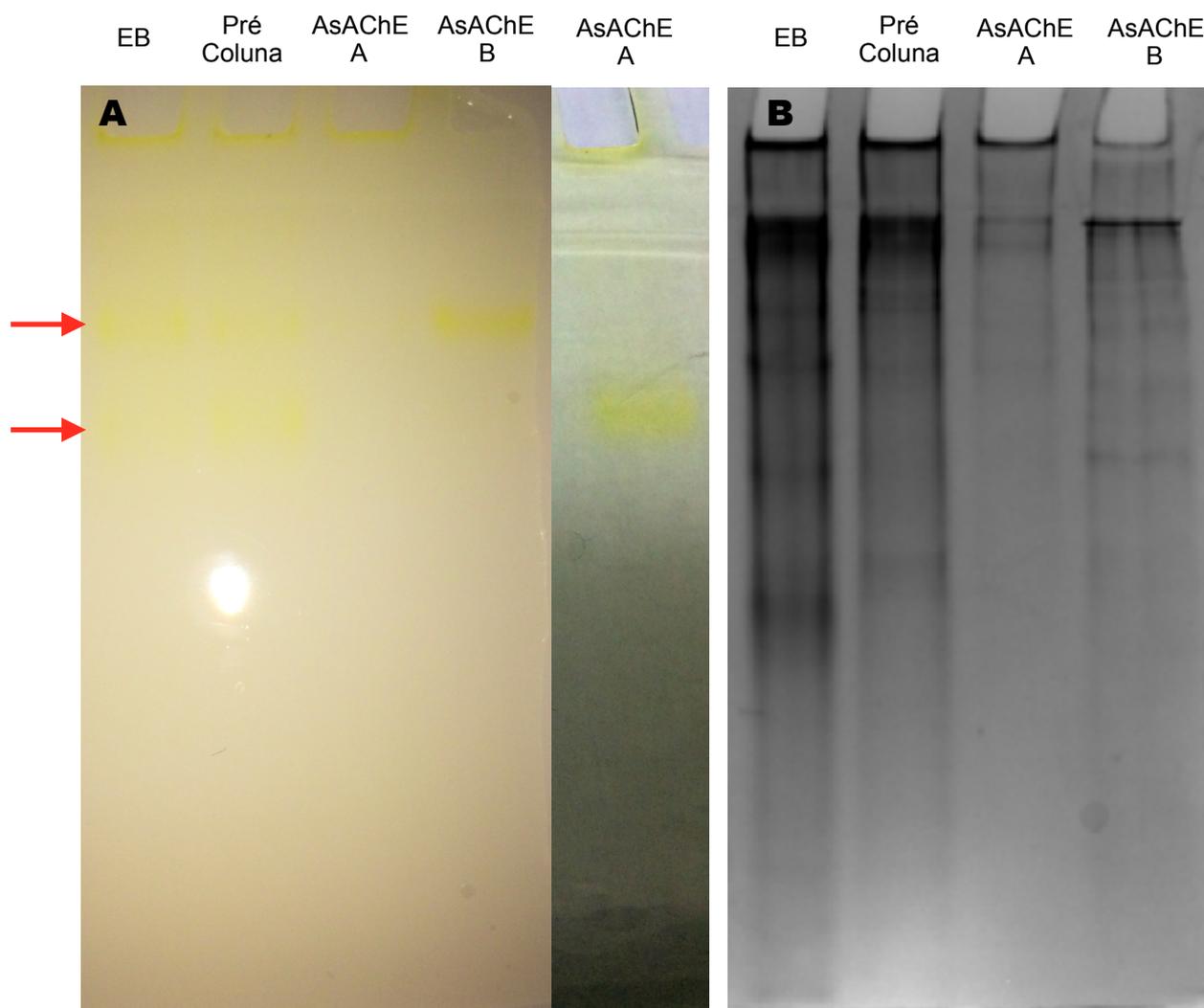


FIGURA 29.4 Gel de native-PAGE 15 % do extrato bruto, pré coluna da DEAE, AsAChE-A e AsAChE-B.

A: corado com o meio reacional do ensaio de atividade (ELLMAN et al, 1961). **B:** corado com comassie.

4.3.3 - Caracterização enzimática

Enquanto um único gene (*ace*) codifica a AChE de vertebrados (SOREQ & SEIDMAN, 2001), em muitos insetos isso não ocorre.

Estudos indicando menor sensibilidade (resistência) da AChE frente aos inseticidas anti-colinesterase sem que fosse identificado qualquer alteração de aminoácidos na sequência de AChE das estirpes resistentes (HEMINGWAY et al., 1993) somado ao fato de que a presença de diferentes formas moleculares da AChE não interferiam na atividade catalítica, pois os sítios catalíticos são independentes (MASSOULIE & RIEGER, 1969; MASSOULIE et al., 1975; VIGNY et al., 1978), despertaram conflitos que foram sanados com a descoberta de um novo gene *ace* em *Schizaphis graminum* (GAO et al., 2002). Em seguida outros trabalhos foram

sendo publicados demonstrando a existência de insetos com ambos os genes (LI & HAN 2002; CHEN & HAN 2006; SHANG et al., 2007; BADIOU et al., 2007; MENG et al., 2016) enquanto outros como *D. melanogaster* e *Musca domestica* possuem apenas um único gene *ace* (FOURNIER et al., 1988; WEILL et al., 2002; HUCHARD et al., 2006).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que duas AChEs ativas de *A. sexdens* foram isoladas e ambas enzimas ineditamente foram identificadas, classificadas, caracterizadas e imobilizadas, o que corrobora com os dados da existência de dois genes para a maioria dos insetos: *ace1* (codifica para AChE1) e *ace2* (codifica para AChE2) (como já discutido no subitem 4.2.2 deste trabalho).

4.3.3.1 - Determinação da massa molecular AsChE-A e AsChE-B

Com o objetivo de se estimar a massa molecular das enzimas, as amostras obtidas da coluna de troca iônica, AsChE-A e AsChE-B, foram aplicadas em uma coluna de exclusão molecular Superose 12. A Figura 30.4 demonstra o cromatograma obtido. Por ele observa-se que a banda cromatográfica correspondente à BSA (em preto) se sobrepõem à banda cromatográfica (em azul) com atividade para AChE da amostra AsAChE-B. A atividade para a amostra AsAChE-B está representada no cromatograma (Figura 30.4) pelos losangos em laranja. Como a proteína BSA possui massa molecular de 66 kDa estima-se que a massa molecular da amostra AsAChE-B é muito próxima de 66 kDa.

Sabe-se que para a AChE de insetos três diferentes formas moleculares podem ser encontradas. A principal delas é o dímero anfifílico que encontra-se ancorada na membrana plasmática por GPI (glicosil-fosfatidilinositol) (KIM et al., 2010). A segunda forma encontrada é um dímero hidrofílico solúvel em água (gerado a partir do dímero anfifílico por proteólise) e a última forma é o monômero hidrofílico (originado da redução dos dois dímeros) (KIM et al., 2010; KIM et al., 2012). Baseando-se no fato de não ter sido utilizado detergentes ou tensoativos na obtenção do extrato bruto apenas as formas moleculares (dímeros hidrofílicos e monômeros) podem estar presentes nas amostras estudadas. Neste caso, os resultados indicam que a

AsAChE-B é um monômero de 66 kDa e a AsAChE-A que possuiu uma massa molecular maior que a AsAChE-B pode ser um dímero, tendo assim uma massa molecular por volta de 132 kDa.

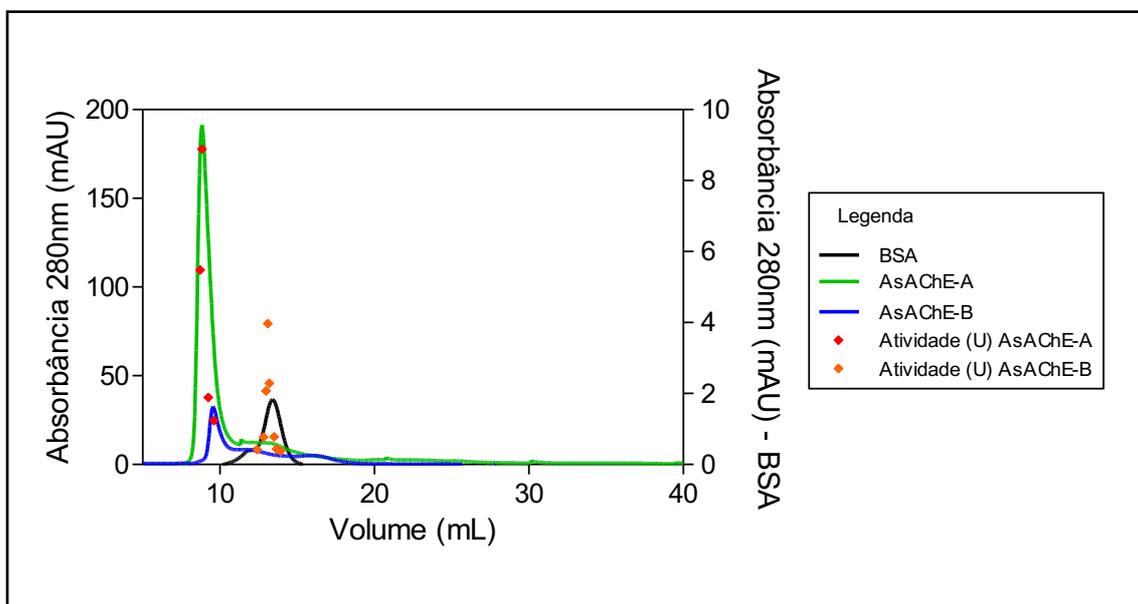


FIGURA 30.4 Cromatograma obtido da aplicação das amostras BSA, AsAChE-A e AsAChE-B na coluna de exclusão molecular Superose™ 12.

4.3.3.2 - Influência do pH e temperatura na atividade enzimática

Ambos pH e temperatura ótimos foram determinados em solução usando acetilticolina como substrato para as enzimas AsChE-A e AsChE-B. Para a AsAChE-A o valor de pH ótimo foi de 9,5 e para AsAChE-B foi de 9,0 (Figura 31.4). No geral as AChEs apresentam pH ótimo em torno de 7,0 e 8,0. As AChEs de *Liposcelis entomophila* purificadas e caracterizadas por XIAO e colaboradores (2010) apresentaram pH ótimo em torno de 7,0 enquanto que MOHAMED e colaboradores (2016) reportam valores de pH em torno de 8,5 para AChE de *Heterorhabditis bacteriophora*.

Verificou-se diferença significativa nos valores de temperatura ótima das enzimas (Figura 31.4); para a AsAChE-A foram observadas duas temperaturas ótimas (30 °C e 50 °C). Na literatura não está relatado AChE com duas temperaturas ótimas, talvez seja uma característica da AChE de *A. sexdens*. Já para AsAChE-B a temperatura ótima foi de 20 °C. Verifica-se na literatura que AChEs apresentam uma grande variedade de temperatura ótimas: AChE de *Liposcelis entomophila* (XIAO et

al., 2010), *Heterorhabditis bacteriophora* (MOHAMED et al., 2016) e *Cichla ocellaris* (SILVA et al., 2013) apresentaram temperaturas ótimas numa faixa de 35 a 45 °C.

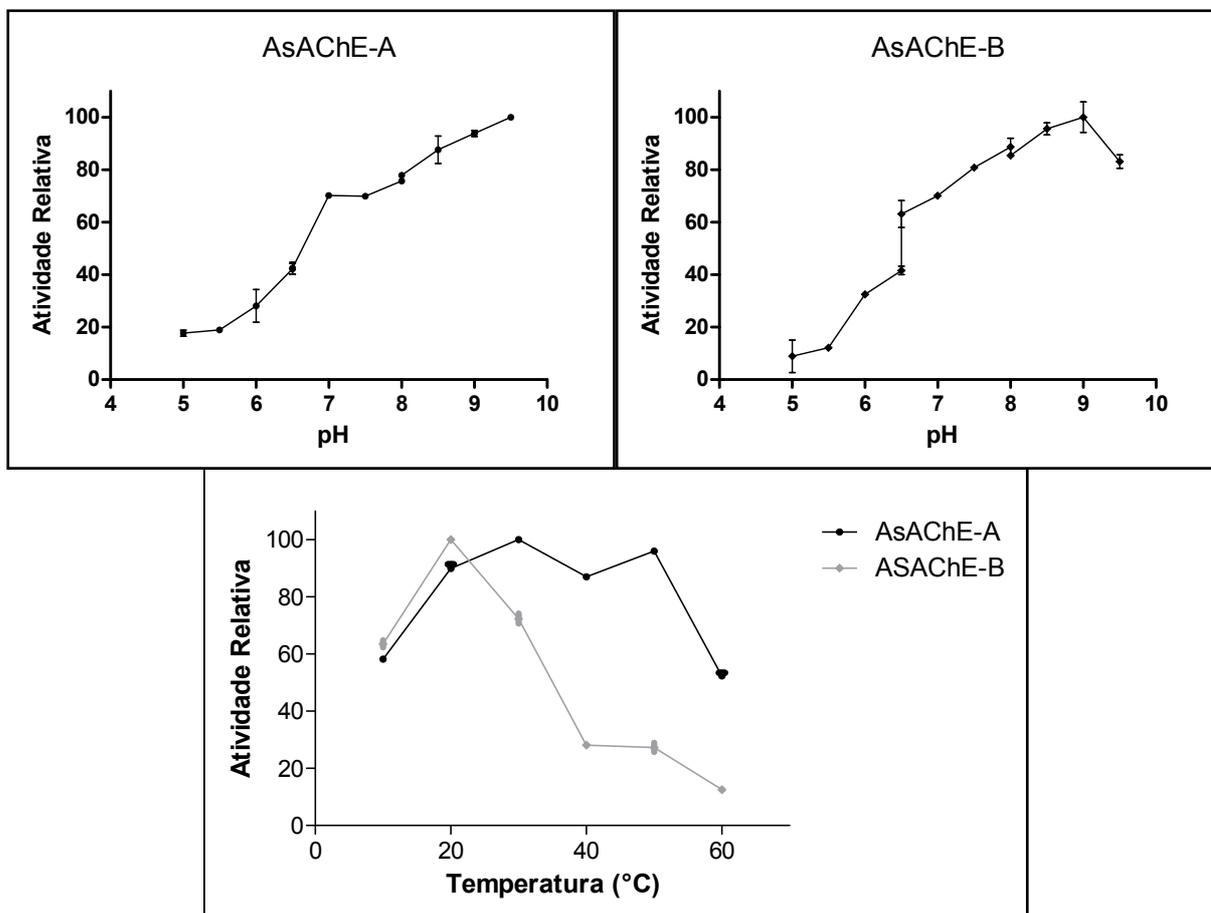


FIGURA 31.4. Curvas de atividade relativa em função do pH e da temperatura para as enzimas AsAChE-A e AsAChE-B.

