

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

**"DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS
BASEADOS EM ACETILCOLINESTERASE VISANDO IDENTIFICAR
EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS PARA O CONTROLE DE FORMIGAS
CORTADEIRAS"**

SEAN DOS SANTOS ARAÚJO*

Dissertação apresentada
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre
em Química, área de
concentração: Química
Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

***Bolsista CNPq**

SÃO CARLOS- SP
2019



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 Dissertação de Mestrado do candidato Sean dos Santos Araújo, realizada em 31/10/2019.

Prof. Dr. João Batista Fernandes
UFSCar

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria
UFSCar

Prof. Dr. Rafael Martos Buoro
IQSC/USP

Em paz me deitarei e dormirei, porque só tu, Senhor, me fazes habitar em
segurança.
Salmos 4:8

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao Santo Deus, que sustentou-me mediante a fé nestes anos que vivi este mestrado. À Ele, minha eterna gratidão.

Aos meus pais, Eladil e Meire, pelo sustento financeiro e emocional em todo este período e por não medirem esforços para que eu alcançasse este objetivo.

À minha querida avó, Antônia, que sempre me desejou o melhor e sempre lembra de mim em suas orações.

Às minhas irmãs e tio, Yasmim, Tuãne e Felipe, que completam a família que tanto amo.

Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes por toda sua orientação desde o início, todo o investimento neste projeto e ensino na Química.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria que cedeu seu laboratório para que esta pesquisa fosse desenvolvida.

Ao Msc. Wilson Tiago Fonseca, que desde o início deste trabalho me acompanhou, ensinando, orientando e corrigindo para que eu me tornasse um pesquisador melhor.

Aos amigos paraenses, André, Artur e Luís Felipe. Aos amigos paulistas, Douglas, Wendel e Priscila (Priscilo).

À Marcela Sita Longhin, que esteve ao meu lado no momento mais difícil que passei neste período. Minha imensa gratidão. Também minha mais sincera gratidão à dona Rita Malerba.

A todos os colegas do laboratório LABIE e PN.

Ao Departamento de Química, corpo docente e administrativo.

Aos órgãos de fomento: CNPq; FAPESP e CAPES;

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.

LISTA DE ABREVIações

A	Ampere
AChE	Acetilcolinesterase
ACh	Acetilcolina
ASChI	Acetiltiocolina
AuNPs-GSH	Nanopartículas de ouro decoradas com glutathione
BuChE	Butirilcolinesterase
d	duplete
E	Potencial
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
Glu	Glutamato
HOBt	Hidroxibenzotriazol
His	Histidina
Hz	Hertz
I	Corrente
I_p	Corrente de pico
I%	Porcentagem de inibição
J	Acoplamento
MES	Tampão ácido 2-etanossulfônico
mm²	milímetro ao quadrado
mV	miliVolts
PBS	Tampão Fosfato salínico (do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PDDA	Cloreto de polidialildimetilamônio
pH	Potencial Hidrogeniônico
RMN de ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de próton de Hidrogênio
Ser	Serina
s	singleto
sl	singleto largo

SPE	Eletrodo serigrafado (do inglês <i>Screen-Printed Electrode</i>)
SWV	Voltametria de onda quadrada (do inglês <i>Square Wave Voltametry</i>)
t	tripleto
TW-20	Tween- 20
μ	micro (10^{-6})

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1- Valores de áreas eletroativas para os eletrodos sem e com modificação, calculados pela Equação de Randles-Sevcik.....	29
TABELA 4.2- Desvio Padrão Relativo para intra e inter-dias de SPEs nas condições escolhidas para os testes de inibição.....	36
TABELA 4.3- Dados de RMN de ^1H (600 MHz) da estrutura da FIGURA 4.17 (1) em CDCl_3 e da literatura referente a antraquinona (2).....	43
TABELA 4.4- Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com <i>Picramnia riedelli</i> nas concentrações nas concentrações PRF1 (metanol) 2,0 mg.mL^{-1} , PRF2 (metanol) 1,0 mg.mL^{-1} , PRF1 (éter de petróleo) 2,0 mg.mL^{-1} e PRF2 (éter de petróleo) 1,0 mg.mL^{-1}	51
TABELA 4.5- Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com <i>Picramnia ciliata</i> concentrações PFE1 1 mg.mL^{-1} , PFE2 2 mg.mL^{-1} , PGE1 2 mg.mL^{-1} e PGE2 1 mg.mL^{-1}	52
TABELA 4.6- Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com <i>Toona ciliata</i> (hexano) nas concentrações TFH1 1 mg.mL^{-1} e TFH2 2 mg.mL^{-1}	53
TABELA 4.7: Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>L. gongylophorus</i> após 30 dias do experimento.....	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1- Compostos utilizados como inseticidas no Brasil: (1) Fipronil, (2) metaflumizona e (3) sulfluramida.	2
FIGURA 1.2- Produtos naturais com atividade inseticida: (4) ricinina, (5) ácido limonéxico e (6) ácido antranílico.	3
FIGURA 1.3- Compostos sintéticos com atividade inseticida: (7) benzilamina-3-(4,5-metilenodioxifenil)-2-(E)-propanamida e (8) 1-(3,4-metilenodioxifenil)-dodecano.	4
FIGURA 1.4- A resolução tridimensional da AChE de <i>Electrophorus electricus</i> dos estudos de Bourne e colaboradores ³⁵	4
FIGURA 1.5- Centro catalítico da AChE ⁴¹	5
FIGURA 1.6- Hidrólise de ACh no centro catalítico de AChE. Adaptado ³⁴	7
FIGURA 1.7- Processo de oxi-redução do substrato ASChI.	10
FIGURA 1.8- Representação esquemática da preparação de SPEs ⁷⁰	13
FIGURA 3.1- Etapas da construção de SPEs. Acima à esquerda: impressora de corte. Acima à direita: Vinil cortado conforme o desenho de eletrodos. Abaixo à esquerda: SPEs com tinta de carbono e de prata. Abaixo à direita: Eletrodos prontos para medições eletroquímicas.	18
FIGURA 3. 2- Reação EDC-HOBt para ativação do grupo carboxílico das AuNPs e reação com grupo amina de um aminoácido presente na enzima.	20
FIGURA 4.1- Voltamogramas cíclicos referentes a eletrodos da célula eletroquímica descartável, sem modificação. Solução de ácido Ferrocenomonocarboxílico 1 mmol.L ⁻¹ em KCl 0,5 mol.L ⁻¹ , intervalo de potencial de 0,0 a +0,6 V.	24
FIGURA 4.2- Relação linear das correntes de pico anódicas e catódicas em função da raiz quadrada das velocidades de varredura para eletrodos sem modificação.	25
FIGURA 4.3- Voltamogramas cíclicos referentes a eletrodos da célula eletroquímica descartável, com modificação. Solução de ácido Ferrocenomonocarboxílico 1 mmol.L ⁻¹	

- ¹ em KCl 0,5 mol.L⁻¹, intervalo de potencial de 0,0 a +0,6 V26
- FIGURA 4.4- Relação linear das correntes de pico anódicas e catódicas em função da raiz quadrada das velocidades de varredura para eletrodos com modificação.....27
- FIGURA 4.5- Voltamogramas cíclicos obtidos em solução Ferrocenomonocarboxílico para os eletrodos não e eletrodos modificados com PDDA e AuNP-GSH e na presença da enzima AChE. Intervalo de potencial de 0 a +0,6 V e $v= 100 \text{ mV.s}^{-1}$30
- FIGURA 4.6- Voltamogramas de onda quadrada do potencial de oxidação da tiocolina em função da concentração de substrato em tampão fosfato 0,01 mol.L⁻¹ (pH 7,4). [AChE]= $1,25 \times 10^{-1} \text{ mg.mL}^{-1}$. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.31
- FIGURA 4.7- Representação esquemática do mecanismo de resposta do biossensor enzimático.32
- FIGURA 4.8- Correntes de pico anódica em função da variação da concentração do substrato, do tempo de reação enzimática e seus desvios padrões. Em tampão fosfato 0,01 mol.L⁻¹ (pH 7,4). $\blacklozenge = 5,88 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $\blacksquare = 1,17 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$; $\blacktriangle = 5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$; $\blackstar = 10,10 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$; $\bullet = 53,45 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. [AChE]= $1,25 \times 10^{-1} \text{ mg.mL}^{-1}$. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.33
- FIGURA 4.9- Efeito na corrente de oxidação da tiocolina em função da quantidade de enzima AChE imobilizada nos biossensores. Correntes obtidas por voltametria de onda quadrada em ASChI $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,01 mol.L⁻¹ (pH 7,4). Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.....34
- FIGURA 4.10- Resposta da corrente de pico anódica da oxidação da tiocolina em função da variação do pH da solução de ASChI $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,01 mol.L⁻¹. [AChE]= $5 \times 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.35
- FIGURA 4.11- Efeito dos tempos de incubação da Azadiractina nas correntes de pico de oxidação da tiocolina calculado pela porcentagem de inibição. Solução de ASChI $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. [AChE]= $5 \times 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.....37
- FIGURA 4.12- Gráfico de correlação entre a porcentagem de inibição e a variação de concentração de Azadiractina. Solução de ASChI $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão

fosfato 0,01 mol.L⁻¹. [AChE]= 5 x 10⁻² mg.mL⁻¹. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.....38

FIGURA 4.13- Efeito dos tempos de incubação dos extratos de *Picramnia riedelli* (A) e *Picramnia ciliata* (B) nas correntes de pico de oxidação da tiocolina calculado pela porcentagem de inibição. Solução de ASChI 5,82 x 10⁻² mol.L⁻¹ em tampão fosfato 0,01 mol.L⁻¹. [AChE]= 5 x 10⁻² mg.mL⁻¹. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.39

FIGURA 4.14- Gráfico de correlação entre a porcentagem de inibição e a variação de concentração do extrato de (A) *Picramnia riedelli* e (B) *Picramnia ciliata*. Solução de ASChI 5,82 x 10⁻² mol.L⁻¹ em tampão fosfato 0,01 mol.L⁻¹. [AChE]= 5 x 10⁻² mg.mL⁻¹. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.....40

FIGURA 4.15- Espectro de RMN de ¹H do extrato de *Picramnia riedelli* em CDCl₃..41

FIGURA 4.16- Espectro de RMN de ¹H com destaques nas regiões características de estrutura de antraquinona. Valores de integrais abaixo das curvas do espectro, deslocamentos químicos acima das curvas.42

FIGURA 4.17- Antraquinona isolada de *Picramnia* com os carbonos enumerados. .42

FIGURA 4.18- Espectro de RMN de ¹H com destaques nas regiões características de ácidos graxos. Espectro A- *Picramnia ciliata*; Espectro B- *Picramnia riedelli*. Valores de integrais abaixo das curvas do espectro, deslocamentos químicos acima das curvas.....44

FIGURA 4.19- Espectro de RMN de ¹H de *Picramnia ciliata* com destaques nas regiões características de isoprenóides. Valores de integrais abaixo das curvas do espectro, deslocamentos químicos acima das curvas.45

FIGURA 4.20- Estrutura para a classe dos isoprenóides.....45

FIGURA 4.21- Efeito dos tempos de incubação do extrato *Toona* nas correntes de pico de oxidação da tiocolina calculado pela porcentagem de inibição. Solução de ASChI 5,82 x 10⁻² mol.L⁻¹ em tampão fosfato 0,01 mol.L⁻¹. [AChE]= 5 x 10⁻² mg.mL⁻¹. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.....46

FIGURA 4.22- Gráfico de correlação entre a porcentagem de inibição e a variação de concentração do extrato de *Toona ciliata*. Solução de ASChI 5,82 x 10⁻² mol.L⁻¹ em tampão fosfato 0,01 mol.L⁻¹. [AChE]= 5 x 10⁻² mg.mL⁻¹. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.

.....	47
FIGURA 4.23- Espectro de RMN de ^1H do extrato de <i>Toona</i> em CDCl_3	48
FIGURA 4.24- Espectro de RMN de ^1H com destaques nas regiões características para limonóides. Valores de integrais abaixo das curvas do espectro, deslocamentos químicos acima das curvas.	49
FIGURA 4.25- Estrutura de anel furano com as numerações usais para os carbonos presentes no mesmo.	49
FIGURA 4.26 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com <i>Picramnia riedelli</i> nas concentrações PRF1 (metanol) $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, PRF2 (metanol) $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, PRF1 (éter de petróleo) $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e PRF2 (éter de petróleo) $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$	50
FIGURA 4.27- Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com <i>Picramnia ciliata</i> nas concentrações PFE1 1 mg.mL^{-1} , PFE2 2 mg.mL^{-1} , PGE1 2 mg.mL^{-1} e PGE2 1 mg.mL^{-1}	51
FIGURA 4.28- Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com <i>Toona ciliata</i> (hexano) nas concentrações TFH1 1 mg.mL^{-1} e TFH2 2 mg.mL^{-1}	53

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM ACETILCOLINESTERASE VISANDO IDENTIFICAR EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS PARA O CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS. O Brasil, que é um país com dimensão continental, possui clima apropriado para diversas práticas agrícolas. Os insetos, de forma geral, são considerados pragas para áreas agrícolas, dentre estes, a *Atta sexdens rubropilosa* (formiga cortadeira) que ataca as plantações de eucalipto, pinus, entre outras. O controle desta praga torna-se essencial para melhor produtividade das áreas cultivadas. Tal controle pode ser direcionado a inibição de enzimas presentes no organismo do inseto alvo. Nesta linha, o presente trabalho visa imobilizar a enzima acetilcolinesterase (AChE) em SPEs (*Screen-Printed Electrode*), empregando a técnica *layer-by-layer*, com o uso de AuNPs-GSH (Nanopartículas de ouro decoradas com glutatona) e dos reagentes EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e HOBt (Hidroxibenzotriazol) que estabelecem as ligações covalentes responsáveis por imobilizar a AchE nos SPEs. As respostas eletroquímicas confirmam a eficaz imobilização da enzima com este protocolo desenvolvido. Para os ensaios de inibição, o limonóide Azadiractina, o extrato bruto de *Toona ciliata* e os extratos brutos de *Picramnia riedelli* e *P. ciliata*, apresentaram significativa porcentagem de inibição frente a AChE. Espectros de RMN de ¹H dos extratos brutos utilizados foram obtidos para propor compostos naturais presentes nos mesmos e indicar possível relação com os resultados dos ensaios na enzima. Tais extratos apresentaram boa atividade inseticida frente à formiga cortadeira.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL ACETYLCHOLINESTERASE BIOSENSORS TO IDENTIFY EXTRACTS AND SUBSTANCES FOR LEAFCUTTER ANT CONTROL. Brazil, which is a continental country, has an appropriate climate for various agricultural practices. Insects, in general, are considered pests for agricultural areas, among them, an *Atta sexdens rubropilosa* (leafcutter ant) that attacks as eucalyptus, pine plantations among others. Control of this pest becomes essential for the best productivity of cultivated areas. This control can be directed to inhibition of enzymes present in the target insect organism. In this line, the present work aims to immobilize the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in SPEs (screen printed electrode), using the layer-by-layer technique, using AuNPs-GSH (glutathione-decorated gold nanoparticles) and EDC reagents (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) and HOBt (Hydroxybenzotriazole) which establish the covalent bonds responsible for immobilizing an AChE in the SPEs. Electrochemical responses confirm effective immobilization of the enzyme with this developed protocol. For inhibition assays, Azadiractin limonoid, *Toona ciliata* crude extract and *Picramnia riedelli* and *P. ciliata* crude extracts showed significant inhibition percentage against AChE. The ^1H NMR spectra of the crude extracts used were obtained to propose natural compounds present in them and to indicate possible relationships with the results of the enzymatic assays. These extracts showed good insecticidal activity against the leafcutter ant.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Agricultura e Pragas	1
1.2. Acetilcolinesterase	4
1.2.1 Estudos com a acetilcolinesterase.....	7
1.3. Biossensores	8
1.3.1 Tipos de imobilização	10
1.3.2 Eletrodos descartáveis	12
2 OBJETIVO	15
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	16
3.1 Materiais utilizados	16
3.2 Equipamentos utilizados	17
3.3 Construção dos eletrodos descartáveis	17
3.4 Preparo de soluções	18
3.5 Síntese de nanopartículas de ouro	19
3.6 Imobilização da acetilcolinesterase sobre os eletrodos de trabalho	19
3.7 Otimização dos parâmetros eletródicos.....	20
3.8 Determinação da atividade inibitória	21
3.8.1 Tempo de incubação	21
3.8.2 Avaliação da atividade inibitória em função da concentração	22
3.9 Ensaio de inibição do crescimento micelial de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	22
3.10 Ensaio de inibição do crescimento <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Resposta eletroquímica dos eletrodos descartáveis em função da variação da velocidade de varredura de potenciais.....	24
4.1.1 Estudo da resposta eletroquímica em função da velocidade de varredura de potenciais para eletrodos de trabalho sem modificação	24

4.1.2	Estudo da resposta eletroquímica em função da velocidade de varredura de potenciais para eletrodos de trabalho com modificação	26
4.1.3	Estudo das áreas eletroativas dos eletrodos sem e com modificação...	28
4.2	Perfil voltamétrico em cada etapa de modificação dos eletrodos e da imobilização da enzima acetilcolinesterase na célula eletroquímica.....	29
4.3	Avaliação da resposta eletroquímica em diferentes concentrações de substrato	30
4.4	Avaliação da resposta eletroquímica em diferentes concentrações de enzima... ..	33
4.5	Avaliação da resposta eletroquímica em diferentes valores de pH.....	34
4.6	Determinação de atividade inibitória da Azadiractina frente a AChE	36
4.6.1	Tempo de incubação	36
4.6.2	Resposta da atividade inibitória em função da variação de Azadiractina.....	37
4.7	Determinação de atividade inibitória de extratos de <i>Picramnia</i> frente a AChE.....	38
4.7.1	Tempo de incubação	38
4.7.2	Resposta da atividade inibitória em função da variação dos extratos de <i>Picramnia riedelli</i> e <i>Picramnia ciliata</i>	39
4.7.3	Espectroscopia por RMN dos extratos de <i>Picramnia</i>	40
4.8	Determinação de atividade inibitória de extrato de <i>Toona ciliata</i>	46
4.8.1	Tempo de incubação	46
4.8.2	Resposta da atividade inibitória em função da variação do extrato de <i>Toona ciliata</i>	47
4.8.3	Espectroscopia por RMN do extrato de <i>Toona ciliata</i>	48
4.9	Ensaio de inibição do crescimento <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	50
4.10	Ensaio de inibição do crescimento micelial de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	54
5	CONCLUSÃO	55
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. Agricultura e Pragas

Países que se encontram em ascensão no quadro econômico mundial se valem de seu setor agrícola para contínuo desenvolvimento e a arrecadação monetária deste importante setor tem porcentagem significativa no Produto Interno Bruto (PIB) de cada país. O Brasil, que é um país com dimensão continental, possui clima apropriado para diversas práticas agrícolas. O agronegócio no Brasil em 2017 representou 21,58% de todo o PIB brasileiro¹ e a exportação de produtos agrícolas rendeu um total de 7,3% das exportações agrícolas globais em 2014, sendo a soja o produto mais exportado².

Os insetos, de forma geral, são considerados pragas para áreas agrícolas, dentre estes, pode-se citar: *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Gorgulho-do-Milho) que prejudica o armazenamento de grãos de milho; *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho) que causa danos às culturas de arroz, sorgo, milho, cana-de-açúcar, hortaliças e algodão; *Plutella xylostella* (traças das crucíferas) principal praga para o cultivo de repolho, couve, couve-flor e etc.; *Atta sexdens rubropilosa* (formiga cortadeira) que ataca as plantações de eucalipto, pinus, entre outras.

O controle destas pragas torna-se essencial para melhor produtividade das áreas cultivadas, o mesmo deve ser eficaz, porém com o menor dano possível ao meio ambiente e a fauna presente próxima ao local, com esse objetivo, é conveniente utilizar métodos alternativos de manejo integrado envolvendo substâncias naturais ou baseados nas mesmas (produtos sintéticos).

Diversos extratos de plantas, produtos naturais e compostos sintéticos já foram registrados possuindo atividade inseticida. Para o Gorgulho-do-Milho, os extratos hexânicos e diclorometânicos de sementes de *Annona mucosa*³; extratos etanólicos de *Annona montana*, *Annona mucosa*, *Annona muricata* e *Annona sylvatica*⁴; extratos hexânicos e diclorometânicos de *Annona montana*⁵; extratos butanólicos e aquosos *Dracaena arborea*⁶; extrato salínico de folhas de *Schinus terebinthifolius*⁷; os monoterpenos 1,8-cineol, 4-terpineol e α -terpineol do óleo essencial de *Blumea balsamifera*⁸. Todos estes citados eficazes para o controle de insetos-pragas.

Para a lagarta-do-cartucho, o limonóide Febrifugina A⁹; o extrato metanólico das sementes de *Trichilia clausenii*¹⁰; o extrato diclorometânico das folhas de *Cedrela fissilis* e metanólico de folhas de *Cipadessa fruticosa*¹¹; os extratos

hexânico e metanólico de folhas e o extrato hexânico de ramos de *Trichilia clausenii*¹²; extratos metanólicos de folhas de *Jatropha curcas*¹³; os extratos hexânico e metanólico de frutos de *Trichilia elegans*¹⁴; o triterpenóide ocotilona, os limonóides metil-angolensate, 7-deacetoxy-7-oxogedunin e β -photogedunin, isolados da *Cabralea canjerana* e *Carapa guianensis*¹⁵; extratos polares de *Siphoneugena densiflora* e hexânicos de *Vitex polygama*¹⁶; o flavonóide astilbina isolado da *Dimorphandra mollis* também possui atividade inseticida¹⁷.

Estudos estabelecem a ação de extratos de *Azadirachta indica* contidos em nanopartículas no controle de *Plutella xylostella*¹⁸; ginsenosídeos (sapogeninas) de hastes e folhas *Panax ginseng*¹⁹; compostos derivados do limonoíde fraxinelona, produto natural comumente encontrado em plantas pertencentes as famílias Meliaceae e Rutaceae²⁰; substâncias sintéticas baseadas no alcalóide nortopsentina isolado da esponja do mar (*Spongisorites ruetzleri*)²¹; os monoterpenos linalol e timol, isolados do óleo essencial de *Thymus vulgaris* e *Lavandula angustifolia*, respectivamente, obtiveram atividade inseticida sobre *Plutella xylostella*²².

Estudos de extratos, compostos naturais e sintéticos baseados nos mesmos que afetam diretamente a população de formigas são bem explorados. Atualmente, o controle de pragas no Brasil se dá pelo uso de agrotóxicos como o fipronil (1), metaflumizona da BASF (2) e sulfluramida (3) (FIGURA 1.1), este último é utilizado para as formigas e é potencialmente tóxico, por este motivo no estado do Rio Grande do Sul inseticidas à base deste composto estão proibidos para comercialização desde 2018²³. Na Europa, órgãos regulamentadores da União Européia proibiram o uso do inseticida fipronil.

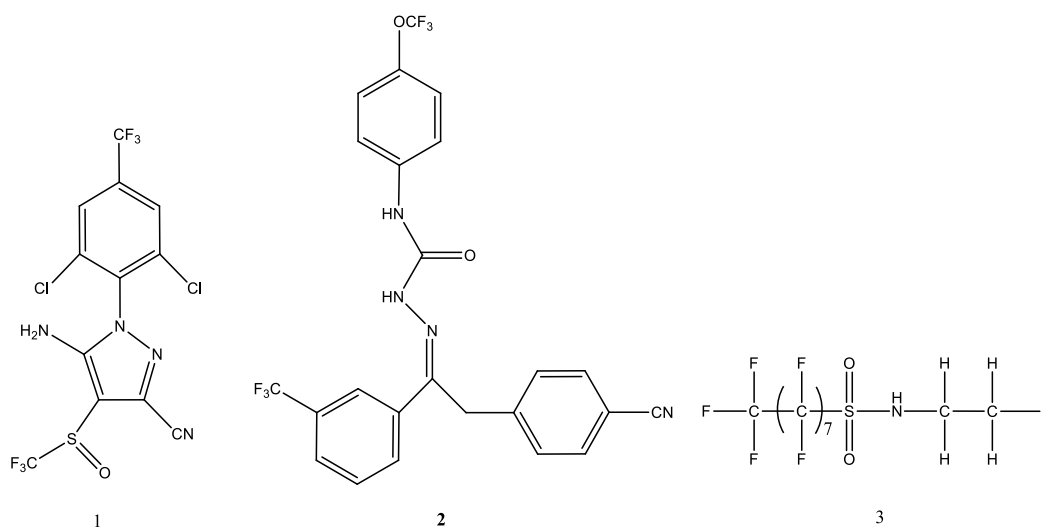


FIGURA 1.1- Compostos utilizados como inseticidas no Brasil: (1) Fipronil, (2) metaflumizona e (3) sulfluramida.