4.3.3.3 - Determinação dos parâmetros cinéticos para AsAChE-A e AsAChE-B

Os parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados para as duas enzimas como descrito no subitem 3.3.9 utilizando para os ensaios acetiltiocolina como substrato. Os valores obtidos de concentrações de tiocolina foram relacionados às concentrações do substrato (acetiltiocolina) e o método de regressão não-linear de melhor ajuste pelo software GraphPad Prism foi utilizado para se obter as curvas de Michaelis-Menten (Figura 32.4). Por estes gráficos os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados (Tabela 10.4). Na Tabela 10.4 também foi

calculado o valor da eficiência catalítica ($V_{\text{máx}}/K_M$), que é um indicador da afinidade da enzima pelo substrato. Quanto maior o seu valor, mais intensa a afinidade.

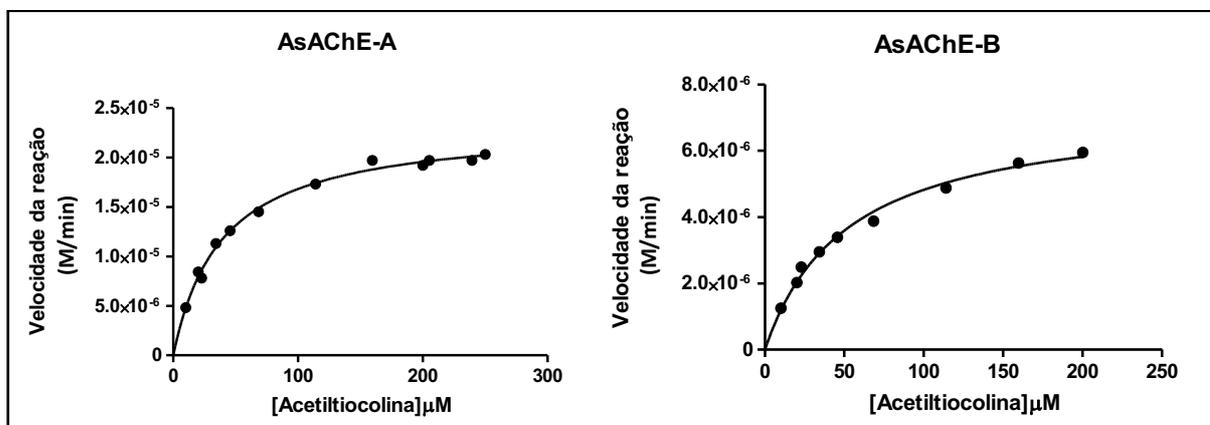


FIGURA 32.4 Gráficos obtidos pela equação de Michaelis-Menten pelo método de regressão não-linear de melhor ajuste pelo software GraphPad Prism para a produção de tiocolina pela AsAChE-A e AsAChE-B, variando-se a concentração de acetilcolina.

TABELA 10.4. Parâmetros cinéticos da AsAChE-A e AsAChE-B usando acetilcolina como substrato.

Parâmetros	AsAChE-A	AsAChE-B
K_M (μM)	$39,1 \pm 2,3$	$52,1 \pm 4,7$
$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$23,0 \pm 0,4$	$7,3 \pm 0,3$
$V_{\text{máx}}/K_M$	0,6	0,1

No que diz respeito a $V_{\text{máx}}$ a AsAChE-A apresentou valor de $V_{\text{máx}}$ três vezes maior que da AsAChE-B, bem como menor valor de K_M indicando maior afinidade pelo substrato (acetilcolina) do que a AsAChE-B - o valor da eficiência catalítica para AsAChE-A também é maior, mostrando que AsAChE-A possui maior atividade catalítica que AsAChE-B.

Na literatura os ensaios para a determinação da atividade catalítica, valores de K_M e eficiência catalítica ($V_{\text{máx}}/K_M$) entre AChE1 e AChE2 são feitos utilizando acetilcolina como substrato e baseando-se neles infere-se qual das diferentes AChEs é a principal enzima envolvida na hidrólise de acetilcolina nas sinapses (KIM et al., 2010; KIM et al., 2012; WANG et al., 2016). No caso do inseto praga *Cnaphalocrocis medinalis* os estudos cinéticos realizados por WANG e colaboradores (2016) demonstraram que a AChE1 é a principal enzima envolvida na

hidrólise de acetilcolina nas sinapses, neste estudo a atividade catalítica para AChE1 foi cerca de 2 vezes maior que para a AChE2 e os valores de K_M para AChE1 e AChE2 foram de respectivamente $39,81 \pm 6,49$ e $68,29 \pm 6,72$ mM indicando que a AChE1 possui maior afinidade pela acetiltiocolina do que a AChE2. Já o estudo cinético realizado por KIM e colaboradores (2010), também usando acetiltiocolina como substrato, demonstrou que a AChE2 de *Blattella germanica* (espécie de barata) é a principal enzima envolvida nas sinapses uma vez que esta apresentou uma eficiência catalítica de 3,9 vezes maior que a AChE1, além disso, a AChE2 deste estudo mostrou maior afinidade pela acetiltiocolina do que a AChE1. Assim, neste contexto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a AsAChE-A é a principal enzima envolvida nas sinapses, pois sua atividade catalítica é maior que para AsAChE-B, além de apresentar maior afinidade pelo substrato (acetiltiocolina).

4.3.3.4 - Análise das enzimas AsAChE-A e AsAChE-B por espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Com o intuito de identificar e caracterizar as AChEs isoladas de *A. sexdens*, as amostras AsAChE-A e AsAChE-B foram isoladas do gel de poliacrilamida nativo corado com comassie e enviadas para serem analisadas por LC-MS/MS. O procedimento desta análise está descrito nos trabalhos de IKE e colaboradores (2015), e ADALBERTO e colaboradores (2016). A análise realizada levou à identificação dos fragmentos mostrados na Tabela 11.4.

TABELA 11.4 Peptídeos identificados por LC-MS/MS da AsAChE-A e AsAChE-B.

Amostra	Técnica	Peptídeo	Número
AsAChE-A	NanoLC-MS/MS	FAYTGMPTVTETEWPSYTR	1
		GILQSGTLNAPWSYMTGEKANEVAR	2
		GILQSGTLNAPWSYmTGEKANEVAR	3
		NYSDFLGDEFFVR	4
		HYFGNEEIAEKTLK	5
		HYFGNEEIAEK	6
		SSNPVFPEHPK	7
		DQFISAVSELNPYVNQIGR	8
		SVDAWFGIPYAQKPVGPLR	9
AsAChE-B	NanoLC-MS/MS	DQFISAVSELNPYVNQIGR	10
		IVGDYQFTcNVNEFAGR	11
		YADTGHTVYMYYYK	12
		HLFNQAIMQSGSATAPWAIISRDESIVR	13
		GYTHEEIQLSKR	14
		LAEAVGcPHDR	15
		FAYTGMPTVTETEWPSYTR	16
		FAYTGmPTVTETEWPSYTR	17
		SLEYTDNERDLSLR	18
		TVLDREVHVfyGVpFAKPPVGPLR	19
		GILQSGTLNAPWSYMTGEK	20
		GILQSGTLNAPWSYMTGEKANEVAR	21
		GILQSGTLNAPWSYmTGEKANEVAR	22
		TTAcAFWNEFLPR	23
		YFIWNAEKK	24

Para a amostra AsAChE-A a busca no banco de dados de proteínas levou a identificação de 3 peptídeos (número 1, 2 e 3 da Tabela 11.4) presentes em AChE de *Atta colombica* (UniprotKB: A0A15115M4) confirmando que a amostra é uma acetilcolinesterase. Nesta análise a AsAChE-A também mostrou identidade com duas CEH (carboxylic ester hydrolase) de *Atta cephalotes* (Uniprot: A0A158NS84 e A0A158NQX6), a saber que todas as AChEs estão inseridas no clado das CEH (CHEN et al.,2016). Os peptídeos de número 4, 5, 6 e 7 (Tabela 11.4) foram identificados com CEH de código Uniprot: A0A158NQX6 e os peptídeos 8 e 9 com CEH de código Uniprot: A0A158NS84.

Para a amostra AsAChE-B os peptídeos de número 10, 11, 12, 13, 14 e 15 (Tabela 11.4) foram identificados com a AChE de *Acromyrmex echinator*

(GenBank EGI67049.1), os de número 16, 17 e 18 com a AChE de *Acromyrmex echinator* (GenBank EGI59491.1), os de número 19 e 20 com a AChE de *Acromyrmex echinator* (GenBank EGI59490.1) e por fim quatro peptídeos (21, 22, 23 e 24 - Tabela 11.4) foram identificados com a AChE de *Atta colombica* (UniprotKB: A0A151I5M4). Estas análises confirmam que a AsAChE-B também é uma acetilcolinesterase.

4.3.3.5 - Classificação das enzimas AsAChE-A e AsAChE-B

Os peptídeos identificados para AsAChE-A e AsAChE-B por LC-MS/MS foram utilizados na construção de árvores filogenéticas onde foram colocadas sequências de aminoácidos de AChE de insetos já classificados em AChE1 e AChE2.

Analisando a árvore filogenética construída com as sequências de peptídeos identificados para AsAChE-A (Figura 33.4) observa-se que as AChEs formaram dois clados distintos: AChE1 e AChE2. No meio dos dois clados está a sequência da CEH (*carboxylic ester hydrolase*) de *Atta cephalotes* indicando relação filogenética com ambos os clados. Os peptídeos numerados de 1 ao 9 (Tabela 11.4) foram identificados para AsAChE-A e foram distribuídos pela árvore. Três peptídeos (2, 3 e 7) apresentaram melhores relações filogenéticas com o clado de AChE1, o peptídeo 4 apresenta relação com ambos os clados e os demais peptídeos apresentam melhores relações filogenéticas com o clado AChE2. Como a maioria dos peptídeos identificados para AsAChE-A apresentaram melhores relações filogenéticas com o clado da AChE2, inferiu-se que a AsAChE-A é uma AChE2.

Na árvore filogenética construída com os peptídeos para AsAChE-B (Figura 34.4) observa-se que as AChEs novamente formaram dois clados distintos: AChE1 e AChE2. Novamente, no meio dos dois clados está a sequência da CEH (*carboxylic ester hydrolase*) de *Atta cephalotes* indicando relação filogenética com ambos os clados. Os peptídeos numerados de 10 a 24 foram identificados para AsAChE-B (Tabela 11.4) e foram distribuídos pela árvore. Dez peptídeos apresentaram melhores relações filogenéticas com o clado da AChE1 e os demais peptídeos (13, 16, 12, 24 e 17) apresentam melhores relações filogenéticas com o clado AChE2. Como a maioria dos

peptídeos identificados para AsChE-B apresentaram melhores relações filogenéticas com o clado AChE1, inferiu-se que a AsChE-B é uma AChE1.