Vários estudos de produtos naturais com atividade contra a formiga cortadeira (FIGURA 1.2) já foram reportados, como 2-fenil-1-metilquinolin-4-ona (um alcalóide furoquinólico) e limonina (limonóide) isolados de *Spiranthera odoratissima*²⁴; os sesquiterpenos elemol e β -eudesmol²⁵; o alcalóides ricinina (4)²⁶ e 5-metóxicantin-6-ona²⁷; o limonóide ácido limonéxico (5) isolado de *Raulinoa echinata*²⁸; o triterpeno ácido oleanólico, os limonóides mexicanolídeos cipadesina A, cipadesina B, cipadesina, ruageanina, khayasin T, februgina, mexicanolídeo e swietemahonolide²⁹, todos isolados de *Cipadessa fruticosa*; o ácido antranílico (6), os flavonóides furoquinólicos dictamina e kokusaginina isolados de *Helietta puberula*³⁰.

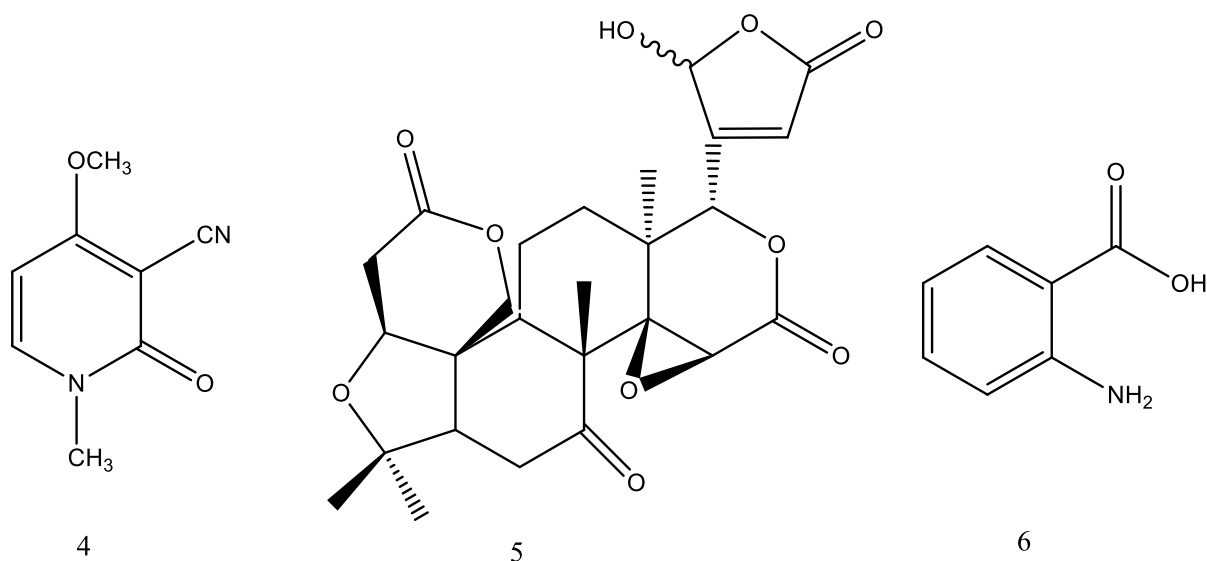


FIGURA 1.2- Produtos naturais com atividade inseticida: (4) ricinina, (5) ácido limonéxico e (6) ácido antranílico.

Outros estudos reportam atividades de substâncias sintéticas para o controle de formigas (FIGURA 1.3), pode-se citar ácidos graxos saturados de cadeias de carbono C₅ a C₉³¹; compostos baseados nas amidas N-pirrolidina-3-(4,5-metilenodioxifenil)-2-(E)-propenamida e N-piperidina-3-(4,5-metilenodioxifenil)-2-(E)-propenamida de *Piper piresii*³²; sintéticos derivados de butóxido de piperonila (lignana)³³.

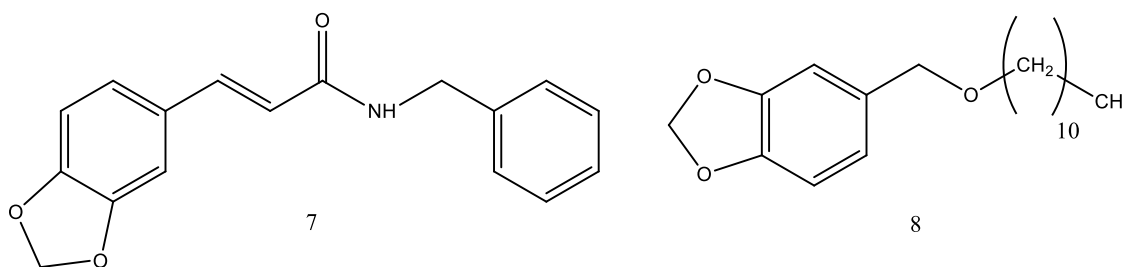


FIGURA 1.3- Compostos sintéticos com atividade inseticida: (7) benzilamina-3-(4,5-metilenodioxifenil)-2-(E)-propanamida e (8) 1-(3,4-metilenodioxifenil)-dodecano.

1.2 Acetilcolinesterase

Classificada dentro do grupo das enzimas hidrolases, enzimas que com participação de molécula de água provocam cisão de ligações covalentes, a acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina (ACh), juntamente com a butirilcolinesterase (BuChE), ambas as enzimas são nomeadas ainda “colinesterases”, tendo como diferenças entre as mesmas a distribuição nos tecidos, as cinéticas das reações e as especificidades com os substratos³⁴ (FIGURA 1.4).

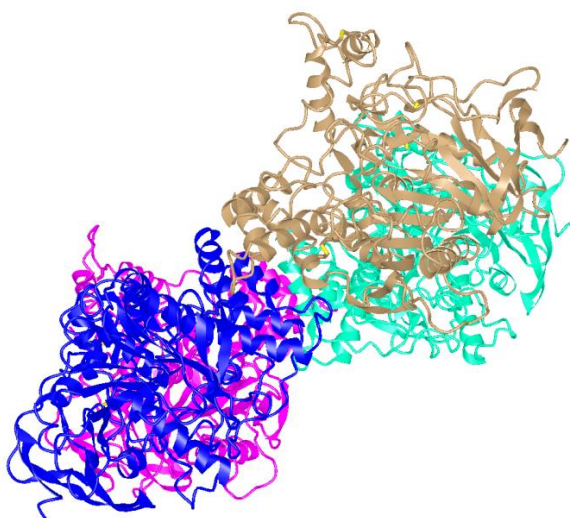


FIGURA 1.4- A resolução tridimensional da AChE de *Electrophorus electricus* dos estudos de Bourne e colaboradores³⁵.

No corpo humano, dentro do sistema colinérgico que compõe boa parte do sistema nervoso autônomo, ocorre a degradação do neurotransmissor ACh, especificamente nas fendas sinápticas. Armazenada em vesículas, a ACh somente se encaminha à fenda sináptica quando há estímulos para transmitir por sinapses a informação. Depois de propagada a mensagem, a ACh desliga-se do receptor pós-sináptico e retorna a fenda onde a AChE catalisará sua hidrólise, formando colina e

ácido acético. A colina produzida após a degradação do neurotransmissor irá reagir com acetilcoenzima A para a formação de uma nova molécula de acetilcolina, reação catalisada pela enzima colina acetiltransferase.

Cada monômero da enzima possui um centro catalítico (FIGURA 1.5) que contém duas áreas: o subsítio catalítico onde fica contida a tríade catalítica e o subsítio aniônico que interage eletrostaticamente com a estrutura quaternária positiva da acetilcolina³⁶. O subsítio catalítico contém os aminoácidos catalíticos da enzima: a Ser 199, Glu 330 e His 443; Já o subsítio aniônico atua orientando a entrada do substrato, sendo o maior responsável por esta orientação o Trp, através da parte carregada do mesmo, no centro catalítico³⁷. Há ainda outras duas regiões que atuam para a catálise do substrato; o sítio periférico, localizado na entrada da fenda catalítica que liga acetilcolina como o primeiro passo da via catalítica e modula alostericamente a catálise, bem como compostos inibidores específicos de ligação³⁸; e a fenda hidrofóbica, uma região próxima ao sítio catalítico que se liga a substratos cíclicos, como grupos arilas³⁷.

O centro catalítico da AChE é uma cavidade longa e estreita que mede 20 Å de profundidade³⁹, e aproximadamente 40% da superfície é composta por 14 resíduos aromáticos⁴⁰, o que permitirá maior interação entre a proteína e o substrato por meio de efeitos estéricos e hidrofóbicos, aumentando a estabilidade do complexo enzima-susbtrato⁴¹.

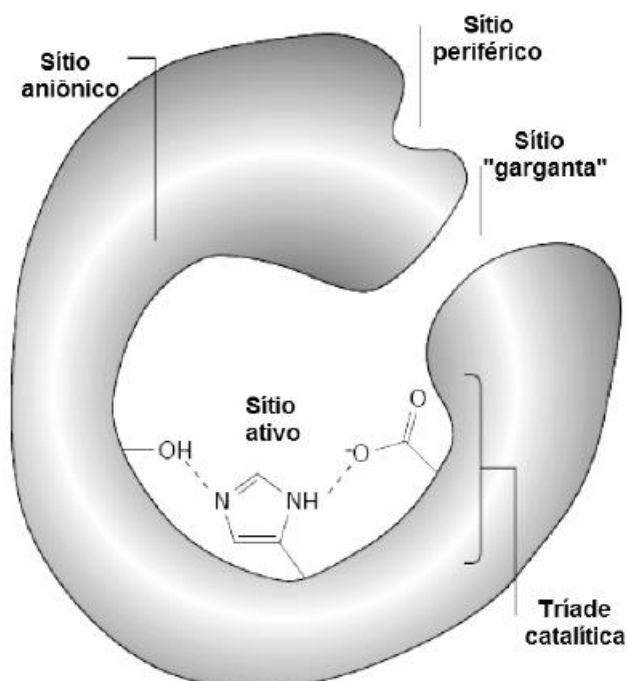


FIGURA 1.5- Centro catalítico da AChE⁴¹.

Após entrada do substrato no centro catalítico e devida orientação de resíduos de aminoácidos como Glu e Trp do subsítio aniônico, a ACh será hidrolisada pelos resíduos de Ser e His. A carga positiva da estrutura quaternária do nitrogênio da ACh tem interação iônica com o resíduo de Glu e a primeira parte da reação acontecerá no grupo éster da ACh. O carbono do grupo carbonila pertencente ao substrato sofre ataque nucleofílico do par de elétrons livres do átomo de oxigênio do resíduo de Ser, formando um intermediário onde o oxigênio do aminoácido fica com carga parcial positiva. O nitrogênio da His atua nesta etapa como base de Lewis, doando par de elétrons para capturar o hidrogênio que está ligado ao átomo de oxigênio da Ser, tornando sua carga positiva e estabilizando a carga do oxigênio. Para a saída do éster intermediário, a His realiza catálise ácida, doando o próton de hidrogênio para assim liberar o produto desta primeira etapa de reação: a colina que, como explicado anteriormente, será reagente para a síntese de uma nova molécula de ACh. Na segunda parte da reação, o grupo acetila, formado após a saída da colina, sofre ataque nucleofílico dos pares de elétrons livres do oxigênio de uma molécula de água, deixando o mesmo com carga parcial positiva. Mais uma vez a His atua como base capturando o hidrogênio da água. Após a estabilização de cargas a His realiza outra catálise ácida, desta vez para recuperar o grupo hidroxila da Ser e provocar a saída de ácido etanoico (acético). Após a saída do ácido do centro catalítico a enzima está preparada para outro ciclo catalítico (FIGURA 1.6).^{34,41,42}

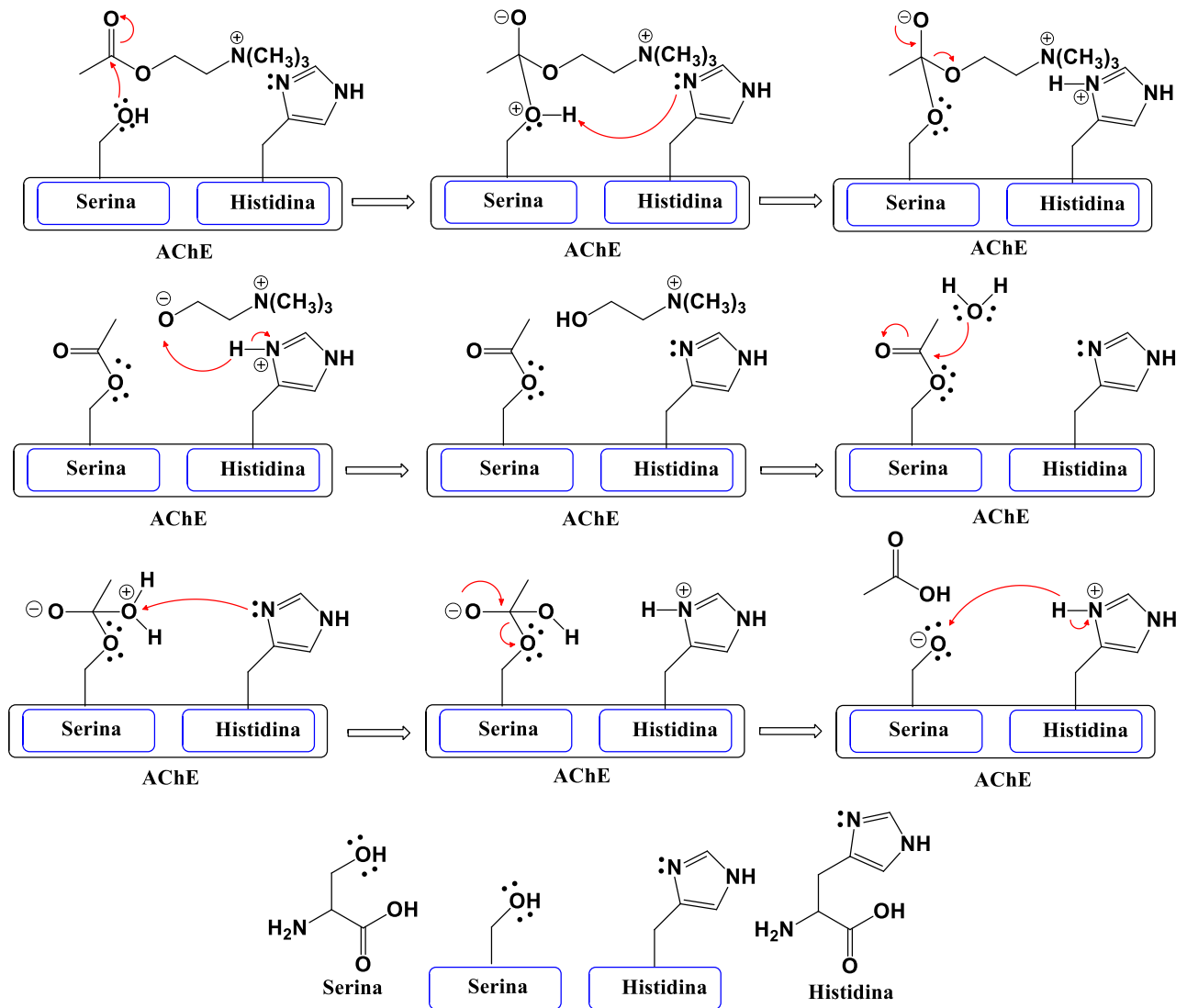


FIGURA 1.6- Hidrólise de ACh no centro catalítico de AChE. Adaptado³⁴.

1.2.1 Estudos com a acetilcolinesterase

A enzima acetilcolinesterase é alvo de muitos estudos para a determinação de compostos que possuam atividade inibitória sobre a mesma. Os focos destes estudos são a doença de Alzheimer, pois os baixos níveis de acetilcolina na fenda sináptica são associados a uma diminuição da função colinérgica. Os inibidores da AChE são, atualmente, uma das poucas terapias aprovadas para o tratamento da doença⁴³, bem como o estudo de substâncias como potenciais inseticidas, pois da mesma forma que a enzima é essencial para o funcionamento do sistema nervoso (SNC) em humanos, assim o é em insetos⁴⁴.

Cumarinas sintéticas já foram testadas sobre a acetilcolinesterase do peixe elétrico em *IMERs* (*Immobilized enzyme reactors*) acoplados diretamente ao espectrômetro de massas, obtendo atividade inibitória similar à tacrina, um flavonóide

com atividade sobre a AChE já estabelecida⁴⁵.

Em outro estudo, com a utilização da técnica *layer-by-layer*, ICERs (*immobilized capillary enzyme reactors*) baseado na AChE foram desenvolvidos para testes de extratos naturais, sendo o extrato de *Rhizoma coptidis* aquele com maior porcentagem de inibição, 84%⁴⁶.

Pelo método de Ellman, muito utilizado para testes de atividade com a acetilcolinesterase, o extrato bruto de *Myricaria elegans* obteve 74% de inibição frente a AChE⁴⁷.

O extrato de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu) obteve 40% de inibição utilizando o método de Ellman, sendo esta atividade atribuída a ácidos graxos presentes no extrato, constituído em ácido oleico (40.0%), esteárico (32.7%), eicosanóico (10.4%) e palmítico (8.0%)⁴⁸.

Antraquinonas isoladas de *Cassia obtusifolia*, crisofanol, obtusina, Aurantio-obtusina e aloe-emodina, apresentaram 68%, 82%, 92% e 71,8% de inibição respectivamente. Os ensaios foram realizados através do método de Ellman⁴⁹.

Um estudo com limonóides isolados de *Trichilia welwitschii*, utilizando o método Ellman, obtiveram 94%, 82% e 87% de atividade inibitória, sendo estes o trichilia lactona, rohituka 3 e dregeanina⁵⁰.

Monoterpenos também já foram testados pelo método de Ellman, com forte atividade contra a AChE, sendo estes, a fenchona, a s-carvona e o linalol⁵¹.

Utilizando CCD (Cromatografia de Camada Delgada), os extratos de *Galanthus nivalis*, *Leucojum vernum*, *Narcissus pseudonarcissus*, *Chelidonium majus*, *Ismene festalis*, *Nerine bowdenii* e *Crinum powellii*, tiveram atividade inibitória sobre a AChE⁵².

Esferas magnéticas revestidas com a AChE foram utilizadas em ICERs para o teste de atividade do extrato de *Melodinus fusiformis*, obtendo 76% de inibição de atividade da enzima⁴³.

Flavonóides derivados também mostraram atividade inibitória em ensaios com a AChE, com inibição mais forte comparado a galantamina e tancrina, compostos com atividade estabelecida na literatura⁵³.

1.3 Biossensores

Nas últimas duas décadas, a necessidade de ferramentas analíticas de baixo custo, com resultados rápidos, de manuseio fácil e com a capacidade de fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre a composição de uma amostra

com o mínimo de pré-tratamento causou o crescimento significativo à pesquisa na área de biossensores.⁵⁴

Os biossensores são definidos como dispositivos analíticos que incorporam um elemento biológico (enzima, anticorpo, organelas, DNA, microrganismos e etc) a um suporte, que é integrado a um transdutor de sinal físico-químico⁵⁵. O elemento de transdução de sinal converte a resposta bioquímica em padrão físico, resultado da seleta interação entre o elemento biológico e o analito.

De acordo com o mecanismo de reconhecimento do analito os biossensores podem ser classificados como eletroquímico, piezelétrico, térmico ou óptico. Se o biossensor é eletroquímico, quando o transdutor é um eletrodo, a técnica para a leitura do sinal físico pode ser voltamétrica, potenciométrica, amperométrica, condumétrica ou impedimétrica⁵⁶.

A AChE é amplamente utilizada como um potente elemento na construção de biossensores para a detecção de pesticidas. A principal motivação para projetar biossensores de colinesterases para monitoramento de toxicidade é fornecer uma alternativa confiável para os métodos clássicos usados atualmente em química analítica laboratoriais (cromatografia e cromatografia acoplada: GC-MS, HPLC-MS). Tais técnicas são ferramentas aptas para monitorar analitos tóxicos como pesticidas e metais pesados, porém de alto custo, processo demorado (a preparação para a amostra, por exemplo), não são adaptados para detecção *in situ* e em tempo real e exigem pessoal treinado.⁵⁵

Os biossensores de AChE podem ser aplicados em estudos de inibição. A princípio a enzima degrada, por exemplo, o substrato iodeto de acetiltocolina (ASChI) em tiocolina e ácido acético, quando não há algum analito presente em solução. A escolha pelo substrato ASChI se dá pela propriedade eletroativa do produto tiocolina, logo que a mesma é oxidada pelo potencial aplicado (FIGURA 1.7). Na presença de um inibidor, a conversão de acetiltocolina é diminuída ou mesmo nula. Além disso, a corrente de oxidação anódica é inversamente proporcional à concentração de inibidores nas amostras e também ao tempo exposto.⁵⁷

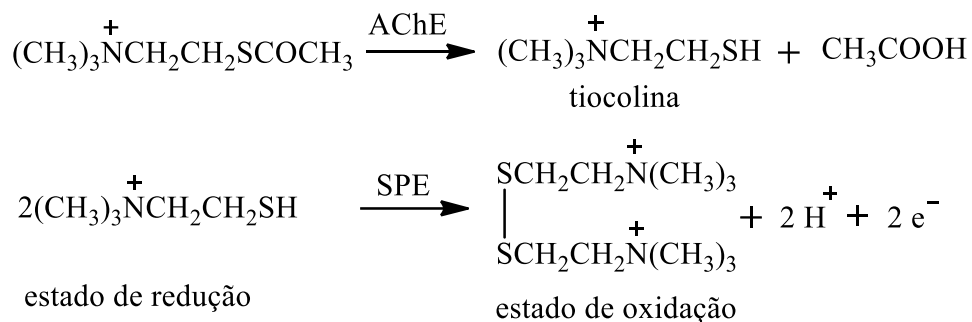


FIGURA 1.7- Processo de oxi-redu\c{c}\~ao do substrato ASChI.

1.3.1 Tipos de imobiliza\c{c}\~ao

Para o desenvolvimento de um biossensor enzim\c{a}tico aplic\c{a}vel, a incorpora\c{c}\~ao da enzima na superf\c{i}cie do eletrodo de trabalho \c{e} a etapa mais importante. Este processo \c{e} direcionado atrav\c{e}s de v\c{a}rias intera\c{c}\~oes entre a enzima e o material do eletrodo e afeta fortemente o desempenho do biossensor em termos de sensibilidade, estabilidade, tempo de resposta e reproduzibilidade⁵⁷. H\c{a} uma variedade de m\c{e}todos pelos quais as enzimas podem ser imobilizadas, variando de adsor\c{c}\~ao f\c{is}ica, confinamento \c{a} liga\c{c}\~ao qu\c{im}ica covalente. Os processos de imobiliza\c{c}\~ao enzim\c{a}tica (para a AChE) mais usados s\c{a}o:

Adsor\c{c}\~ao f\c{is}ica: Consiste na deposi\c{c}\~ao simples de AChE na superf\c{i}cie do eletrodo de trabalho e na fixa\c{c}\~ao da AChE atrav\c{e}s de liga\c{c}\~oes i\c{o}nicas, for\c{c}as de Van der Waals, pontes de hidrog\c{e}nio, hidrof\c{o}bicas ou intera\c{c}\~oes eletrost\c{a}ticas entre a AChE e o transdutor⁵⁸.

Liga\c{c}\~ao covalente: O acoplamento covalente da AChE \c{e} o procedimento mais utilizado⁵⁷. A enzima pode ser ligada covalentemente \c{a}s superf\c{i}cies do eletrodo atrav\c{e}s da forma\c{c}\~ao de uma liga\c{c}\~ao covalente est\c{a}vel entre os grupos funcionais n\c{a}o ativos da enzima, ou seja, que n\c{a}o contribuem diretamente para atividade catal\c{it}ica, e grupos reativos, tais como, hidroxila, carboxila e amina, que j\c{a} est\c{a}o ligados na superf\c{i}cie do transdutor⁵⁹.

Oclus\c{a}o em matriz de pol\c{i}mero: A enzima \c{e} confinada em espa\c{c}os intersticiais das liga\c{c}\~oes covalentes cruzadas de um pol\c{i}mero insol\c{u}vel, por exemplo, \c{a}gar e poli(acril\c{a}mida). A solu\c{c}\~ao da enzima \c{e} misturada com uma solu\c{c}\~ao de mon\c{o}meros em um tamp\c{a}o com o catalisador adequado para a polimeriza\c{c}\~ao. A estrutura formada n\c{a}o permite a difus\c{a}o das mol\c{e}culas grandes da enzima por ter espa\c{c}os intersticiais pequenos, por\c{e}m as mol\c{e}culas do substrato conseguem difundir-se livremente⁶⁰.