Sendo classificadas a AsAChE-A em AChE2 e a AsAChE-B em AChE1 e considerando os resultados obtidos nos estudos cinéticos por meio do método de Ellman (ELLMAN et al., 1961), inferiu-se que em *A. sexdens* a AChE2 (AsAChE-A) é a principal enzima envolvida na hidrólise de acetilcolina nas sinapses. Tal fato confere com o estudo realizado por KIM e LEE (2013) onde todos os insetos participantes pertencentes a ordem *Hymenoptera* apresentaram a AChE2 como a principal enzima envolvida na sinapse. Embora não estejam totalmente claras as funções atribuídas a cada uma das AChEs, sabe-se que a AChE1 e AChE2 possuem funções fisiológicas distintas (REVUELTA et al., 2009). Estudos realizados em *T. castaneum* (besouro) por LU e colaboradores (2012a; 2012b) sugeriram que neste inseto a AChE1 é a enzima que hidrolisa com eficiência a acetilcolina enquanto a AChE2 mostrou ser pouco eficiente estando a mesma relacionada às funções não colinérgica, como o desenvolvimento embrionário, crescimento e reprodução. O mesmo foi observado para gafanhoto (BICKER et al., 2004). Um estudo realizado em *Helicoverpa armigera* (espécie de largata) por KUMAR e colaboradores (2009) demonstrou que o silenciamento dos genes resultou em mortalidade, aumento da inibição, diminuição da fecundidade e má formação de *H. armigera*. Neste contexto, futuros trabalhos utilizando as técnicas de RNA de interferência para AChE de *A. sexdens* poderão elucidar as funções colinérgica ou/e não colinérgica das AChE1 e AChE2.

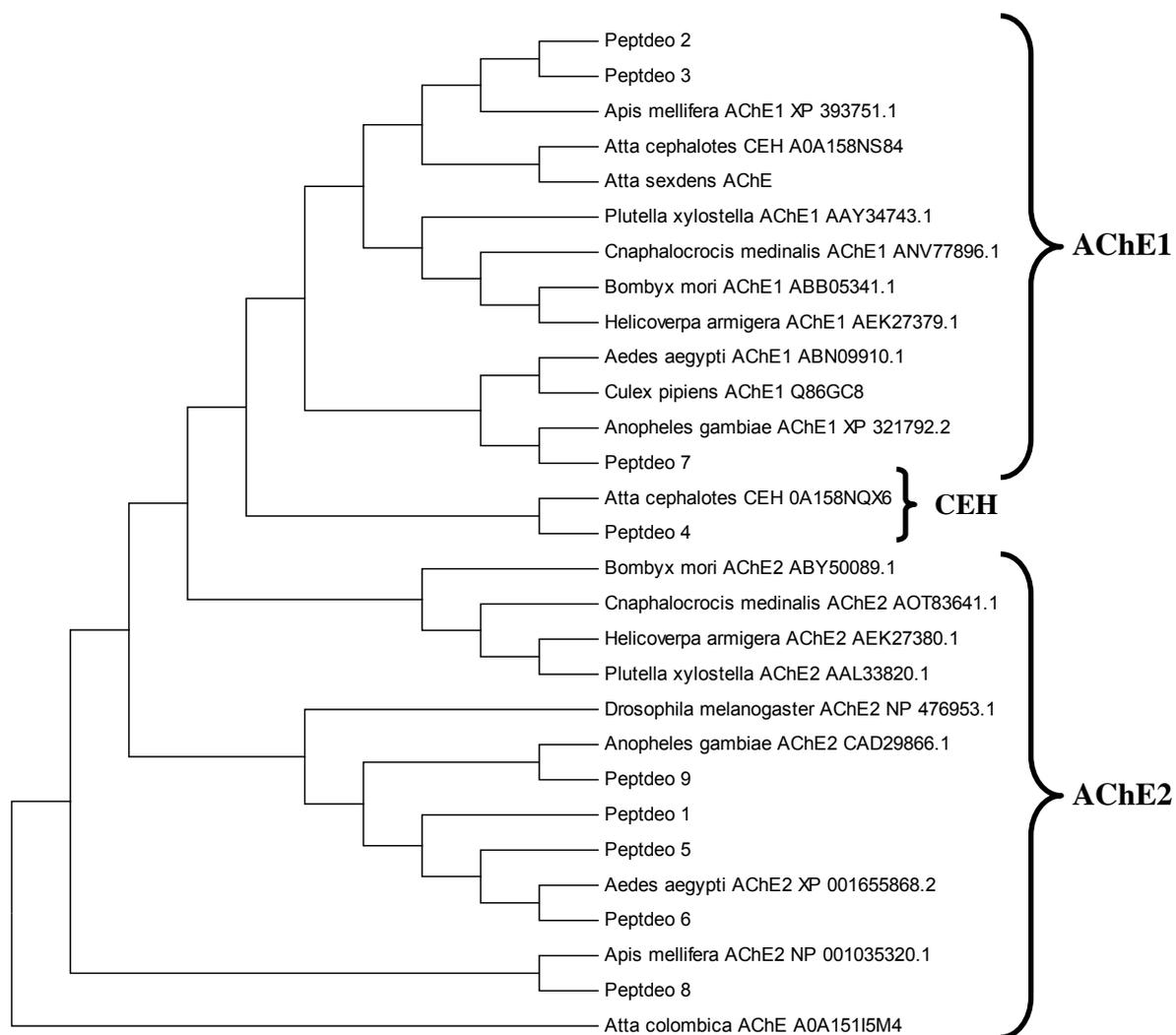


FIGURA 33.4. Árvore filogenética construída a partir de seqüências de AChE1, seqüências de AChE2 e os peptídeos identificados por LC-MS/MS para AsChE-A.

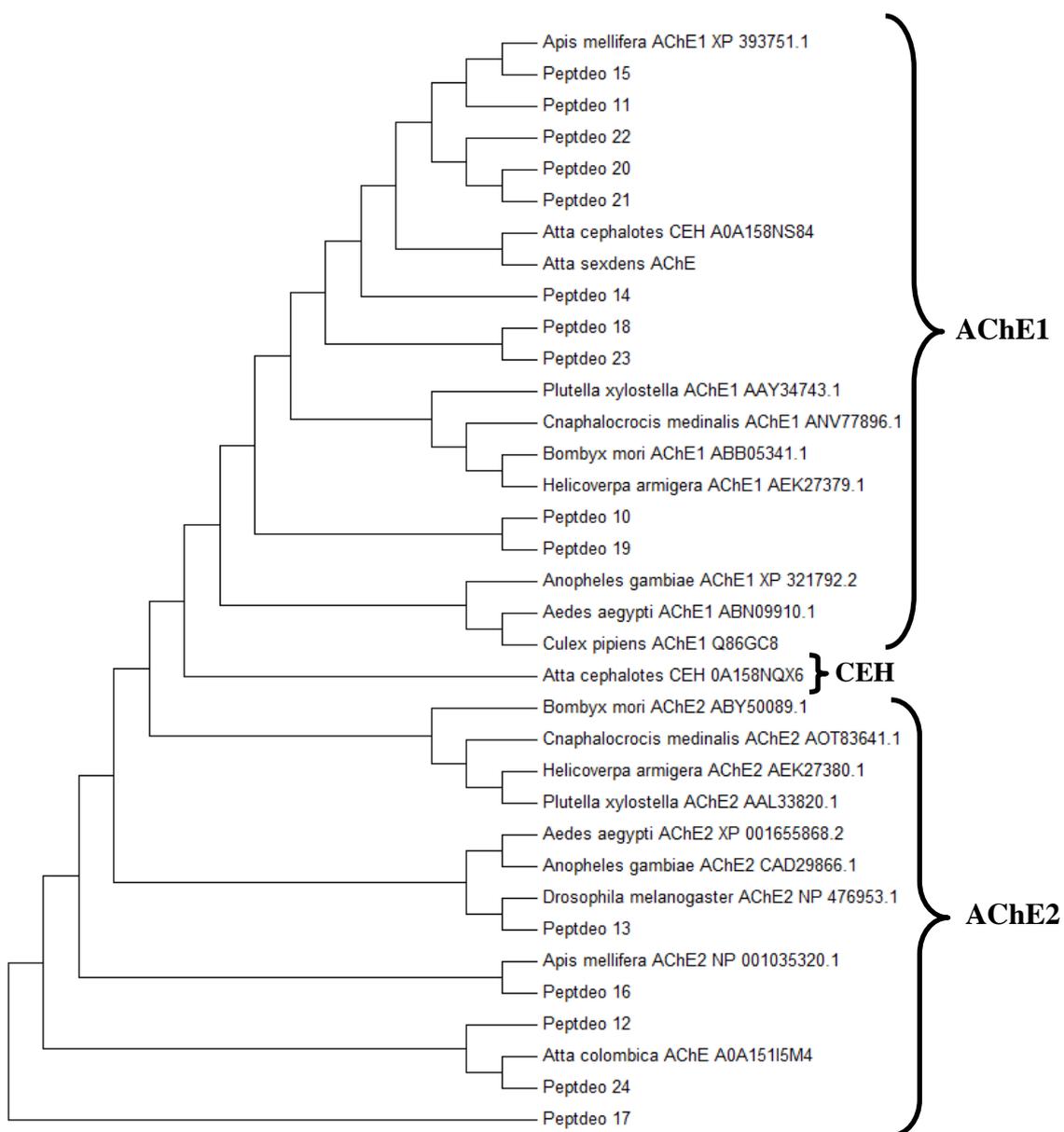


FIGURA 34.4. Árvore filogenética construída a partir de sequências de AChE1, sequências de AChE2 e os peptídeos identificados por LC-MS/MS para AsChE-B.

4.4 - Cromatografia de bioafinidade

A busca por novos inibidores da AChE para controle de pragas tem ganhado força nos últimos anos. Na literatura são encontrados os mais variados estudos com esta finalidade como a obtenção de cristais da enzima formando complexos com inibidores obtido por difração de raios X (HAREL et al., 2000), estudo de mutagênese sítio-dirigida (WANG et al., 2014; WANG et al., 2016), *docking* molecular (RENUGA et al., 2015; ZENG et al., 2017) e estudo de inibição usando o método de Ellman (ELLMAN et al., 1961; HOUNDÉTE et al., 2010; MOYO et al., 2010; WANG et al., 2016; HEMATPOOR et al., 2016).

No que diz respeito a imobilização da AChE encontram-se também biossensores que utilizam a AChE imobilizada com a finalidade de identificar pesticidas residuais (organofosforados e carbamatos) (YU et al., 2015; CUI et al. 2017) e os reatores de enzima imobilizada, IMERs (*Immobilized Enzyme Reactors*), que são uma alternativa econômica e atrativa aos métodos de ensaio convencionais para atividade enzimática (BERTUCCI et al., 2003) e na identificação de novos inibidores específicos (de MORAES et al., 2013; da SILVA et al., 2013; VANZOLINI et al., 2013; CALLERI et al., 2014). No entanto, ainda não há estudos reportados aplicando a cromatografia de bioafinidade com o objetivo de buscar por novos inibidores da AChE visando obter novos pesticidas. Este contexto, somado ao fato das enzimas em estudo (AsAChE-A e AsAChE-B) ainda não terem sido descritas na literatura e valendo-se da oportunidade de construir IMERs com ambas as enzimas, aproveitando-se assim todas as vantagens que o IMER oferece acrescido da possibilidade de desenvolver uma ferramenta útil na busca por inibidores da AChE de formiga, essas enzimas foram imobilizadas e os IMERs (IMER_AsAChE-A e IMER_AsAChE-B) caracterizados cineticamente

4.4.1 - Preparo dos IMERs-AChE

As enzimas foram imobilizadas em capilares de sílica fundida. A escolha por este tipo de suporte se deu primeiramente por já ter sido utilizada com sucesso pelo nosso grupo de pesquisa (VANZOLINI et al., 2013) na imobilização de AChE de *Electrophorus electricus*. Além disso, deve-se somar as vantagens que esse tipo de suporte apresenta, como diminuição de interações secundárias com os

compostos analisados e a presença de uma grande área superficial por volume que permite interações adequadas entre o substrato e a enzima imobilizada (CARDOSO et al., 2006). Outra vantagem está relacionada com a eluição da fase móvel por um capilar aberto onde a velocidade da reação enzimática total é maior do que, por exemplo, em colunas de suportes micro particulados que acabam criando resistência à transferência de massa (NAWROCKI, 1997; ZNALEZIONA et al., 2008).

O processo de imobilização pode ser resumido em três etapas. A primeira consiste na limpeza e ativação dos capilares por meio da eluição de uma solução de HCl (ácido clorídrico) que irá liberar os grupos silanóis, aumentando a área superficial para imobilização enzimática e aumento da reprodutibilidade do processo. Na segunda etapa uma solução de APTS (3-aminopropiltriétoxissilano) é eluída e o mesmo reage com os silanóis livre presentes na parede do capilar por substituição nucleofílica. Em seguida adiciona-se o espaçador (o glutaraldeído) que reage com o grupo amina formando bases de Schiff. A última etapa do processo é feita com a eluição de uma solução contendo a enzima (solução enzimática) que se liga ao capilar através da reação entre os grupos amina presentes nos resíduos dos aminoácidos lisina e o espaçador fixado na parede interna do suporte. Alguns trabalhos (RAJDEO et al., 2016; HILL et al., 2017) reportam a redução da base de Schiff, que são facilmente hidrolisadas em meio ácido, com borohidreto de sódio após a eluição da solução enzimática, no entanto os capilares foram usados com um pH de trabalho de valor 8,0 sendo a redução das bases de Schiff desnecessária.