Monocamadas automontadas: Definidas como filmes de espessura monomolecular, sobre uma superfície, normalmente sólida, moléculas orgânicas se organizam espontaneamente. Utilizando superfícies limpas de ouro e funcionalizando estas com moléculas de alcanotióis, se obtém uma monocamada, logo que, o enxofre tem grande afinidade pelos átomos de ouro, os quais formam uma ligação forte (quimissorção/covalente) entre si. A partir de atrações eletrostáticas fracas geradas lateralmente entre as cadeias alquil, as cadeias carbônicas formadoras das moléculas se atraem e geram uma organização espontânea entre elas, estabilizando e orientando os átomos que as compõem, formando, ao fim do processo da organização ou reação química, um filme monomolecular⁶¹.

Testes analíticos para determinações de inibidores da acetilcolinesterase utilizam-se dos vários métodos de imobilização enzimática.

Para a determinação de compostos da classe carbamatos e organofosforados, um biossensor baseado na imobilização da AChE foi desenvolvido por matriz polimérica, utilizando PVA (álcool polivinílico) com grupos piridínicos⁶².

Em outro trabalho, o biossensor foi construído também utilizando a imobilização por *crosslinking*, com o uso do polímero poliacrilamida para a determinação de inibição enzimática, através composto organofosforado Diclorvós, sendo as medidas realizadas com um eletrodo de pH⁶³.

Nanotubos de carbono com paredes múltiplas em uma solução com o polímero glutaraldeído e a AChE, constituíram um sistema de imobilização enzimática por *crosslinking* em eletrodo de platina com boa estabilidade, comparado a outros métodos testados no mesmo trabalho⁶⁴.

Eletrodos de platina foram modificados utilizando uma membrana polimérica de poliacrilonitrila (PAN) modificada com AUNPs, a acetilcolinesterase foi imobilizada por ligação covalente entre os grupos carboxílicos presentes AUNPs e as aminas presentes nos aminoácidos da enzima, através da reação com o reagente EDC⁶⁵.

Biossensores com microtubos de carbono envolvidos com o oligonucleotídeo de fita única terminada com tiol (ssDNA) que por processo de auto-montagem ficam depositados sobre eletrodos de ouro, que ainda contam com a presença de polianilina eletroquimicamente polimerizada e a enzima AChE imobilizada através de ligação covalente com o glutaraldeído, foram desenvolvidos para a determinação dos pesticidas clorpirifós e metil paration⁶⁶.

Eletrodos de carbono vítreo foram modificados com os polímeros de polipirrol e polianilina dopados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas, desta maneira imobilizando a AChE por adsorção, para o estudo de inibição pelo inseticida Malation⁶⁷.

Com etapas de: adição do polímero (3-aminopropil) trietoxisilano (APS), eletrodeposição de nanopartículas de ouro e platina, novamente adição de APS e a deposição de solução AChE-glutaraldeído (caracterizando imobilização do tipo *crosslinking*), eletrodos de carbono vítreo foram modificados para a determinação de paraoxon, sarin e aldicarbe⁶⁸.

1.3.2 Eletrodos descartáveis

O desenvolvimento de eletrodos descartáveis se apresentou nas últimas décadas como alternativa diante do principal viés para eletrodos sólidos, a regeneração da superfície⁶⁹. Por ser um processo de tratamento físico, eletroquímico e manual, estes eletrodos tornaram-se inapropriados para uso comercial, logo os descartáveis eliminariam a necessidade de regeneração da superfície. As vantagens destes também são, fácil construção, baixo custo, boa reprodutibilidade, e ainda podem ser produzidos em larga escala.

As principais técnicas para a construção de eletrodos descartáveis são: *silkscreen* ou serigrafia (*screen-printing*), impressão por jato de tinta, placas de circuito impresso recobertas com cobre e a técnica de transferência por estampagem (*stamped transfer electrodes - STEs*)⁷⁰.

1.3.2.1 Eletrodos Impressos (SPE)

SPE (sigla da definição em inglês *Screen-Printed Electrode*) é processado em um filme depositado sobre suporte inerte, com o uso de ferramenta que auxilia a tinta condutora tixotrópica a tomar molde através de uma tela de malha que define a geometria do eletrodo, exigindo tratamento térmico para cura e adesão da tinta⁶⁹ (FIGURA 1.8). A tinta ainda é parcialmente coberta por uma segunda camada de um isolante para definir uma área de contato elétrico numa extremidade e outra área para ser a superfície do eletrodo na outra extremidade.

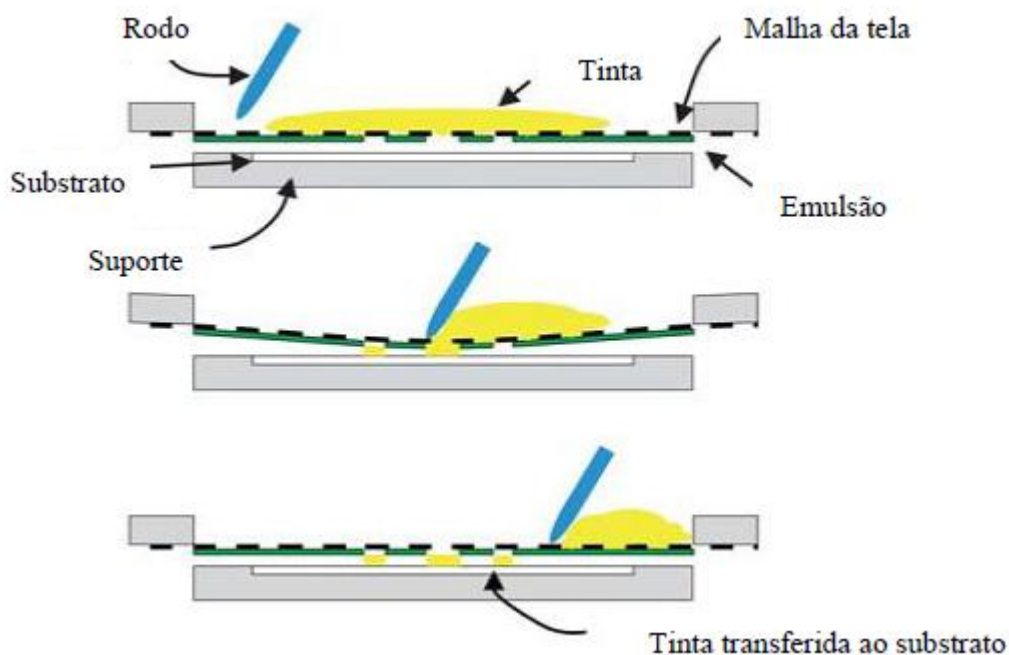


FIGURA 1.8- Representação esquemática da preparação de SPEs⁷⁰.

Trabalhar com microvolumes, a fácil preparação, excelente especificidade, seletividade e a modificação são vantagens dos SPEs em relação aos eletrodos convencionais. Os SPEs ainda possuem outras vantagens importantes, como a eliminação de efeitos de memória na análise em níveis de traços e têm aplicabilidade para determinações *in situ*⁵⁶. Destas vantagens citadas talvez a mais importante seja seu grande número de possíveis modificações. De fato, a composição das tintas usadas no processo de impressão pode ser modificada pela adição de substâncias de natureza muito diferente, como metais, enzimas, polímeros e agentes complexantes.

As modificações de SPEs são focos de vários estudos para a busca de melhor estabilidade, seletividade e sensibilidade nas técnicas utilizadas para imobilização da AChE.

Aplicando solução sol-gel de Al_2O_3 para o método de imobilização enzimática por adsorção, SPEs foram modificados para o estudos de inibição da AChE em sistema de injeção de fluxo por compostos organofosforados⁷¹.

Com o intuito de imobilizar a enzima por oclusão em matriz, SPEs foram modificados utilizando grafite de TCNQ (tetracianoquinodimetano) modificada com hidroxietilcelulose (HEC), que depois de adicionado em uma solução com a AChE, foram misturados com uma solução composta por Metiltrimetoxissilano (MTMOS) e ortossilicato de tetrametil (OSTM). O estudo de inibição foi realizado com compostos carbamatos⁷².

Em outro estudo com SPEs, uma simples adsorção da solução enzimática foi realizada sobre a pasta de carbono contendo o mediador TCNQ, que segundo os autores, permitiu realizar a oxidação eletroquímica do produto da reação (tiocolina), foi desenvolvida para a determinação do composto Clorpirifós⁷³.

SPEs foram modificados para a determinação do carbofurano, incorporando na tinta de carbono ftalocianina de cobalto (II) (CoPC), um mediador para a detecção de moléculas contendo o grupo tiol. A imobilização da enzima foi realizada pela mistura da solução enzimática com glutaraldeído, caracterizando assim a técnica *crosslinking*⁷⁴.

Biossensores também já foram desenvolvidos com apenas uma etapa de modificação, depositando sobre o eletrodo de trabalho uma solução contendo microtubos de carbono e CoPC, com a imobilização da AchE por ligação covalente através da reação EDC-NHS. Os testes de inibição determinaram a atividade dos organofosforados paraoxon e malaoxon⁷⁵.

Através do uso de grafite-epóxi depositado em faixas de cobre sobre fibras de vidros, SPEs foram construídos para testes de inibição do carbofurano e paraoxon sobre a acetilcolinesterase imobilizada por *crosslinking* através do uso de glutaraldeído⁷⁶.

2 OBJETIVO

Desenvolver biossensor eletroquímico baseado na enzima acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (peixe-elétrico) por meio da modificação de eletrodos impressos (SPEs) descartáveis, utilizando a técnica *layer-by-layer* e imobilização da enzima por ligação covalente, bem como avaliar a inibição da AChE por meio do composto natural Azadiractina e extratos orgânicos de plantas para potencial atividade inseticida.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais utilizados

a) Materiais para a construção de eletrodos:

- Folha de Vinil
- Pasta de carbono Electrodag da Henkel
- Tinta de Ag/AgCl da SunChemical
- Folha de poliéster

b) Materiais e reagentes para a modificação de eletrodos:

- Água ultrapura Sistema Milli-Q®
- Cloreto de polidialildimetilamônio (PDDA) da Sigma-Aldrich
- Nanopartículas de ouro decoradas com glutatona (AuNPs-GSH) concedidas pelo Laboratório de Bioanalítica e Eletroanalítica

- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) da Sigma-Aldrich

- Hidroxibenzotriazol (HOBt) da Sigma-Aldrich

- Tampão ácido 2-etanossulfônico (MES) da Sigma-Aldrich

- Enzima acetilcolinesterase *Electrophorus electricus* da Sigma-Aldrich

c) Materiais para a inibição da AChE sobre os SPEs:

- Azadiractina concedida pelo Laboratório de Produtos Naturais

- Extrato bruto metanólico de folhas de *Picramnia riedelli*

- Extrato bruto etanólico de folhas de *Picramnia ciliata*

- Extrato bruto hexânico de folhas de *Toona ciliata*

- Álcool Etílico Absoluto da Synth

d) Reagentes para as medidas eletroquímicas:

- Tampão Fosfato salínico

- Iodeto de acetilticolina da Sigma-Aldrich

e) Material e solvente utilizado para o teste de RMN de ^1H :

- Extrato bruto metanólico de folhas de *Picramnia riedelli*

- Extrato bruto etanólico de folhas de *Picramnia ciliata*

- Extrato bruto hexânico de folhas de *Toona ciliata*
- Solvente Clorofórmio-Deuterado (CDCl_3) da Sigma-Aldrich

3.2 Equipamentos utilizados

- a) pHmetro da Digimed DM 20
- b) Banho de ultrassom
 - UltraCleaner 1400 Unique
- c) Estufa para cura da tinta
 - Nova Ética
- d) Testes voltamétricos
 - Multipotenciostato Dropsens da Metrohm
 - Software Dropsens
- e) Construção de eletrodos
 - Impressora de recorte Silhouette CAMEO
 - Software Silhouette Studio V3
- f) Para o teste de RMN de ^1H :
 - Espectrômetro BRUKER DRX 400 MHz (9,4 T)

3.3 Construção dos eletrodos descartáveis

O método *screen-printing*, ou serigrafia, foi utilizado para a construção dos eletrodos.

Os desenhos para os eletrodos foram desenvolvidos pelo software Silhouette Studio V3. Uma folha adesiva de vinil foi recortada no formato desenhado para os eletrodos por uma impressora de recorte. Após o recorte a folha de vinil foi transferida para uma folha de poliéster com o auxílio de um adesivo transferidor, após aderir o vinil ao poliéster, o adesivo foi removido. Então, com um rodo, a tinta de carbono foi dispersa sobre o vinil recortado. Para a cura da tinta, os eletrodos foram mantidos em estufa à 90°C por um tempo de 30 minutos. Em seguida, na área do eletrodo de referência, foi aplicada com o auxílio de um pincel, tinta de cloreto de prata, e os eletrodos foram mantidos mais uma vez em estufa, à 60°C por 30 minutos. Antes de cada experimento, a área de delimitação para o contato elétrico e a superfície do eletrodo é definida com um recorte de folha de vinil (FIGURA 3.1).

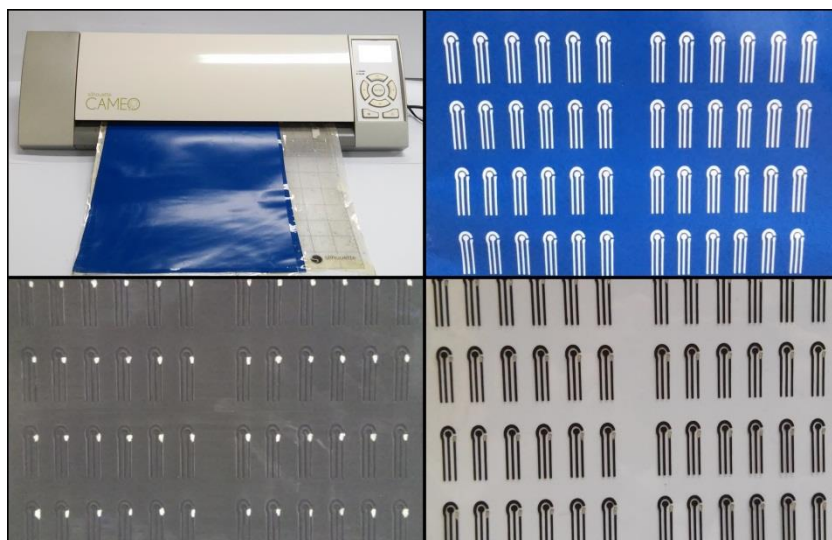


FIGURA 3.2- Etapas da construção de SPEs. Acima à esquerda: impressora de corte. Acima à direita: Vinil cortado conforme o desenho de eletrodos. Abaixo à esquerda: SPEs com tinta de carbono e de prata. Abaixo à direita: Eletrodos prontos para medições eletroquímicas.

3.4 Preparo de soluções

As soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas com água ultrapura obtida em sistema Milli-Q.

A solução de PPDA foi preparada a partir de 3 mg de NaCl solubilizados em 0,9 mL de água ultrapura somados a 0,1 mL de PDDA.

Foi preparado tampão MES $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ com pH 6,0 para o preparo da solução EDC-HOBt.

Para o preparo da solução EDC-HOBt primeiro solubilizou-se o HOBt em tampão MES, então ajustou-se o pH desta solução com NaOH 1 mol.L^{-1} obtendo-se uma concentração final de $6,9 \times 10^{-5} \text{ mol.mL}^{-1}$ e em sequência dissolveu-se o EDC nesta solução para um valor de $3,75 \times 10^{-4} \text{ mol.mL}^{-1}$ de concentração.

Para a solução de AchE, solubilizou-se a enzima em tampão TRIS-HCl $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,5, e em alíquotas a solução foi armazenada em um congelador à aproximadamente -10°C . A solução de ASChI não foi armazenada, sempre preparou-se no dia dos testes a serem realizados, a mesma foi preparada em tampão fosfato salínico $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ em pH 7,4.

Para as medidas eletroquímicas foi preparado o tampão fosfato salínico na concentração de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ em pH 7,4.

Para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H , 10 mg de cada extrato foram solubilizados em 0,6 mL de CDCl_3 .

3.5 Síntese de nanopartículas de ouro

Para a síntese das nanopartículas de ouro decoradas com glutathione, foram pesados 0,079 g de ácido cloroáurico com espátula de plástico e 0,0308 g de L-glutathione reduzida e adicionados a um béquer, com 2 mL de ácido acético e 12 mL de metanol, resultando em uma solução de cor amarelo claro. Uma solução $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de borohidreto de sódio foi preparada e adicionados 6 mL desta à anterior sob rápida agitação, durante 2 horas. A solução resultante foi filtrada em membrana de filtração molecular de 50 kDa (previamente lavada com hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) e centrifugada a 3500 rpm. O precipitado foi lavado quatro vezes com água ultrapura durante a centrifugação e dissolvido em tampão HEPES [(N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)] $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 8,0. O volume final de AuNP-GSH foi de 15 mL. A dispersão foi estocada a 4°C .⁷⁰

3.6 Imobilização da acetilcolinesterase sobre os eletrodos de trabalho

Para a etapa de imobilização da AChE em SPE, foi necessária modificação da superfície do eletrodo de trabalho, primeiro adicionando 10 μL da solução de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDDA) e deixando a mesma sobre o eletrodo de trabalho durante 20 minutos. Em seguida, após retirada de excesso, foram adicionados 1 μL de $2,37 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ da dispersão de nanopartículas de ouro decoradas com glutathione (AuNP-GSH, síntese detalhada na sessão 3.5) que por 20 minutos agiu sobre o eletrodo. Estas duas etapas de adição ao eletrodo, a solução de PDDA, um polycation, com as AuNP-GSH, aniônicas, caracterizam o método de *layer-by-layer* de modificação dos eletrodos. Após nova secagem à temperatura ambiente, 10 μL de solução de EDC-HOBt, foram adicionados ao eletrodo onde permaneceram por 10 minutos. Esta etapa é crucial para a fixação da enzima no SPE, pois o EDC ativa os grupos carboxilas presentes nas AuNPs, que pertencem a glutathione, para posterior reação de amidização com grupos amins presentes em aminoácidos da enzima. O HOBt gera um reagente intermediário mais estável, levando à formação de uma amida, além de reagir com um maior número de aminoácidos comparado a outros reagentes como, por exemplo, o NHS^{77,78} (FIGURA

3.2). Após os 10 minutos de reação da solução EDC-HOBt, os eletrodos foram lavados com água ultrapura e adicionou-se 10 μL da solução de AChE e os mesmos foram mantidos em placa de petri emudecida por 120 minutos. Para evitar reações inespecíficas, foram acrescentados 10 μL de solução de Etanolamina, com o intuito de bloquear os sítios ativos que não reagiram com a enzima, que permaneceram sobre os eletrodos de trabalho por 1 hora. Para a lavagem, utilizou-se tampão PBS pH 7,4 com 0,05% de TW20.

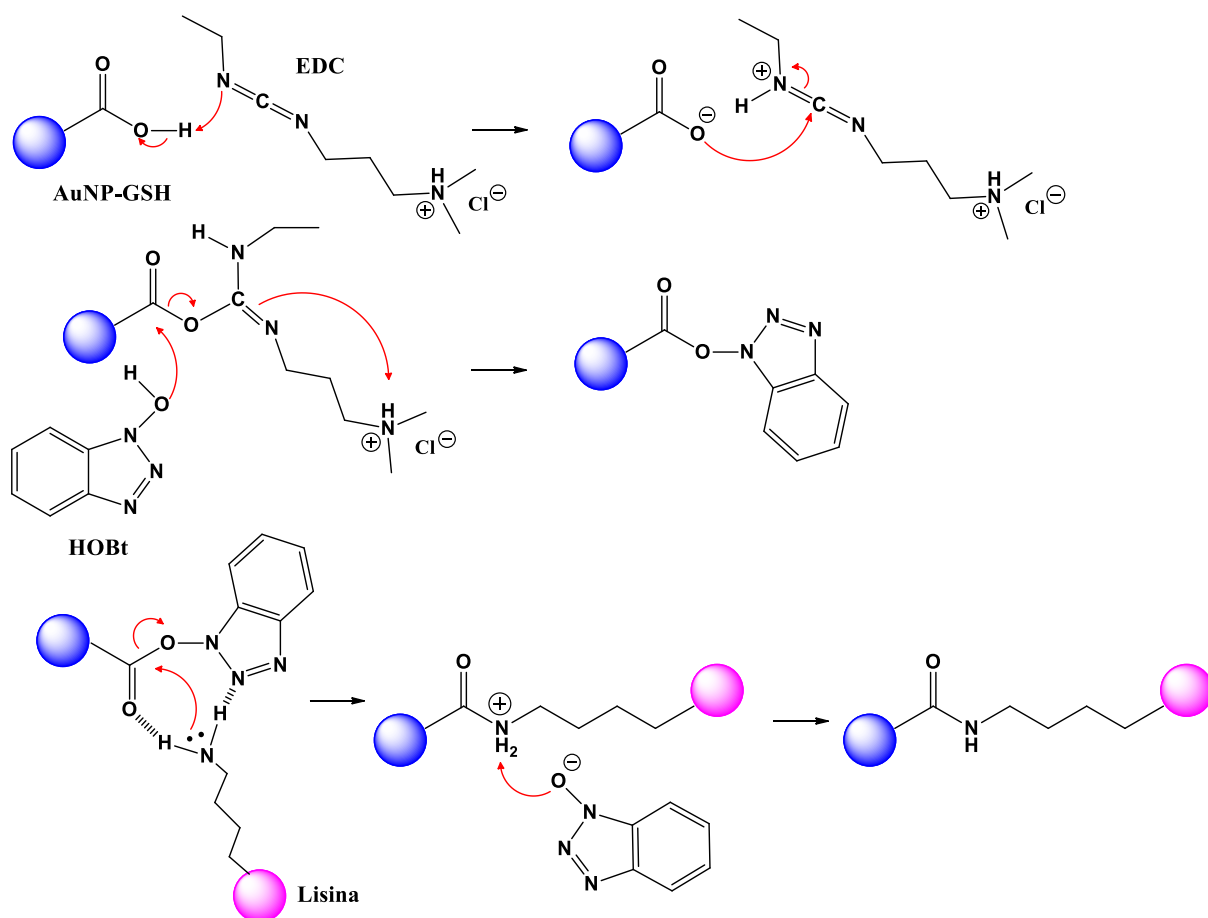


FIGURA 3.3- Reação EDC-HOBt para ativação do grupo carboxílico das AuNPs e reação com grupo amina de um aminoácido presente na enzima.

3.7 Otimização dos parâmetros eletródicos

Para verificar a funcionalidade e as respostas eletroquímicas dos SPEs, 50 μL de solução de ácido Ferrocenomonocarboxílico 1 mmol.L^{-1} em Cloreto de Potássio 0,5 mol.L^{-1} foram depositados sobre os eletrodos e as medidas foram realizadas para eletrodos sem e com modificação por Voltametria Cíclica em diferentes velocidades de varredura de potencial com intervalo de potencial de 0 à 0,6 V.

Leituras em diferentes etapas de modificação dos microeletrodos também foram realizadas por Voltametria Cíclica em 50 μL de solução de ácido Ferrocenomonocarboxílico 1 mmol.L^{-1} , com velocidade de varredura de potencial de 100 mV.s^{-1} .

Para o estudo de variação de concentração de substrato, utilizou-se SWV, a concentração enzimática utilizada foi de $1,25 \times 10^{-1} \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão TRIS-HCl $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,4, em 50 μL de solução de ASChI em concentrações de $5,88 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $1,17 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$; $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$; $10 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ e $53,45 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. Todas as concentrações em tampão fosfato $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,4. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.

A avaliação do efeito da concentração da enzima na resposta eletroquímica foi realizada por Voltametria de onda quadrada, utilizando as seguintes concentrações: $1,25 \times 10^{-2}$, $2,5 \times 10^{-2}$; 5×10^{-2} ; $7,5 \times 10^{-2}$; 1×10^{-1} e $1,25 \times 10^{-1} \text{ mg.mL}^{-1}$. Testes realizados em 50 μL de solução de ASChI $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,4. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.

Para o efeito da variação de pH na resposta da corrente do sistema eletroquímico, as faixas de pH avaliadas foram: 6,0; 6,5; 7,0; 7,4 e 8,0. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.

3.8 Determinação da atividade inibitória

As medidas voltamétricas, com tempo de análise de 10 minutos, foram realizadas em 50 μL de solução de ASChI $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato, pH 7,4.

3.8.1 Tempo de incubação

Para os testes posteriores, primeiro definiu-se o tempo de incubação dos biossensores nas soluções de azadiractina e dos extratos brutos de *Picramnia* e *Toona*. Os tempos em que as soluções agiram sobre os SPEs, foram de 1, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos. Após a incubação os mesmos foram lavados com PBS-TW20 e inseridos no potenciostato para as medições eletroquímicas. Concentração das soluções= $7,2 \text{ mg.L}^{-1}$.