Os IMERs imobilizados com as enzimas AsAChE-A e AsAChE-B foram feitos em duplicata.

4.4.2 - Qualificação do método LC-MS

A validação do método se deu por meio da avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, estabilidade, precisão e exatidão. Para tanto, monitorou-se duas transições (acetilcolina e colina) por SRM (o íon molecular, como íon precursor e o íon fragmento da segunda transição). O íon fragmento da segunda transição foi utilizado tanto para a quantificação como para a confirmação do analito.

A seletividade foi avaliada através da injeção de água no método validado, onde não foi observada a presença de interferentes co-eluído com a colina e assim prejudicando sua ionização.

As curvas de calibração foram logarítmicas na faixa de concentração estudada, com coeficientes de determinação (R^2) iguais ou superiores a 0,99 para uma amostragem igual a 3. As curvas analíticas obtidas foram:

$$\text{- curva baixa: } y = -4,56743 \times 10^5 + 1,32678 \times 10^5 \times \ln(x + 32,553)$$

$$\text{- curva alta: } y = -2,58972 \times 10^6 + 4,64136 \times 10^5 \times \ln(x + 77,971)$$

O CV% para as replicatas foi inferior a 15 % e a exatidão apresentou um desvio menor do que 15 % do valor nominal (exceto para o limite de quantificação - primeiro ponto das curvas), indicando que não ocorreu *carry over* entre as injeções. Valores de precisão entre 85 e 112 % para a curva baixa e entre 84 e 111 % para a curva alta indicam que ambas estão de acordo com os critérios para validação de método adotado.

A precisão e exatidão intra e inter-lotes do método foi determinada analisando-se cinco replicatas dos três controles de qualidade. Os resultados foram valores de precisão entre 1,1 e 13,7% para a curva baixa e 1,2 e 2,0% para a curva alta. A exatidão variou entre 86,1 e 95,4% para a curva alta e 89,3 e 100% para a curva baixa, que estão de acordo com os critérios para validação de método adotado.

A possibilidade de hidrólise espontânea do substrato acetilcolina (ACh) foi verificada através da estabilidade da amostra em auto-injetor de acordo com o procedimento descrito na seção 3.3.12 onde, uma amostra de ACh 60 μM foi injetada, analisada imediatamente (tempo zero) e a cada 10 minutos por um período de 360 minutos. Não foi observado o íon $[\text{M-H}]^+$ 60 m/z, correspondente a Ch e, o íon $[\text{M-H}]^+$ 87 m/z relativo a ACh se manteve estável com um efeito residual (*carry-over*) igual a 0,1% (n=5) correspondente às áreas das bandas cromatográficas.

O método validado foi aplicado injetando-se uma amostra de acetilcolina (85,5 μM) no IMER- AsAChE-A. O cromatograma do íon extraído com o respectivo espectro de massas para a colina e seu íon fragmento encontram-se na Figura 35.4

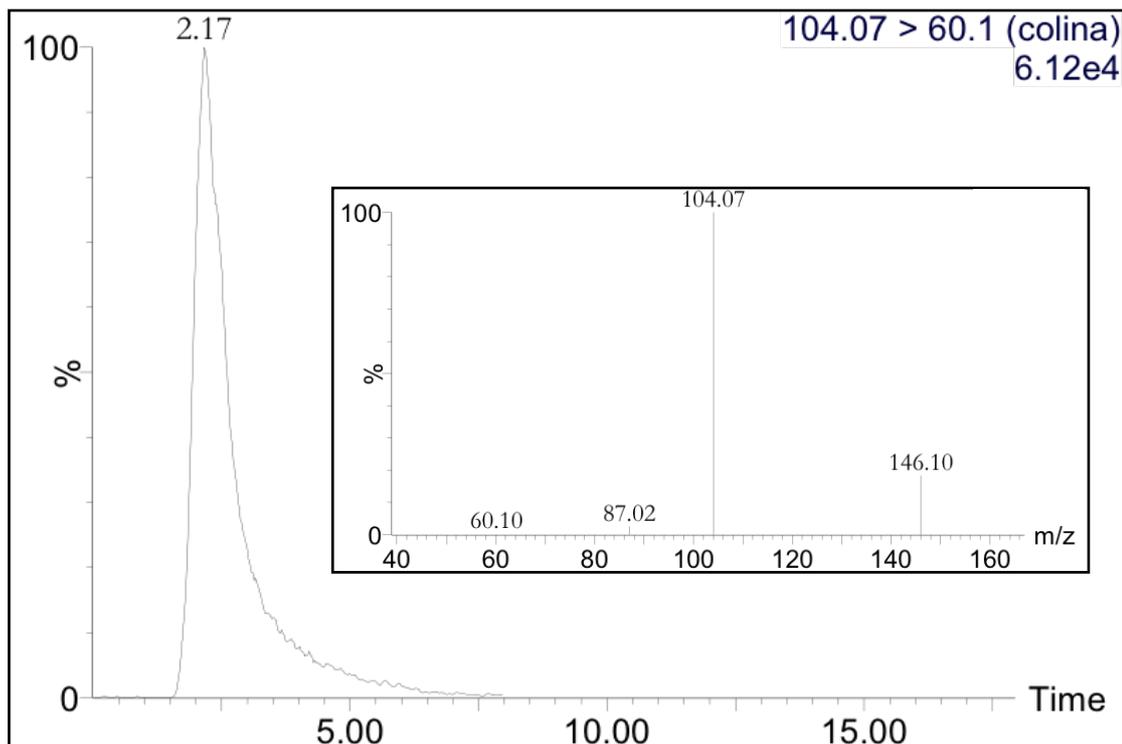


FIGURA 35.4 Cromatograma do íon extraído e espectro de massas referente a injeção de ACh 85,5 μ M no sistema LC-MS com o IMER- AsAChE-A monitorando o íon fragmento da colina produzida. Parâmetros do LC-MS descritos na seção 3.2.11.

4.4.3 - Atividade dos IMERs preparados.

A atividade das enzimas imobilizadas foi avaliada por meio da quantificação direta da colina usando o IMER acoplado ao espectrômetro de massas. As condições do método utilizado foram as mesmas desenvolvida e utilizadas por VANZOLINI e colaboradores (2013) com algumas variações (descritas no subitem 3.3.11). Estas variações foram necessárias uma vez que neste trabalho foi utilizado um analisador de massas triplo quadrupolo. Este por sua vez por apresentar elevada seletividade e sensibilidade permitiu, no início dos estudos de imobilização, verificar a presença de problemas de *carry-over* e hidrólise espontânea da acetilcolina. Aumentando o número de lavagens do auto-injetor e regularmente injetando tampão de trabalho entre as triagens o problema de *carry-over* foi sanado. Para a hidrólise espontânea optou-se por preparar as amostras de trabalho em tampão com pH 5.0 (seção 4.3.4.2).

Para o ensaio de atividade foi utilizada uma solução de acetilcolina na concentração de 85,5 μ M que foi injetada no sistema LC-MS e a colina produzida foi monitorada e correlacionada com a curva de calibração. Como demonstrado na

Tabela 12.4, todos os IMERs estão ativos e apresentaram reprodutividade. Além disso, os IMERs imobilizados com a enzima AsAChE-B apresentaram maior atividade quando comparados com os IMERs imobilizados com AsAChE-A.

TABELA 12.4 Concentração de colina (Ch) produzida pelos IMERs após a imobilização a partir da injeção de 85,5 μ M de acetilcolina no sistema LC-MS.

IMERs	[Ch] _{produzida} μ M
AsAChE-A_Capilar1	14,9
AsAChE-A_Capilar2	13,3
AsAChE-B_Capilar1	51,4
AsAChE-B_Capilar2	77,0

Visto que quando imobilizada a AsAChE-B apresentava maior atividade do que a AsAChE-A utilizando acetilcolina como substrato, enquanto que com o uso de acetiltiocolina pelo método de Ellman a AsAChE-A apresentava maior atividade do que a AsAChE-B, realizou-se um ensaio de atividade em solução usando acetilcolina como substrato e a colina produzida foi quantificada diretamente pelo sistema LC-MS (seção 3.3.14) com a finalidade de averiguar se essa diferença se devia ao uso de diferentes substratos ou a imobilização. Na Figura 36.4 está representado o gráfico dos resultados obtidos. Nele está claro que a AsAChE-B apresenta maior atividade usando acetilcolina como substrato do que a AsAChE-A indicando que essa inversão de atividade não deve à imobilização.

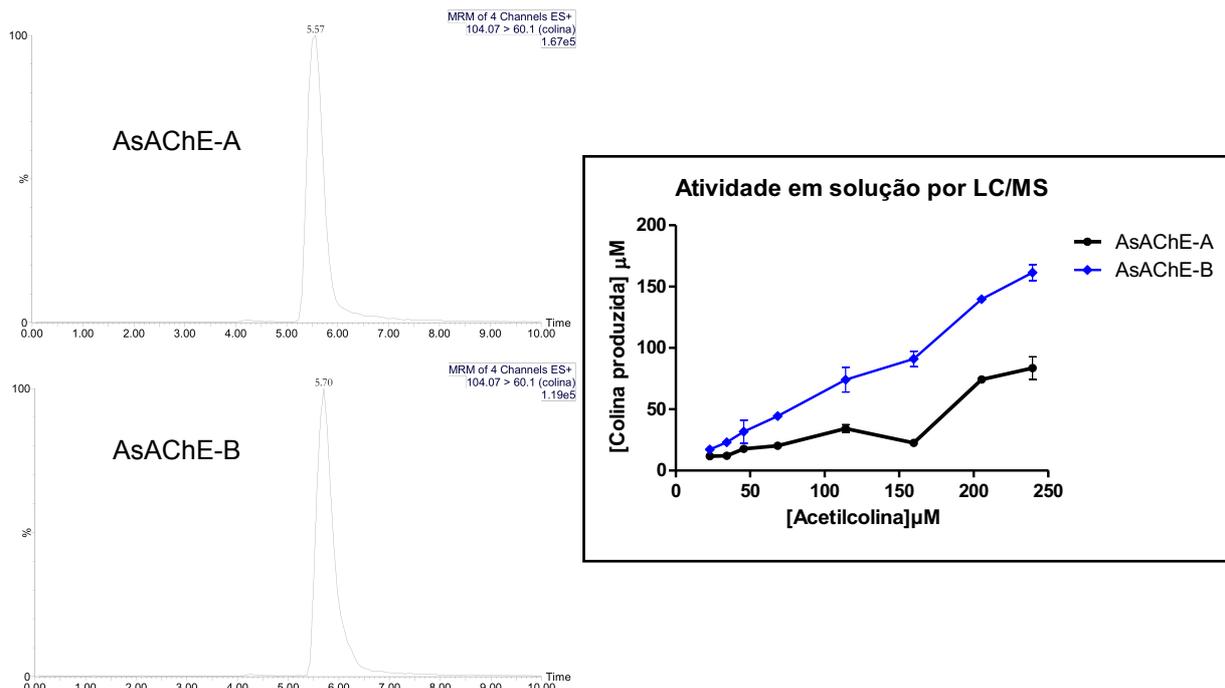


FIGURA 36.4 Gráfico referente aos resultados obtidos do ensaio de atividade utilizando acetilcolina como substrato sendo a colina produzida na hidrólise quantificada diretamente pelo sistema LC-MS. A esquerda está representado os cromatogramas do íon extraído referente ao ensaio de atividade em solução para ambas as enzimas (AsAChE-A e AsAChE-B) utilizando acetilcolina (68,4 µM) como substrato. Parâmetros do LC-MS descritos na seção 3.3.14.

4.4.4 - Estudos cinéticos dos IMERs preparados.

É importante realizar os estudos cinéticos da enzima imobilizada para verificar possíveis modificações estruturais na enzima que pode ocorrer durante o processo de imobilização. Tais modificações são advindas de ligações covalentes formadas entre enzima e suporte que podem levar a distorção e até mesmo a inacessibilidade do sítio ativo da enzima (CARDOSO et al., 2009). Assim, torna-se necessário verificar a afinidade de ligação entre a enzima e o substrato bem como a eficiência catalítica do IMER. Para estes estudos foram escolhidos os IMERs AsAChE-A _Capilar1 e AsAChE-B _capilar2 por apresentarem maior atividade (Tabela 12.4).

O K_M , que é a concentração do substrato onde se obtém uma velocidade inicial igual à metade da velocidade máxima de catálise, foi determinado para o substrato (acetilcolina) medindo-se a atividade enzimática. Para a obtenção do K_M foram utilizadas concentrações crescentes do substrato até que fosse atingido um patamar de saturação onde o aumento na concentração de acetilcolina não

alterasse a velocidade da reação. As áreas das bandas de colina produzida durante o estudo cinético foram correlacionadas às concentrações através das curvas de calibração. Os valores obtidos de concentrações de colina foram relacionados às concentrações do substrato e o método de regressão não-linear de melhor ajuste pelo software GraphPad Prism foi utilizado para se obter as curvas de Michaelis-Menten (Figura 37.4) e por estes gráficos os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados (Tabela 13.4).