3.8.2 Avaliação da atividade inibitória em função da concentração

Escolhido o tempo de incubação para cada solução testada, os eletrodos foram incubados nas seguintes concentrações 0,72 mg.L⁻¹; 1,4 mg.L⁻¹; 2,8 mg.L⁻¹; 4,3 mg.L⁻¹ e 5,7 mg.L⁻¹, após o tempo demarcado, os mesmos foram lavados com PBS-TW20 e conectados no potenciostato para as medições eletroquímicas. As curvas analíticas foram então construídas através do processo de inibição enzimática, calculando a porcentagem de inibição (% I) em função da variação das soluções de azadiractina e extratos brutos. O cálculo de inibição foi realizado utilizando a Equação 1 com as correntes obtidas após o tempo de 10 minutos de análise:

$$\% I = \frac{I_0 - I_1}{I_0} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Sendo I_0 e I_1 as correntes medidas antes e após a inibição.

3.9 Ensaio de inibição do crescimento micelial de *Leucoagaricus gongylophorus*

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Produtos pela MSc. Dorai Periotto. O protocolo para realização do ensaio consiste em incorporar os extratos a serem testados no meio de cultura em que será feito o cultivo do microrganismo simbiote⁷⁹. O meio de cultura foi preparado usando extrato de malte, (20 g/L), bacto-peptona (5 g/L), extrato de levedura (2 g/L) e agar (20 g/L). A adição das soluções dos extratos previamente preparados no meio de cultura foi feita após a transferência de 10 mL de meio a placas de Petri pequenas (80 × 15 mm). Depois de solidificados, plugs de 9 mm de diâmetro do fungo foram inoculados no centro da placa. Controles negativos (apenas meio e fungo) e de efeito de solvente sobre o crescimento do microrganismo também foram preparados. Todas as amostras, incluindo os controles, foram feitos em quintuplicatas. Depois de 30 dias de crescimento a 25°C, mediu-se o crescimento do micélio de *L. gongylophorus* das amostras e dos controles, a fim de se calcular a porcentagem de inibição.

3.10 Ensaio de inibição do crescimento *Atta sexdens rubropilosa*

Este ensaio foi realizado no laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP, Rio Claro. Os ensaios foram realizados em operárias de *A. sexdens rubropilosa*, com massa corpórea variando de 15 a 25 mg, na ausência do fungo simbiote. Distribuídas em lotes de 50 operárias para cada concentração de extrato bruto testado, as mesmas foram divididas em grupos de 10 formigas e mantidas em 5

placas de Petri de 10 cm de diâmetro forradas com papel filtro. Essas placas foram colocadas em estufa com temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa aproximadamente em 70%. A dieta para manutenção das formigas (controle) ou dieta acrescida dos ingredientes ativos (tratamentos) foi colocada em papel alumínio na quantidade aproximada de 0,4 a 0,5 g por placa. Os ingredientes ativos, dissolvidos em mistura de acetona e óleo de soja (8:2), foram incorporados em dieta artificial nas concentrações estipuladas. No bioensaio por ingestão foram utilizados dois controles. No primeiro, a mistura de acetona e óleo de soja foi incorporada na dieta artificial e, no segundo apenas a dieta artificial. O objetivo do primeiro controle foi acompanhar e avaliar a sobrevivência das formigas com referência a toxicidade da acetona e do óleo, enquanto que a do segundo foi verificar a interferência do manuseio na sobrevivência das formigas. Os bioensaios foram examinados diariamente, para a retirada e contagem do número de formigas mortas, por um período de 25 dias. Todo este protocolo encontra-se na literatura⁸⁰.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resposta eletroquímica dos eletrodos descartáveis em função da variação da velocidade de varredura de potenciais

Neste estudo da velocidade de varredura de potenciais, as mesmas foram variadas em velocidades de varredura de 10, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, sendo o diâmetro dos eletrodos de trabalho de 3,0 mm.

4.1.1 Estudo da resposta eletroquímica em função da velocidade de varredura de potenciais para eletrodos de trabalho sem modificação

Utilizando a técnica de Voltametria Cíclica, este estudo foi realizado utilizando 50 μL de solução de ácido Ferrocenomonocarboxílico 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em Cloreto de Potássio 0,5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, o suficiente para cobrir toda a área eletródica composta pelo eletrodo de trabalho, contra-eletrodo e eletrodo de referência (Ag/AgCl), área delimitada pelo material vinil que separa a área para contato elétrico e a área que fica imersa em solução. Este estudo possibilita caracterizar os processos envolvidos na superfície dos eletrodos, assim como a área eletroativa dos mesmos (FIGURA 4.1).

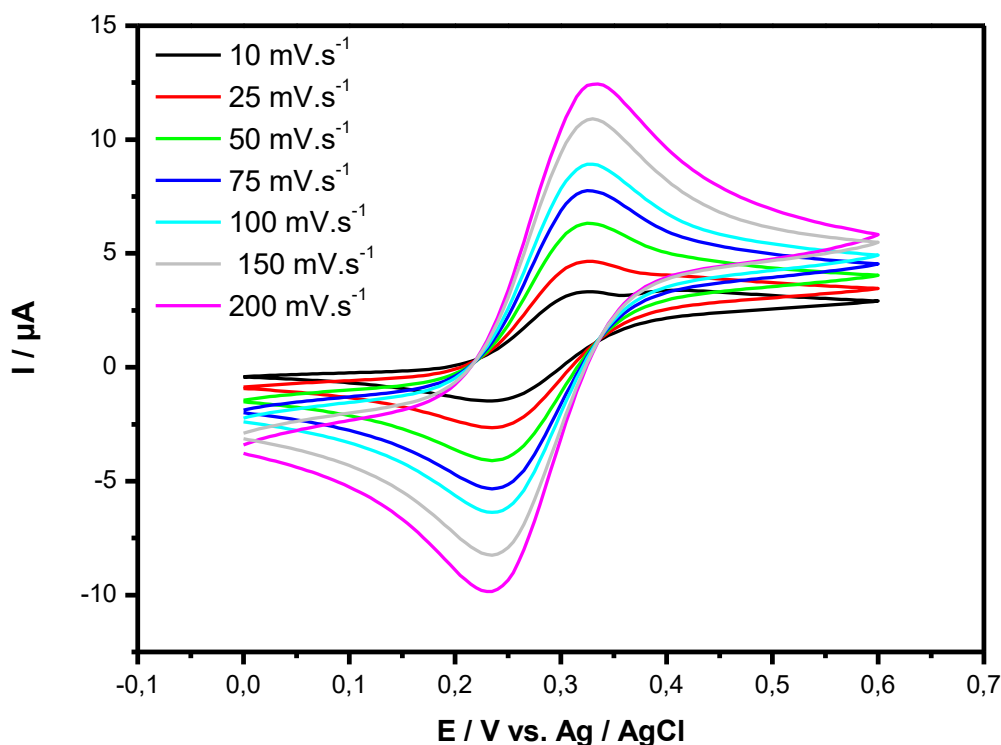


FIGURA 4.1- Voltamogramas cíclicos referentes a eletrodos da célula eletroquímica descartável, sem modificação. Solução de ácido Ferrocenomonocarboxílico 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em KCl 0,5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, intervalo de potencial de 0,0 a +0,6 V.

Na resposta eletroquímica obtida na FIGURA 4.1, o pico anódico refere-se à oxidação do ácido Ferrocenomonocarboxílico e o pico catódico refere-se à

redução deste, envolvendo um elétron. A disparidade entre os potenciais de oxidação e redução, de aproximadamente 90 mV, indicam a reversibilidade do processo redox, envolvendo a variação de um elétron. Na FIGURA 4.1, pode-se observar que os potenciais de oxidação e redução não deslocam com as velocidades de varredura de potenciais aplicadas.

Em Voltametria Cíclica a corrente de pico é diretamente proporcional à raiz da velocidade de varredura em reações reversíveis⁸¹, conforme a equação de Randles-Sevick:

$$i_p = \pm (2,69 \times 10^5).n^{3/2}.A.D^{1/2}.C.v^{1/2} \quad \text{Equação 2}$$

As variáveis da equação serão explicadas mais a frente.

Para entender claramente a relação entre a raiz quadrada da velocidade de varredura e a corrente de pico, a FIGURA 4.2 apresenta em gráfico a relação linear entre estas duas variáveis. As correntes de pico utilizadas estão presentes na FIGURA 4.2.

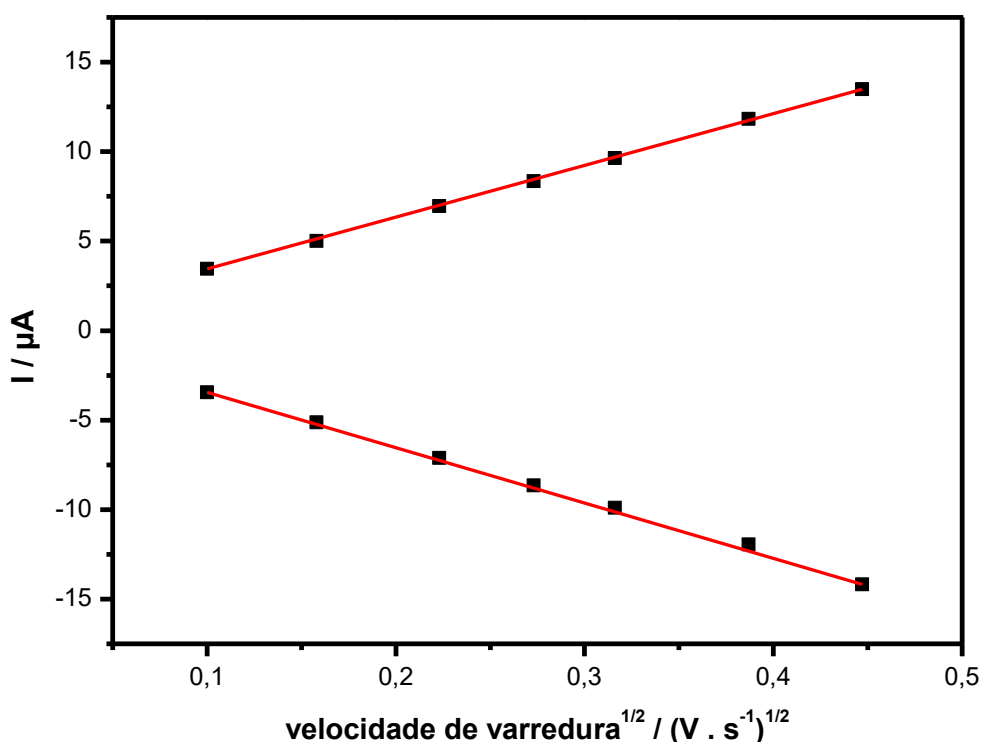


FIGURA 4.2- Relação linear das correntes de pico anódicas e catódicas em função da raiz quadrada das velocidades de varredura para eletrodos sem modificação.

Esta relação indica que o processo de transferência de massa que ocorre na superfície do eletrodo de trabalho é controlado pela difusão⁸¹. O coeficiente angular para a reta de corrente de pico anódica é $2,88 \times 10^{-5}$ (valores em Ampere e Volts) e

seu coeficiente de correlação (R) é 0,999, indicando uma relação fortemente positiva e diretamente proporcional entre as correntes de pico anódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura. O coeficiente angular para a reta de corrente de pico catódica é $-3,09 \times 10^{-5}$ (valores em Ampere e Volts) e seu coeficiente de correlação (R) é -0,999, o que afirma a correlação fortemente negativa e inversamente proporcional entre as duas variáveis.

4.1.2 Estudo da resposta eletroquímica em função da velocidade de varredura de potenciais para eletrodos de trabalho com modificação

O método *layer-by-layer* foi utilizado para as etapas de modificação realizada nos SPEs, com PDDA e AuNP-GSH como componentes destas etapas. 10 μL de PDDA $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ foram adicionados sobre os eletrodos de trabalho limpos com água ultrapura, deixando sobre esta superfície por 20 minutos. Após o tempo estabelecido, retira-se o excesso e adiciona-se 1 μL de solução $2,37 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ de AuNP-GSH em tampão HEPES $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0. Decorridos 20 minutos de ação de AuNP-GSH sobre os eletrodos, os mesmos foram lavados com água ultrapura para a realização dos estudos voltamétricos (FIGURA 4.3).