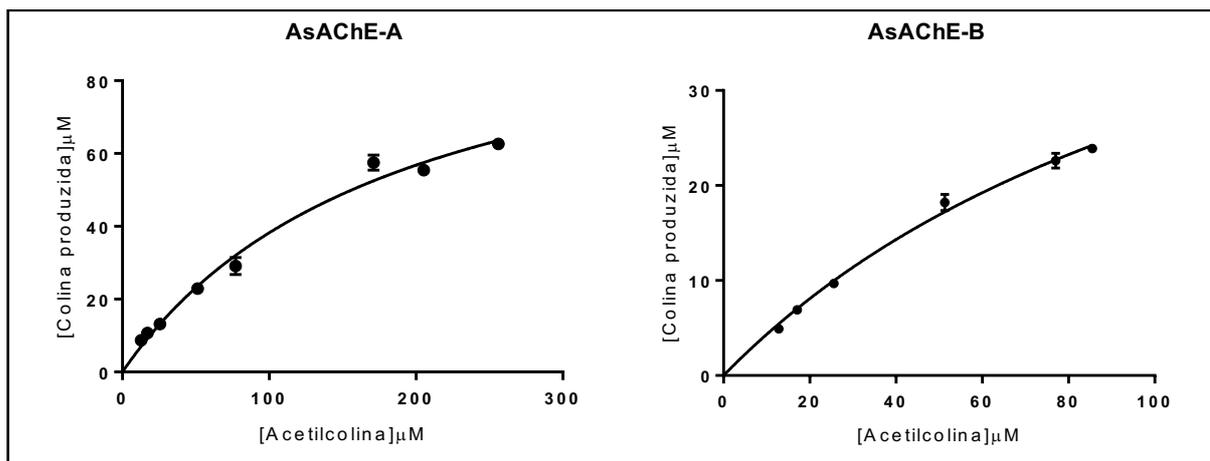


FIGURA 37.4 Gráficos obtidos pela equação de Michaelis-Menten pelo método de regressão não-linear de melhor ajuste pelo software GraphPad Prism para a produção de colina pelo AsAChE-A_IMER e AsAChE-B_IMER, variando-se a concentração de acetilcolina.

TABELA 13.4 Parâmetros cinéticos, usando acetilcolina como substrato, da AsAChE-A e AsAChE-B imobilizadas.

Parâmetros	AsAChE-A	AsAChE-B
K_M (μM)	$188,9 \pm 40,0$	$133,2 \pm 24,7$
$V_{m\acute{a}x}$ (μM)	$110,5 \pm 12,4$	$62,0 \pm 7,7$
$V_{m\acute{a}x}/K_M$	0,6	0,5

A atividade catalítica da AsAChE-A imobilizada apresentou valor de $V_{m\acute{a}x}$ 1,8 vezes maior que o da AsAChE-B, no entanto apresentou um valor de K_M maior indicando menor afinidade pelo substrato (acetilcolina) do que a AsAChE-B. O valor da eficiência catalítica para AsAChE-A também é maior, mostrando por esses resultados que AsAChE-A possui maior atividade catalítica que AsAChE-B.

Quando comparam-se os resultados cinéticos da Tabela 10.4 com os obtidos na Tabela 13.4, não com o intuito de comparar diferenças nos valores, pois isso não se deve fazer assim como mencionado por BISSWANGER (2014): "...the

enzyme activity depends decisively on defined conditions with respect to temperature, pH, nature and strength of ions and enzyme assays can reliably only be compared, if such conditions are strictly regarded". Mas com o intuito de chamar a atenção para a diferença observada no comportamento das enzimas frente aos substratos utilizados. A AsAChE-A demonstrou maior afinidade pelo substrato acetiltiocolina enquanto que a AsAChE-B imobilizada demonstrou maior afinidade pelo substrato natural (acetilcolina) bem como maior atividade tanto imobilizada quanto em solução pelo sistema LC-MS. Apesar de se fazer necessário para uma melhor discussão/comparação um estudo cinético por LC-MS com ensaio em solução utilizando acetilcolina como substrato - este método foi utilizado para comparar as atividades das enzimas (Figura 36.4), mas ainda precisa ser validado e as concentrações de enzimas e substrato (acetilcolina) precisam ser melhor ajustadas para a obtenção dos parâmetros cinéticos - os resultados obtidos por LC-MS sugerem que a AsAChE-B é a principal enzima envolvida na hidrólise de acetilcolina nas sinapses. Tal sugestão é conflitante com a já realizada neste trabalho (seção 4.3.3.5) e como já discutido na seção (4.3.3.3) é habitual utilizar-se dos resultados obtidos nos parâmetros cinéticos, a partir de ensaios enzimáticos com acetiltiocolina, para dizer qual enzima é a principal envolvida na hidrólise de acetilcolina nas sinapses. Tais resultados despertam a importância de utilizar o substrato natural da enzima em ensaios de atividade.

4.4.5 - Triagem de ligantes com o IMER_AsAChE-A e AsAChE-B

Uma vez que os estudos cinéticos realizados para as enzimas imobilizadas demonstram que a atividade enzimática e a habilidade das mesmas em reconhecer o substrato (acetilcolina) permanecem inalteradas, deu-se início ao estudo de triagem.

Para validar os ensaios de triagem realizados para ambos os IMERs de AChE de *A. sexdens*, adotou-se o IMER de AChE de *Electrophorus electricus* por ser um modelo já estabelecido para triagem de compostos (da SILVA et al., 2013; VANZOLINI et al., 2013).

Na literatura o método de Ellman (ELLMAN et al., 1961) é o mais amplamente utilizado para verificação da atividade inibitória para AChE (HOUNDÉTE et al., 2010; MOYO et al., 2010; WANG et al. 2016), mesmo para a

enzima imobilizada (GABROVSKA et al., 2008; GÖKHAN et al., 2015; CUI et al. 2017). No entanto estudos realizados (RHEE et al., 2003 e DI GIOVANNI et al., 2008) demonstraram a possibilidade dos ensaios colorimétricos, como o de Ellman, apresentarem falsos positivos. Assim, diferente do que se encontra na literatura, a triagem neste trabalho foi realizada utilizando o método desenvolvido por VANZOLINI e colaboradores (2013), que utiliza para a verificação da atividade inibitória a acetilcolina, que é o substrato natural da AChE e a quantificação da colina produzida após catálise enzimática é quantificada por espectrometria de massas (MS).

Inicialmente avaliou-se a atividade inibitória com tacrina e galantamina frente as AChEs AsAChE-A e AsAChE-B bem como para AChE de *Electrophorus electricus*. Tacrina e galantamina são considerados inibidores padrões da AChE humana e foram adotados como inibidores padrões neste trabalho por conferirem ao IMER a capacidade de distinguir entre diferentes mecanismos de inibição e afinidade que eles possuem pela AChE.

Como resultado a galantamina apresentou um percentual de inibição em torno de 72 % para a AChE de *E. electricus* enquanto que para AsAChE-A foi de 5,7 % e para a AsAChE-B foi de 3 % (Gráfico 1.4). Já a tacrina apresentou um percentual de inibição em torno de 100 % para a AChE de *E. electricus* enquanto que para AsAChE-A foi de 20 % e para a AsAChE-B foi de 16 % (Gráfico 1.4). Acreditava-se que os inibidores padrões teriam uma atividade inibitória mais expressiva nas enzimas de formiga, mas o resultado foi surpreendente, tal percentual foi relativamente baixo quando comparado com o obtido com a AChE de peixe. Estes resultados demonstram que o uso da AChE de *E. electricus* como modelo para busca de novos inibidores de AChE de insetos não é viável. Na literatura encontra-se estudos utilizando AChE de *E. electricus* na busca por inibidores de AChE de insetos. Um exemplo é o estudo realizado por YE e colaboradores (2015) onde a AChE de *E. electricus* foi imobilizada e usada na triagem de compostos oriundo de *Magnolia officinalis* (árvore originária da China). Após a triagem, dois compostos (*magnolol* e *honokiol*) foram identificados como inibidores da AChE, no caso para a AChE de peixe. Em seguida os compostos ativos foram testados *in vivo* em *Nilaparvata lugens* (inseto praga conhecido como cigarrinha marrom do arroz). O estudo foi bem sucedido, mas visto que inibidores para a AChE de *E. electricus* não demonstraram serem ativos para as AChEs de *A. sexdens* faz com que o método

proposto por YE e colaboradores (2014) não seja completamente adequado para a busca de inibidores de AChE de insetos como eles propõem.

Quando os percentuais de inibição entre as enzimas de formigas são comparados, percebe-se diferença. Os padrões apresentam maior atividade inibitória frente a enzima AsAChE-A do que para AsAChE-B. Esse resultado demonstra a seletividade de cada um dos IMERs e confirma uma vez mais que duas diferentes e inéditas AChEs da formiga *A. sexdens* inéditas foram obtidas e imobilizadas com sucesso.

Em seguida os IMERs produzidos foram aplicados na triagem de algumas hidantoínas (n = 12) (ANEXO I), que foram cedidas pelo grupo da Prof. Dra. Arlene G. Corrêa. A hidantoína (Figura 38.4) foi descrita em 1961 por Baeyer e desde então ela tem sido estudada.

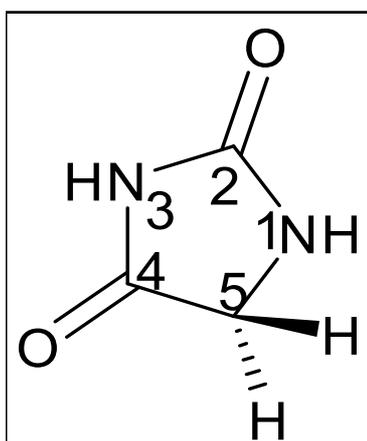
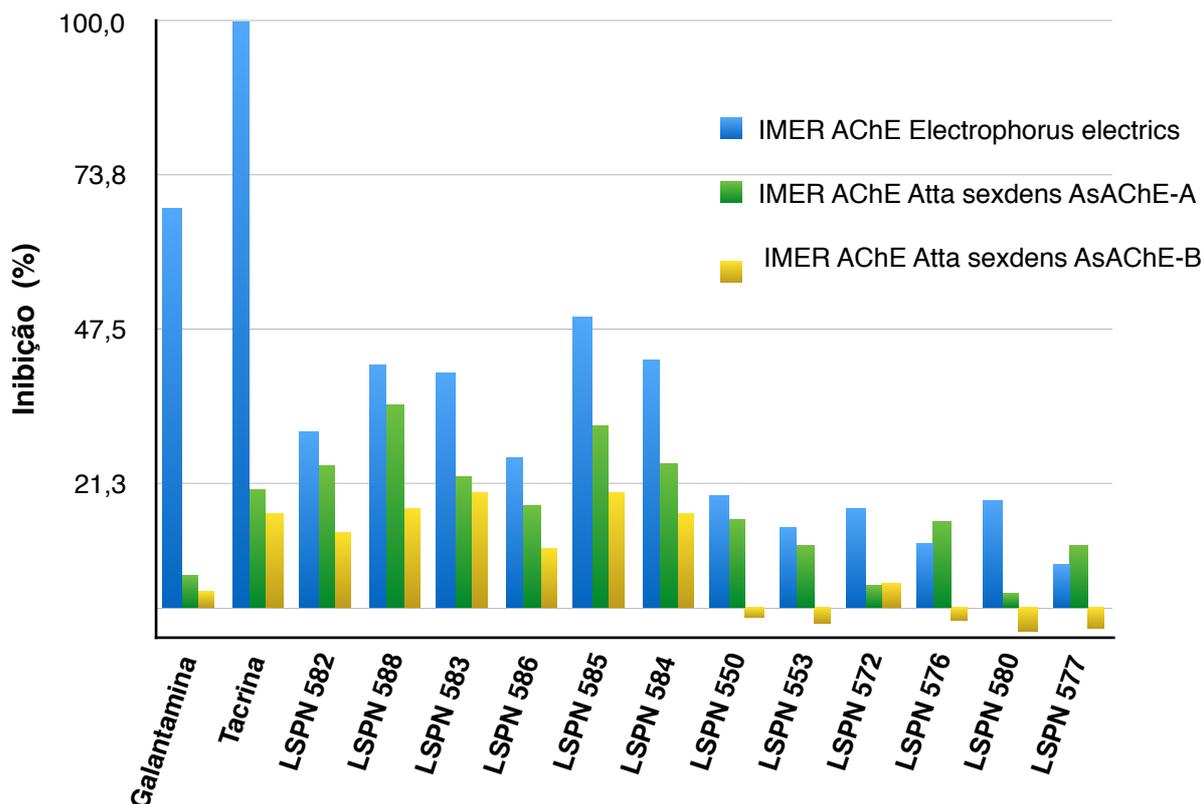


FIGURA 38.4 Estrutura geral da hidantoína

Analisando o Gráfico 1.4 observa-se que os IMERs se comportaram de maneira distinta frente aos compostos triados. Sem dúvidas a atividade inibitória das hidantoínas para com a AChE de *E. electricus* (barra em azul) foi maior do que para as AChEs de *A. sexdens*. Na literatura são encontrados estudos sobre a relação entre hidantoínas e o tratamento de doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (HAMILTON & CATONVILLE, 2002; CHEOL et al., 2012), e outros (NADRI et al., 2010; BOHN et al., 2015) relatando um potencial inibitório das hidantoínas para a AChE humana. Como a AChE de *E. electricus* se assemelha à AChE humana (identidade sequencial de aminoácidos de 84 %), sendo inclusive muito empregada como modelo em ensaios, justifica-se o fato das hidantoínas triadas apresentarem atividade inibitória maior para a AChE de *E. electricus* do que para as da formiga.

GRÁFICO 1.4 COLEÇÃO DE HIDANTOÍNAS



Além disso, observa-se (Gráfico 1.4) diferenças expressivas na atividade inibitória entre as enzimas de formigas (AsAChE-A barra em verde e AsAChE-B em amarelo). A única exceção foi para o composto LSPN 572 cuja a atividade inibitória foi igual para as duas enzimas. Os compostos LSPN 550, LSPN 553, LSPN 576, LSPN 580 e LSPN 577 inibiram a AsAChE-A, mas os mesmos mostraram ser ativadores da AsAChE-B por resultarem em um percentual de inibição negativa. É possível que estes compostos tenham se ligado à algum sítio da enzima AsAChE-B levando a alteração na conformação da mesma de modo a facilitar a ligação do substrato (acetilcolina) resultando no aumento da atividade observado.

Dos compostos triados o que apresentou maior atividade inibitória para a AsAChE-A foi o LSPN 588 enquanto que para a AsAChE-B os compostos LSPN 583 e LSPN 585 foram os que resultaram num percentual de inibição maior.

Os resultados obtidos levanta uma questão: qual das AChEs deverá ser utilizado como alvo na busca por novos inseticidas? Visto que elas se

comportam de maneira tão distintas é preciso levar essas diferenças observadas em consideração. Neste contexto, a obtenção dos diferentes IMERs para as AChEs de formigas é uma excelente ferramenta na busca por novos inibidores. Assim, os IMERs poderão ser utilizados frente a outros inibidores naturais ou sintéticos.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

O trabalho de tese foi desenvolvido com duas abordagens: o estudo com a AChE de *A. sexdens* nativa e com a enzima recombinante.

No que diz respeito ao estudo com a enzima recombinante, um clone positivo foi analisado por sequenciamento e a sequência da AChE de *A. sexdens* foi obtida. Estudos *in silico* foram feitos com a sequência obtida e por meio da filogenia molecular, esta foi classificada como uma AChE1. Além disso, valendo-se da sequência e da técnica de modelagem por homologia, o modelo tridimensional foi construído e validado. A determinação estrutural de uma enzima é uma ferramenta fundamental para conhecimento de sua forma de atuação frente ao substrato ou mesmo inibidores, levando em conta que a obtenção da estrutura 3D por meio de técnicas de cristalização é algo difícil de se obter por exigir uma grande quantidade de amostra com alto grau de pureza. Assim, o uso das técnicas de modelagem molecular é uma excelente ferramenta no estudo de enzima como a AChE de formiga que ainda não possui estrutura tridimensional resolvida.

O estudo com a enzima nativa levou a purificação de duas AChEs inéditas de *A. sexdens* (AsAChE-A e AsAChE-B) que foram identificadas por espectrometria de massas; classificadas em AChE1 (AsAChE-B) e AChE2 (AsAChE-A) por meio da filogenia molecular, e caracterizadas bioquimicamente e cineticamente. Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho sugeriram que a AsAChE-A é a principal enzima envolvida nas sinapses, uma vez que sua atividade catalítica foi maior do que para a AsAChE-B usando acetilcolina como substrato.

Ambas as enzimas foram imobilizadas com sucesso em capilares de sílica fundida (IMER) e após a caracterização cinética dos mesmos, percebeu-se que a AsAChE-B apresentava maior atividade catalítica do que a AsAChE-A usando acetilcolina - que é o substrato natural da AChE. Assim, no tocante aos parâmetros cinéticos verificou-se diferenças significativas quando o substrato natural (acetilcolina) é substituído por acetiltiocolina levando a interpretações conflitantes. Isso mostra a importância de utilizar-se do substrato natural (acetilcolina) nos ensaios de atividades.

Os IMERs obtidos foram utilizados na triagem empregando inibidores de referência e uma coleção de hidantoínas. Chamou a atenção o fato de nenhum dos inibidores de referência apresentarem expressiva atividade inibitória frente as

AChEs de formigas (menor que 20% de inibição), enquanto que para a AChE de *E. electricus* a porcentagem de inibição foi de 72% para galantamina e 100% para tacrina. Demonstrando, assim, que o uso da AChE de peixe não é um modelo viável na busca por novos inseticidas. Dessa forma uma nova ferramenta para a busca de inibidores para AChE de formiga foi desenvolvida com sucesso.

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADALBERTO P.R. ; GOLFETO C.C. ; MOREIRA A. C. ; ALMEIDA F. G. ; FERREIRA D.; CASS Q. B. ; SOUZA, D. H. F. Characterization of an Exopolygalacturonase from *Leucoagaricus gongylophorus*, the Symbiotic Fungus of *Atta sexdens*. *Advances in Enzyme Research*. 2016; 4: 7-19.
- ANJOS, N.; MOREIRA, D. D.; DELLA LUCIA, T. M. C. Manejo integrado de formigas em reflorestamentos. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). *As formigas cortadeiras*. Viçosa, 1993; p. 212 - 241.
- ANTUNES, E. C.; DELLA LUCIA, T. M. C. Consumo foliar em *Eucalyptus urophylla* por *Acromyrmex laticeps nicrosetosus* Forel (Hymenoptera – Formicidae). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras. 1999; 23: 208 - 211.
- ARAÚJO, M. da S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. Estratégias alternativas de controle de formigas cortadeiras. *Bahia Agrícola*, Salvador. 2003; 6: 71-74.
- ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, SCHWEDE T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*. 2006; 22 (2): 195–201.
- ASSIS, C. R. D; CASTRO, P. F.; AMARAL, I. P. G.; CARVALHO, E. V. M. M.; CARVALHO JR, L. B. & BEZERRA, R. S. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2010; 29 (10): 2243–2248.
- Badiou A., Brunet J.L.; Belzunces L.P. Existence of two membrane-bound acetylcholinesterases in the honey bee head. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 2007; 66: 122-134.
- BELZUNCES, L.P. TOUTANT, J.P. & BOUNIAS, M. Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterized by Triton X-114 phase separation. *Biochem. J*. 1988; 255: 463-470.
- BERTI FILHO, E.; MARCHINI, L. C & NAKANO, O. “Curso de Entomologia Aplicada à Agricultura”. IN: *Formigas Cortadeiras e Cupins*. Piracicaba, FEALQ, 1992. p. 631-671.
- BERTUCCI C.; BARTOLINI M.; GOTTI R.; ANDRISANO V. Drug affinity to immobilized target bio-polymers by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*. 2003; 797 (1-2):111-29.
- BICKER G.; NAUJOCK, M.; HAASE A. Cellular expression patterns of acetylcholinesterase activity during grasshopper development. *Cell Tissue Res*. 2004; 317, 207–220.

BISSWANGER H. Enzyme assays. A review. *Perspectives in Science*. 2014; 1: 41–55.

BOARETTO, M.A.C. & FORTI, L.C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. *Série Técnica IPEF*. 1997; 11 (30): 31-46.

BOHN, P.; GOURAND, F.; PAPAMICAËL, C.; IBAZIZÈNE, M.; DHILLY, M.; GEMBUS, V.; ALIX, F.; TÎNTAS, M.; MARSAIS, F.; BARRÉ, L.; LEVACHER, V. "Dihydroquinoline Carbamate derivatives as "Bio-oxidizable" prodrugs for brain delivery of acetylcholinesterase inhibitors: [¹¹C] Radiosynthesis and Biological Evaluation." *ACS Chem. Neurosci*. 2015; 6: 737.

BOURNE, Y; TAYLOR, P & MARCHOT, P. Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: Crystal structure of the complex. *Cell*. 1995; 83: 503–512.

BOURNE, Y.; TAYLOR, P.; BOUGIS, P. E. & MARCHOT, P. Crystal structure of mouse acetylcholinesterase. A peripheral site-occluding loop in a tetrameric assembly. *J Biol Chem*. 1999; 274: 2963–2970.

BRADFORD, M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72(1-2): 248-254.

CANTARELLI, E. B.; COSTA, E. C.; PEZZUTTI, R.; OLIVEIRA, L. S. Quantificação das perdas no desenvolvimento de *Pinus taeda* após o ataque de formigas-cortadeiras. *Ciência Florestal, Santa Maria*. 2008;18 (1): 39 - 45.

CALLERI E; UBIALI D; SERRA I; TEMPORI C; CATTANEO G; SPERANZA G; MORELLI CF; MASSOLINI G. Immobilized purine nucleoside phosphorylase from *Aeromonas hydrophila* as an on-line enzyme reactor for biocatalytic applications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014; 968: 79-86.

CARDOSO C.L.; LIMA V.V.; ZOTTIS A.; OLIVA G.; ANDRICOPULO A.D.; WAINER I.W.; MOADDEL R.; CASS Q.B. Development and characterization of an immobilized enzyme reactor (IMER) based on human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for on-line enzymatic studies. *Journal of Chromatography A*. 2006; 1120: 151–157.

CARDOSO L.C.; de MORAES M.C; CASS Q.B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Quím. Nova*. 2009; 32 (1):175-187.

CASS, Q.B. & CASSIANO "Cromatografia Líquida". In: Obtenção e caracterização de enzimas para aplicação em cromatografia líquida. ADALBERTO, P.R.& SOUZA, D.H.F., N. 1 ed. Rio de Janeiro: *Elsevier*, 2015.p.357.

CHARPENTIER A.; MENOZZI P.; MARCEL V.; VILLATTE F.; FOURNIER D. A method to estimate acetylcholinesterase-active sites and turnover in insects. *Anal. Biochem*. 2000, 285: 76–81.

- CHEN M.H.; HAN Z.J. Cloning and sequence analysis of 2 different acetylcholinesterase genes in *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*. *Genome*. 2006; 49: 239- 243.
- CHEN Y.; BLACK D.S.; REILLY P.J. Carboxylic ester hydrolases: Classification and database derived from their primary, secondary, and tertiary structures. *Protein Sci*. 2016; 25(11):1942-1953. doi: 10.1002/pro.3016.
- CHEOL, K. Y.; EUN, L. G.; HUI, P. J. "New hydantoin derivative useful in composition for prevention and treatment of chronic inflammatory disorder, inflammatory pain, neuropathic pain, autoimmune disease or degenerative disease". KR2012086957-A, 2012.
- CHIU Y.C., TRIPATHI, R.K. & O'Brien, R.D. A gel scanning method for kinect studies on a acetylcholinesterase isozyme. *Analyt. Biochem*. 1972; 45: 480-487.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987; 162(1): 156.
- COMMISSION DECISION (2002/657/EC) of 12 August 2002, Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results., <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF>. acessado em 16-04-2010
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2007 COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de- açúcar: safra 2007-2008: terceiro levantamento. Brasília, DF: 2007. Disponível em: <<HTTP://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3lev-cana.pdf>>. Acesso em: 13 julho 2017.
- COSTA, A. N.; VASCONCELOS, H. L.; VEIRA- NETO, E. H. M.; BRUNA, E. M. Do herbivores exert top-down e cts in Neotropical savannas? Estimates of biomas cosumption by leaf-cutter ants. *Journal of Vegetation Science*, Knivsta. 2008; 19: 849-854.
- CUI H.F.; WU W.W.; LI M.M.; SONG X; LV. Y.; ZHANG T.T. A highly stable acetylcholinesterase biosensor based on chitosan-TiO₂-graphene nanocomposites for detection of organophosphate pesticides. *Biosens Bioelectron*. 2017; 29 (99): 223-229.
- DELLA LUCIA, T. M. C. Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo. Viçosa, MG: Ed da UFV, 2011. 419 p.
- DEREEPER, A.; GUIGNON, V.; BLANC, G.; AUDIC, S.; BUFFET, S.; CHEVENET, J.; DUFAYARD, F.; GUINDON, S.; LEFORT, V.; LESCOT, M.; CLAVERIE, J. M. & GASCUEL O. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*. 2008; 36: W465-W469.
- DI GIOVANNI, S.; BORLOZ, A.; URBAIN, A.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P.-A. & REIST, M., "In vitro screening assays to identify natural or

synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods". Eur. J. Pharm Sci. 33: 109, 2008.

ELDEFRAWI M.E, TRIPATHI RK & O'Brien RD. Acetylcholinesterase isozymes from the housefly brain. Biochem. Biophys. Acta. 1970; 212: 308-314.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. JR. & FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology. 1961; 7: 88-95.

FARJI-BRENER, A.G.F.; RUGGIERO, A. Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) inhabiting Argentina: patterns in species richness and geographical range sizes. Journal of Biogeography, Oxford. 1994; 21 (4): 391-399.

FERREIRA, F. A. Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa, MG: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.

FOURNIER D.; BERGÉ J.B.; DE ALMEIDA M.L.C.; BORDIER C. Acetylcholinesterases from *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster* brain are linked to membranes by a glycopospholipid anchor sensitive to an endogenous phospholipase. J Neurochem. 1988; 50(4):1158–63.
FOURNIER, D. & MUTÉRO, A. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. Comp. Biochem. Physiol. 1994; 108C: 19–31.

FUKUTO, T.R. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. Environmental Health Perspective. 1990; 87: 245-254.

GABROVSKA K.; MARINOV I.; GODJEVARGOVA T.; PORTACCIO M.; LEPORE M.; GRANO V.; DIANO N.; MITA D. G. The influence of the support nature on the kinetics parameters, inhibition constants and reactivation of immobilized acetylcholinesterase. International Journal of Biological Macromolecules. 2008; 43: 339–345.

GAO J.R.; KAMBHAMPATI S.; ZHU K.Y. Molecular cloning and characterization of a greenbug (*Schizaphis graminum*) cDNA encoding acetylcholinesterase possibly evolved from a duplicate gene lineage. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2002; 32: 765–775.

HAMILTON, G. S.; CATONVILLE, M. D. Hydantoin derivative compounds, pharmaceutical compositions, and methods of using same. US 20020058685, 2002.

HAREL, M.; SCHALK, I.; EHRET-SABATIER, L.; BOUET, F.; GOELDNER, M.; HIRTH, C.; AXELSEN, P. H.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993; 90(19): 9031-9035.

HAREL, M.; KRYGER, G.; ROSENBERY, T.L.; MALLENDER, W. D.; LEWIS, T.; FLETCHER, R. J.; GUSS, J.M.; SILMAN, I. & SUSSMAN, J. L. Three-

dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Science*. 2000; 9: 1063–1072.

HE G, SUN Y, LI F. RNA interference of two acetylcholinesterase genes in *Plutella xylostella* reveals their different functions. *Arch Insect Biochem*. 2012; 79:75–86.

HEMATPOOR A.; LIEW S.Y.; CHONG W.L.; AZIRUN M.S.; LEE V.S.; AWANG K. Inhibition and larvicidal activity of phenylpropanoids from *Piper sarmentosum* on acetylcholinesterase against mosquito vectors and their binding mode of interaction. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155265.

HEMINGWAY J.; SMALL G.J.; MONRO A.G. Possible mechanisms of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in German cockroaches (Dictyoptera, Blattellidae) from different geographical areas. *J Econ Entomol*. 1993; 86: 1623–1630.

HILL A.; KARBOUNE S.; MATEO C. Investigating and optimizing the immobilization of levansucrase for increased transfructosylation activity and thermal stability. *Process Biochemistry*. 2017;doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.011

HOUNDÉTE T.A.; FOURNIER D.; KETOH G.K.; GLITHO I.A.; NAUEN R.; MARTIN T. Biochemical determination of acetylcholinesterase genotypes conferring resistance to the organophosphate insecticide chlorpyrifos in field populations of *Bemisia tabaci* from Benin, West Africa. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2010; 98: 115–120.

HUCHARD E.; MARTINEZ M.; ALOUT H.; DOUZERY E.J.P.; LUTFALLA G. Acetylcholinesterase genes within the Diptera: takeover and loss in true flies. *P R Soc B*. 2006; 273: 2595–2604.

HUI X.M.; YANG L.W.; HE G.L.; YANG Q.P.; HAN Z.J.; LI F. RNA interference of *ace1* and *ace2* in *Chilo suppressalis* reveals their different contributions to motor ability and larval growth. *Insect Mol Biol*. 2011; 20:507–518.

IBÁ (2015) - criados em 16 abril 2015 (<http://iba.org/pt/produtos/celulose>) <<http://iba.org/pt/produtos/papel>>. Acesso em 13 de julho 2017.

IBÁ (2017) - Industrias Brasileiras de Árvores - Cenários Ibá: balança comercial do setor florestal apresenta superávit de 4,9 % Criado: 04 julho 2017 (<http://iba.org/pt/9-conteudo-pt/794-cenarios-iba-balanca-comercial-do-setor-florestal-apresenta-superavit-de-4-9>) acesso em 13 de julho 2017.

IKE, P. T. L.; MOREIRA, A. C.; ALMEIDA F. G. ; FERREIRA D.; BIROLI W. G.; PORTO A. L. M.; SOUZA D. H. F. Functional characterization of a yellow laccase from *Leucoagaricus gongylophorus*. *SpringerPlus*. 2015; 4: 654.

KATZUNG, B. G. Introduction to autonomic pharmacology. In: *Basic and clinical pharmacology*, 8 edition. USA: The McGraw Hill Companies, Inc, 2001:75–91.

KIM Y.H.; CHA D.J.; JUNG J.W.; KWON H.W.; LEE S.H. Molecular and kinetic properties of two acetylcholinesterases from the western honey bee, *Apis mellifera*. PLoS ONE. 2012; 7(11): e48838. doi:10.1371/journal.pone.0048838

KIM, Y. H.; CHOI, J. Y. ; JE, Y. H. ; KOH, Y. H. & LEE, S. H. Functional analysis and molecular characterization of two acetylcholinesterases from the German cockroach, *Blattella germanica*. Insect Molecular Biology. 2010; 19(6): 765–776

KIM, Y.H. & LEE, S.H.. Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the Class Insecta? Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2013; 43: 47-53

KOPP J.; SCHWEDE T. Automated protein structure homology modeling: a progress report. Pharmacogenomics Journal. 2004; 5 (4): 405–416.

KRYGER, G.; GILES, K.; HAREL, M; TOKER, L.; VELAN, B.; LAZAR, A.; KRONMAN, C.; BARAK, D.; ARIEL, N. & SHAFFERMAN, A. 3D Structure at 2.7 Å resolution of native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with fasciculin-II. In: Doctor BP, Taylor P, Quinn DM, Rotundo RL, Gentry MK, eds. Structure and function of cholinesterases and related proteins. New York: Plenum. 1998; 323–326.

KUMAR M.; GUPTA G.P.; RAJAM M.V. Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. J. Insect Physiol. 2009; 55; 273-278.

KUMAR S., STECHER G., TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol. 2016; 33(7): 1870-4.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259):680-685.

LANG G.J.; Zhu K.Y.; Zhang C.X. Can Acetylcholinesterase Serve as a Target for Developing More Selective Insecticides? Current Drug Targets. 2012, 13: 495-501.

LASKOWSKI R.A.; MACARTHUR M. W.; MOSS D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J. Appl. Cryst. 1993. 26: 283-291.

LI F.; HAN Z.J. Two different genes encoding acetylcholinesterase in cotton aphid (*Aphis gossypii*). Genome. 2002; 45: 1134-1141.

LIMA, C. A.; DELLA LÚCIA, T. M. C.; ANJOS, N.S. Formigas cortadeiras: biologia e controle. Viçosa: UFV, 2001. 28 p. (Boletim de extensão; 44).

LOPEZ J. R. S.; JACOBS D. R. JR.; HIMES J. H.; ALEXANDER B.H. Acetylcholinesterase activity, cohabitation with floricultural workers, and blood pressure in ecuadorian children. Environ Health Perspect. 2013; 121:619–624.

LU Y.; PARK Y.; GAO X., ZHANG X., YAO J., PANG Y-P., JIANG H., ZHU K.Y. Cholinergic and non- cholinergic functions of two acetylcholinesterase genes revealed by gene-silencing in *Tribolium castaneum*. *Sci Rep*. 2012; 2:288.

LUTHY, R.; BOWIE, J. U. & EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*. 1992; 356: 83-85.

MARICONI, F.A.M. As saúvas. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1970. 167p.

MASSOULIÉ J.; BON S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annual Reviews Inc*. 1982; 5:57-61.

MASSOULIE J.; BON, S.; RIEGER, F.; VIGNY, M. *Croat. Chem. Acta*. 1975; 47:163-179.

MASSOULIE, J.; RIEGER, F. *Eur. J. Biochem*. 1969; 11,441-455.

MAYHÉ-NUNES, A. J. Sinopse do gênero *Mycetarotes* (Hym., Formicidae), com a descrição de duas espécies novas. *Bol. Entomol. Venez. (n.s.)*. 1995; 10(2): 197-205.

MEHDIABADI, N. J.; SCHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Myrmecological News*, 2009; 13: 37-55.

MENG X, LI C, XIU C, ZHANG J, LI J, HUANG L, ZHANG Y, LIU Z. Identification and Biochemical Properties of Two New Acetylcholinesterases in the Pond Wolf Spider (*Pardosa pseudoannulata*). *PLoS ONE*. 2016; 11(6): e0158011.

MOHAMED, M. A.; MAHDY, E.S.M.E.; GHAZY, A.E.H.M. ; IBRAHIM, N.M.; EL-MEZAYEN, H.A.& GHANEM, M.M.E. The activity of detoxifying enzymes in the infective juveniles of *Heterorhabditis bacteriophora* strains: purification and characterization of two acetylcholinesterases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2016; 180: 11-22

de MORAES MC; CARDOSO CL; CASS QB. Immobilized purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni* for specific inhibition studies. *Anal Bioanal Chem*. 2013; 405(14):4871-8.

de MORAES M.C.; VANZOLINI K.L.; CARDOSO C.L.; Q.B. CASS. New trends in LC protein ligand screening. *Review Article. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014; 87: 155– 166).

de MORAES M.C.; CARDOSO C. L.; SEIDL C.; MOADDEL R.; CASS Q.B. Targeting Anti-Cancer Active Compounds: Affinity-Based Chromatographic Assays. *Current Pharmaceutical Design*. 2016; 22: 1-12.

MOREIRA, A.C. ; SANTOS, A. M.; CARNEIRO, LAJARIM R.; BUENO, O. C.; SOUZA, D. H. F. Validation of reference genes in leaf-cutting ant *Atta sexdens*

rubropilosa in different developmental stages and tissues. International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology. 2017; 2:43-755.

MOYO M.; NDHLALAA R.; FINNIE J. F.; STADEN J. V. Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts. Food Chemistry. 2010; 123: 69–76.

MUELLER U.G., GERARDO NM, AANEN DK, SIX DL, SCHULTZ TR. The evolution of agriculture in insects. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2005; 36:563-95

NABESHIMA, T.; MORI, A.; KOZAKI, T.; IWATA, Y.; HIDOH, O.; HARADA, S.; KASAI, S.; SEVERSON D.W.; KONO Y. & TOMITA T. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 313: 794–801.

NACHMANSOHN, D. & WILSON, I.B. The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology. 1951; 12: 259-339.

NADRI, H.; PIRALI-HAMEDANI, M.; SHEKARCHI, M.; ABDOLLAHI, M.; SHEIBANI, V.; AMANLOU, M.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. "Design, synthesis and anticholinesterase activity of a novel series of 1-benzyl-4-((6-alkoxy-3-oxobenzofuran-2(3H)-ylidene) methyl)pyridinium derivatives." Bioorg. Med. Chem. 2010; 18: 6360.

NAWROCKI J. The silanol group and its role in liquid chromatography. Journal of Chromatography A. 1997; 779 (1-2): 29-71.

NELSON, D. L. & COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger -5. ed.- Porto Alegre: Artmed, 2011.

NICKELE M. A.; PIE M. R.; FILHO W. R.; S. R. C. PENTEADO S. R. C. Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras. Pesq. or. bras., Colombo. 2013; 33 (73):53-72.

OLLIS D.L., CHEAH E.; CYGLER M.; DIJKSTRA B.; FROLOW F.; FRANKEN S.M.; HAREL M.; REMINGTON S.J.; SILMAN I.; SCHRAG J. The a/b hydrolase fold. Protein Eng. 1992; 5:197–211.

PANG Y-P; BRIMIJOIN, S.; RAGSDALE, D. W.; ZHU, K. Y. & SURANYI, R. Novel and viable acetylcholinesterase target site for developing effective and environmentally safe insecticides. Current Drug Targets. 2012; 13: 471-482.

PANG Y.P; BRIMIJOIN, S.; RAGSDALE, D. W.; ZHU, K. Y. & SURANYI, R. Novel and viable acetylcholinesterase target site for developing effective and environmentally safe insecticides. Current Drug Targets. 2012; 13: 471-482.

PANG, Y.P; SINGH, S. K.; GAO, Y.; LASSITER, T.L.; MISHRA, R. K.; ZHU, K. Y. & BRIMIJOIN, S. Selective and irreversible inhibitors of aphid

acetylcholinesterases: steps toward human-safe insecticides. PLoS ONE. 2009; 4 (2): e4349.

PANG, Y.P. Novel acetylcholinesterase target site for malaria mosquito control. PLoS ONE. 2006; 1(1): e58.

PANG, Y.P. Species marker for developing novel and safe pesticides. Bio.org. Med. Chem. Lett. 2007; 17: 197-199.

PATTERSON, J., R. WAGNER, L. WHARTON. The Drosophilidae of the Southwest. Austin, TX: The University of Texas Press. 1943.

PETERSEN, T. N., BRUNAK, S., von HEIJINE, G., NIELSEN, H. SignalP4.0: discriminating signal peptide from transmembrane regions. Natute methods. 2011; 8:785.

PEZZEMENTI L.; ROWLAND M.; WOLFE M.; TSIGELNY I. Inactivation of an invertebrate acetylcholinesterase by sulfhydryl reagents: the roles of two cysteines in the catalytic gorge of the enzyme. Invert Neurosci. 2006; 6: 47-55.

PIKART, T. G.; SOUZA, G. K.; ZANUNCIO, T. V.; ZANETTI, R.; POLANCZYK, R. A.; SERRÃO, J. C.; ZANUNCIO, J. C. Dispersion of seeds of tree species by the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus molestans* (Hymenoptera: Formicidae) in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil. Sociobiology, New York.2010; 56; 645- 652.

PRINCIPATO, G.B., TALESA, V., GIOVANNINI, E., PASCOLINI, R., GABRIELLA, R. Characterization of the soluble cholinesterase from *Squilla mantis*. Comp. Biochem. Physiol. Part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 1988; 90: 413-416.

RAHIMI,R.; NIKFAR,S. & ABDOLLAHI, M. Increased morbidity and mortality in acute human organophosphate-poisoned patients treated by oximes: a metaanalysis of clinical trials. Hum. Exp. Toxicol. 2006; 25: 157–162.

RAJDEO K.; HARINIB T.; LAVANYA K.; FADNAVIS N. W. Immobilization of pectinase on reusable polymer support for clarification of apple juice. Food and Bioproducts Processing. 2016; 99: 12-19.

RAMACHANDRAN, G.N.; RAMAKRISHNAN, C. & SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. Journal of Molecular Biology. 1963; 7: 95–9.

RAVES M.L; HAREL M.; PANG Y.P.; SILMAN I.; KOZIKOWSKI A.P.; SUSSMAN J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. Nat. Struct. Biol. 1997; 4(1):57-63.

RENUGA P. A.; RAJALAKSHMI G.; KUMARADHAS P. A combined molecular docking and charge density analysis is a new approach for medicinal research to understand drug-receptor interaction: curcumin-AChE model. Chem Biol Interact. 2015; 225:21-31.

REVUELTA L.; PIULACHS M.D.; BELLE´S X.; CASTAÑERA P.; ORTEGO F.; DÍAZ-RUÍZ J.R.; HERNÁNDEZ-CRESPO P.; TENLLADO F. RNAi of *ace1* and *ace2* in *Blattella germanica* reveals their differential contribution to acetylcholinesterase activity and sensitivity to insecticides. *Insect Biochem Molec.* 2009; 39:913–919.

RHEE, I.K.; VAN RIJN, R.M. & VERPOORTE, R. Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. *Phytochem. Anal.* 14: 127, 2003.

RODRIGUES M. V. N. ; CORRÊA R. S.; VANZOLINI K. L.; SANTOS D. S.; BATISTA. A.; CASS Q. B. Characterization and screening of tight binding inhibitors of xanthine oxidase: an on-flow assay. *RSC Adv.* 2015; 5: 37533-37538.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3O ed.. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS J. C.DOS; ZANETTI R.; OLIVEIRA D.F. DE; GAJO G.C.; ALVES D.S. Plant-Derived Products for Leaf-Cutting Ants Control. 2013; <http://dx.doi.org/10.5772/55035>

SARAIVA, E. R. Avaliação hematológica, atividade enzimática e níveis de metais na exposição ocupacional aos defensivos agrícolas e fertilizantes. Ribeirão Preto, Programa de Pós graduação em Toxicologia – USP, 2009. Tese de doutorado, 62 p.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008; 105: 5435–5440.

SHADNIA, S.; AZIZI, E.; HOSSEINI, R.; KHOEI, S.; FOULADDEL, S.; PAJOUMAND, A.; JALALI, N. & ABDOLLAHI, M. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Hum. Exp. Toxicol.* 2005; 24: 439–445.

SHANG J.Y.; SHAO Y.M.; LANG G.J.; YUAN G.; TANG Z.H.; ZHANG C.X. Expression of two types of acetylcholinesterase gene from the silkworm, *Bombyx mori*, in insect cells. *Insect Science.* 2007; 14: 443-449.

SINGH N.S.; HABICHT K.L.; DOSSOU K.S.S.; SHIMMO R.; WAINER I.W.; MOADDEL R. Multiple protein stationary phases: A review. *J Chromatography B-Analytical Technol Biomed Life Sci.* 2014; 968: 64-68.

SILMAN, I.; MILLARD, C. B.; ORDENTLICH, A.; GREENBLATT, H. M; HAREL, M.; BARAK, D.; SHAFFERMAN, A. & SUSSMAN, J. L. A preliminary comparison of structural models for catalytic intermediates of acetylcholinesterase. *Chemico-Biological Interactions.* 1999; 119–120: 43–52.

da SILVA, J.I.; MORAES, M.C.; VIEIRA, L.C.C.; CORREÂ, A.G.; CASS, Q. B.; CARDOSO, C. L. Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. *J. Pharm. Biomed.* 2012; 73: 44–52.

SILVA, K.C.; ASSIS, C.R.; OLIVEIRA, V.M.; CARVALHO, L.B. JR; BEZERRA, R.S. Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. *Aquat. Toxicol.* 2013; 126:191-7.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001; 2: 294–302.

SORSA. Chromosome maps of *Drosophila*. Boca Raton, FL: CRC Press. 1988; 1: 200p.

SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L. & SILMAN, I. Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein. *SCIENCE.* 1991; 253: 872-879.

TOUTANT, J.P. Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Progress in Neurobiology.* 1989; 32: 423-446.

VANZOLINI, K. L.; VIEIRA, L. C.C.; CORRÊA, A. G.; CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B. Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors-tandem mass spectrometry: an on-flow tool for ligand screening. *J. Med. Chem.* 2013; DOI: 10.1021/jm301732a.

VANZOLINI, K.L. Biorreatores de Acetilcolinesterase: Estudo de Condições para a Triagem de Ligantes. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2013. Tese de doutorado, 114 p.

VIEGAS Junior, C; BOLZANI, V. da S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. *Quim. Nova.* 2004; 27 (4): 655-660.

VILELA A.F.L.; SILVA J.I. DA; VIEIRA L.C.C.; BERNASCONI G.C.R.; CORRÊA A.G.; CASS Q.B.; CARDOSO C.L. Immobilized cholinesterases capillary reactors on-flow screening of selective inhibitors. *Journal of Chromatography B.* 2014; 968: 87–93

VITORINO, M.D.; DUTRA R. N.; ARENHARDT T.C.P.; BEAL L. C.; GONÇALVES A. H. M.; MARQUARDT R. T.; COSTA P. A.; CRISTO S. C. Avaliação do uso de imidacloprid no controle de *Acromyrmex spp.* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) em plantio de *Pinus taeda*. *FLORESTA*, Curitiba, PR. 2015; 45 (1): 41 - 48.

VRIEND, G. WHAT IF: a molecular modelling and drug design program. *J. Mol. Graph.* 1990; 8: 52-56.

WANG B.B.; LI F.C.; XU K.Z.; NI M.; HU J.S; TIAN J.H.; LI Y.Y.; SHEN W.D.; LI B. Effects of mutations on the structure and function of silkworm type 1 acetylcholinesterase. *Pestic Biochem Physiol.* 2016; 129:1-6.

WANG DM, ZHANG BX, LIU XM, RAO XJ, LI SG, LI MY, LI S. Molecular characterization of two acetylcholinesterase genes from the rice leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE). *ARCHIVES OF INSECT BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY.* 2016; 0 (0): 1–14.

WANG J.M.; WANG B.B.; XIE Y.; SUN S.S.; GU Z.Y.; MA L.; LI F.C.; ZHAO Y.F.; YANG B.; SHEN W.D.; Li B. Functional study on the mutations in the silkworm (*Bombyx mori*) acetylcholinesterase type 1 gene (ace1) and its recombinant proteins. *Mol Biol Rep.* 2014; 41(1): 429–437.

WEILL M.; FORT P.; BERTHOMIEU A.; DUBOIS M.P.; PASTEUR N. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *P Roy Soc Lond B Bio.* 2002; 269: 2007– 2016.

WEILL, M.; MALCOLM, C.; CHANDRE F.; MOGENSEN, K.; BERTHOMIEU, A.; MARQUINE, M. & RAYMOND, M. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol.* 2004; 13: 1–7.

XIAO, L.; DOU, W., LI, Y.; WANG J. Comparative studies of acetylcholinesterase purified from three field populations of *Liposcelis entomophila* (Enderlein) (Psocoptera: liposcelididae). *Archives of insect biochem. and physi.* 2010; 75 (3): 158–173.

YE M.; BEACH J.; MARTIN J.W.; SENTHILSELVAN A. Occupational pesticide exposures and respiratory Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2013; 10:6442-6471

YE Y.H.; LI C.; YANG J.; MA L.; XIAO Y.; HU J.; RAJPUT N.A.; GAO C.F.; ZHANG Y.Y.; WANG M.H. Construction of an immobilised acetylcholinesterase column and its application in screening insecticidal constituents from *Magnolia officinalis*. *Pest Manag Sci.* 2015; 71(4):607-15.

YU G.; WU W.; ZHAO Q.; WEI X.; LU Q. Efficient immobilization of acetylcholinesterase onto amino functionalized carbon nanotubes for the fabrication of high sensitive organophosphorus pesticides biosensors. *Biosensors and Bioelectronics.* 2015; 68: 288–294.

ZANETTI, R.; JANUCIO, J. C.; VILELA, E. F.; LEITE, H. G.; JAFFÉ, K.; OLIVEIRA, A. C. Level of economic damage for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Sociobiology, Feira de Santana,* 2003; 42 (2):442-443.

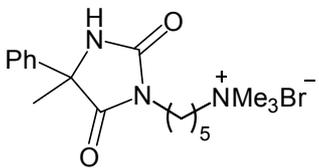
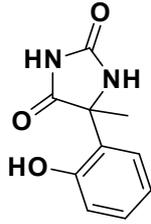
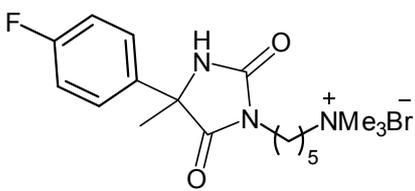
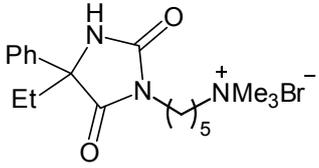
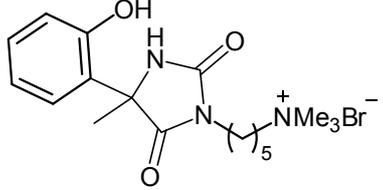
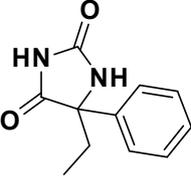
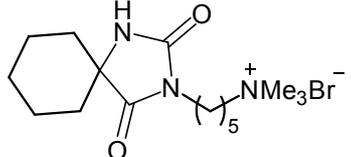
ZANETTI R.; ZANUNCIO J.C.; SANTOS J.C.; SILVA W.L.P DA; RIBEIRO G.T.; LEMES P.G. Review An Overview of Integrated Management of Leaf-Cutting

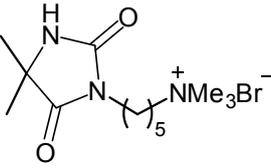
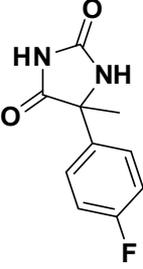
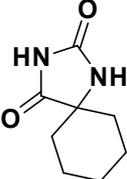
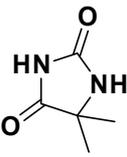
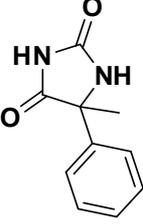
Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian Forest Plantations. 2014; 5: 439-454

ZENG Z; YAN Y; WANG B; LIU N.; XU H. Discovery and identification of O, O-diethyl O-(4-(5-phenyl-4, 5-dihydroisoxazol-3-yl) phenyl) phosphorothioate (XP-1408) as a novel mode of action of organophosphorus insecticides. *Sci Rep.* 2017; 7(1):3617.

ZNALEZIONA J.; PETR J.; KNOB R.; MAIER V.; ŠEVČÍK J. Dynamic Coating Agents in CE. *Chromatographia Supplement 1.* 2008; 67: 5–12.

ANEXO I

Código	Estrutura	Massa Molar (g/mol)
LSPN 582 Sal de hidantoína		318.22
LSPN 577 Hidantoína		206.20
LSPN 583 Sal de hidantoína		336.21
LSPN 584 Sal de hidantoína		332.23
LSPN 586 Sal de hidantoína		334.21
LSPN 572 Hidantoína		204.22
LSPN 585 Sal de hidantoína		296.23

LSPN 588 Sal de hidantoína		256.20
LSPN 576 Hidantoína		208.19
LSPN 580 Hidantoína		168.19
LSPN 550 Hidantoína		128.13
LSPN 553 Hidantoína		190.20