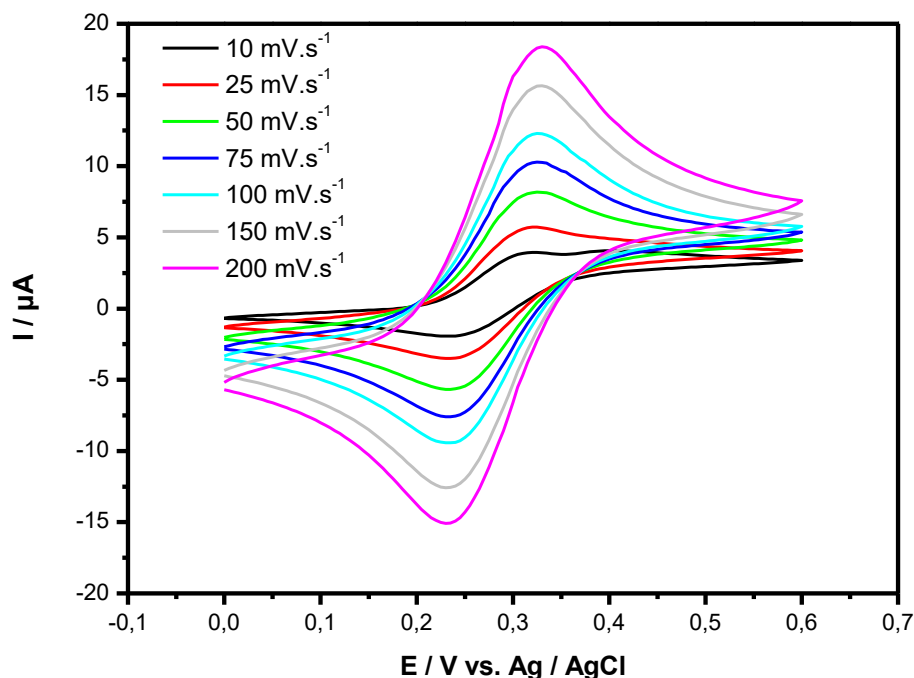


FIGURA 4.3- Voltamogramas cíclicos referentes a eletrodos da célula eletroquímica descartável, com modificação. Solução de ácido Ferrocenomonocarboxílico 1 mmol.L^{-1} em KCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, intervalo de potencial de 0,0 a +0,6 V.

Percebe-se comparando os voltamogramas da FIGURA 4.1 e da FIGURA 4.3, um aumento de corrente de pico de oxidação e de corrente de pico de redução do ácido Ferrocenomonocarboxílico, o que está diretamente relacionado à modificação que os eletrodos foram submetidos, mais especificamente às AUNPs-GSH, pois as mesmas possuem propriedades como: ótima condutibilidade, maior sensibilidade, aumento da taxa de transferência eletrônica na superfície do eletrodo, tornando assim os níveis de corrente medida maiores⁸².

Um gráfico de correlação linear entre as correntes de pico anódica e catódica e as velocidades de varredura de potenciais também foi plotado para os eletrodos modificados na FIGURA 4.4. As correntes de pico foram obtidas da FIGURA 4.3.

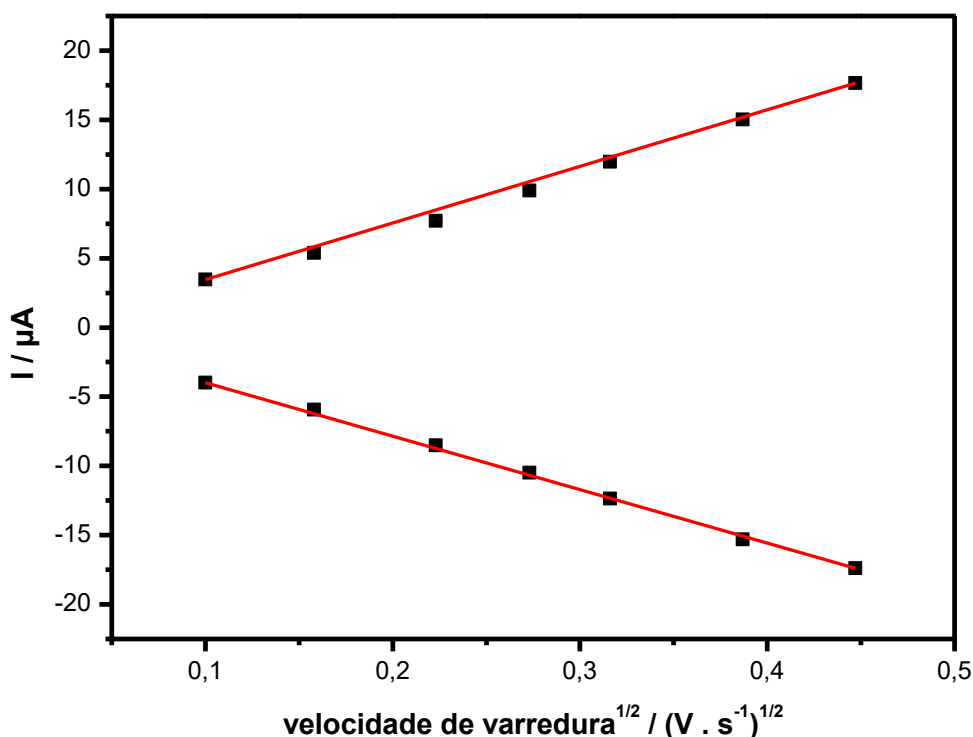


FIGURA 4.4- Relação linear das correntes de pico anódicas e catódicas em função da raiz quadrada das velocidades de varredura para eletrodos sem modificação.

De forma semelhante aos eletrodos não modificados o processo de transferência de massa que ocorre na superfície é controlado pela difusão⁸¹. Os coeficientes angulares para as retas de correntes de pico anódica e catódica foram $4,09 \times 10^{-5}$ e $-3,86 \times 10^{-5}$ respectivamente. Os coeficientes de correlação para as duas retas foram 0,998 e -0,999, em ordem conforme os dados anteriores.

4.1.3 Estudo das áreas eletroativas dos eletrodos sem e com modificação

Uma área eletroativa mede a área total do eletrodo eletroquimicamente funcional, incluindo sua rugosidade (regiões que são não condutoras ou conduzem com deficiência não serão medidas)⁸³. As áreas eletroativas para este estudo foram calculadas a partir dos gráficos das correntes de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (FIGURA 4.2 e FIGURA 4.4), obtidos de acordo com os estudos das velocidades de varreduras de potenciais e utilizando a Equação 2:

$$i_p = \pm (2,69 \times 10^5).n^{3/2}.A.D^{1/2}.C.v^{1/2}$$

Onde i_p é a corrente de pico (Ampere), n é o número de elétrons envolvidos na reação reversível, A é a área eletroativa (cm^2), D é o coeficiente de difusão, neste caso do ácido Ferrocenomonocarboxílico em solução de KCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ($5,7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$)², v é a velocidade de varredura de potencial (V.s^{-1}), e C é a concentração do ácido Ferrocenomonocarboxílico em solução (mol.cm^{-3}).

Quando rearranjamos a equação de Randles-Sevcik, com o objetivo de isolar a Área da equação 2, calcula-se então a área efetiva do eletrodo (Equação 3).

$$A = \frac{i_p}{v^{1/2}} \times \frac{1}{2,69 \times 10^5 . n^{3/2} . D^{1/2} . C} \quad \text{Equação 3}$$

O primeiro termo da equação é o coeficiente angular das retas obtidas nos gráficos da FIGURA 4.2 e FIGURA 4.4, substituindo o primeiro termo então para os eletrodos sem modificação com o valor de $2,89 \times 10^{-5}$ (coeficiente angular da reta de corrente de pico anódica) e para os eletrodos com modificação o valor de $4,09 \times 10^{-5}$ e desenvolvendo a equação, têm-se os valores listados na TABELA 4.1:

TABELA 4.1- Valores de áreas eletroativas para os eletrodos sem e com modificação, calculados pela Equação de Randles-Sevcik.

Eletrodos	Coeficiente angular	Área eletroativa (mm ²)
Sem modificação	$2,89 \times 10^{-5}$	4,49
Com modificação	$4,09 \times 10^{-5}$	6,37

Percebe-se uma diferença entre as áreas eletroativas dos eletrodos sem e com modificação, de forma que os eletrodos modificados possuem área efetiva maior, o que é justificado pela presença das AuNPs, pois as mesmas, como já mencionado, conferem aos eletrodos maior condutividade elétrica, e teoricamente preenchem toda a circunferência do eletrodo de trabalho, conseqüentemente cobrindo a tinta a base de carbono com uma camada altamente condutiva.

É necessário salientar que o cálculo da área eletroativa utilizando a Equação 3 não é estritamente correto; contudo, indica uma ótima aproximação e pode ser usada para comparar diferentes eletrodos quando testados da mesma maneira.⁸³

4.2 Perfil voltamétrico em cada etapa de modificação dos eletrodos e da imobilização da enzima acetilcolinesterase na célula eletroquímica

Como forma de evidenciar a eficácia de cada etapa de modificação bem como da imobilização da AChE nos microeletrodos, realizou-se um estudo de Voltametria Cíclica com velocidade de varredura em $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, em $50 \mu\text{L}$ de solução de ácido Ferrocenomonocarboxílico $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ em Cloreto de Potássio $0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, obtendo assim o voltamograma representado na FIGURA 4.5. A solução enzimática para este estudo está na concentração de $1,25 \times 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (FIGURA 4.5).

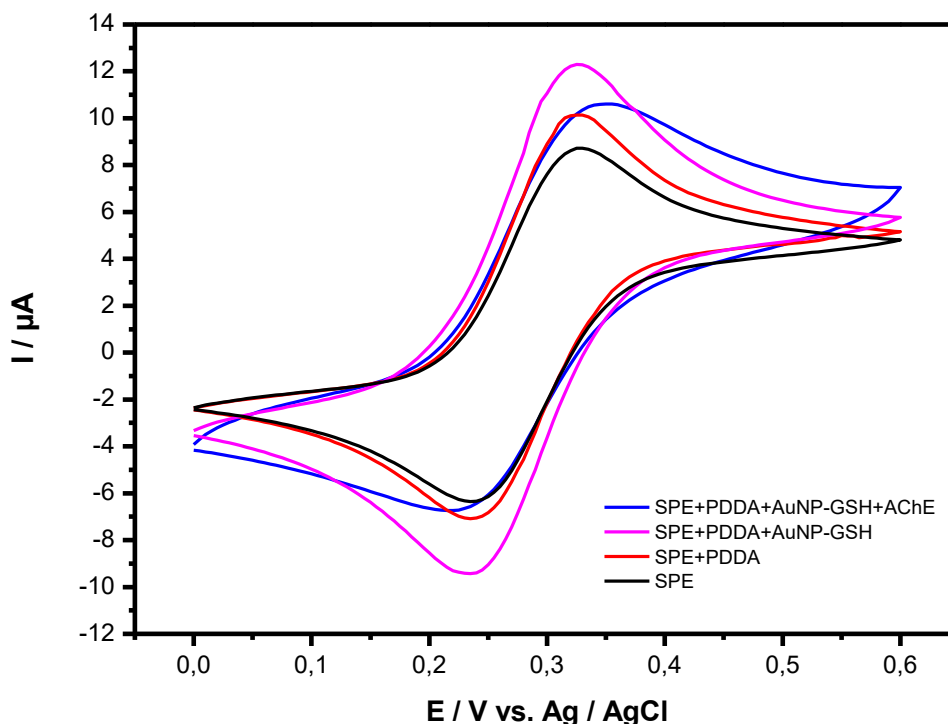


FIGURA 4.5- Voltamogramas cíclicos obtidos em solução Ferrocenomonocarboxílico para os eletrodos não e eletrodos modificados com PDDA e AuNP-GSH e na presença da enzima AChE. Intervalo de potencial de 0 a +0,6 V e $v= 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

É visível que os testes aplicados nos SPEs apresentam disparidades na intensidade de corrente de oxidação e redução do Ferrocenomonocarboxílico entre o SPE sem qualquer modificação e o SPE com AChE. As diferenças entre as curvas estão próximas a uma faixa de $1,70 \mu\text{A}$ a $2,20 \mu\text{A}$, acentuando que da etapa de adição de AuNPs para a etapa de adição da AChE, ocorre o descréscimo de $2,20 \mu\text{A}$, indicando que a camada enzimática dificulta a transferência eletrônica do processo redox.

4.3 Avaliação da resposta eletroquímica em diferentes concentrações de substrato

A região do potencial de oxidação da tiocolina já foi observado em outros trabalhos na literatura por Voltametria de onda quadrada^{84,85}, variando entre 45 mV e 80 mV, logo a corrente de pico esperada estaria aproximada a estas mesmas regiões. Neste estudo, a concentração enzimática utilizada foi de $1,25 \times 10^{-1} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em tampão TRIS-HCl $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4, em $50 \mu\text{L}$ de solução de ASChI em concentrações de $5,88 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $53,45 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Todas as concentrações em tampão fosfato $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4. Para detectar a oxidação da tiocolina foi

utilizada a técnica de Voltametria de Onda Quadrada. Cada voltamograma foi registrado com 60 minutos de reação enzima-substrato (FIGURA 4.6).

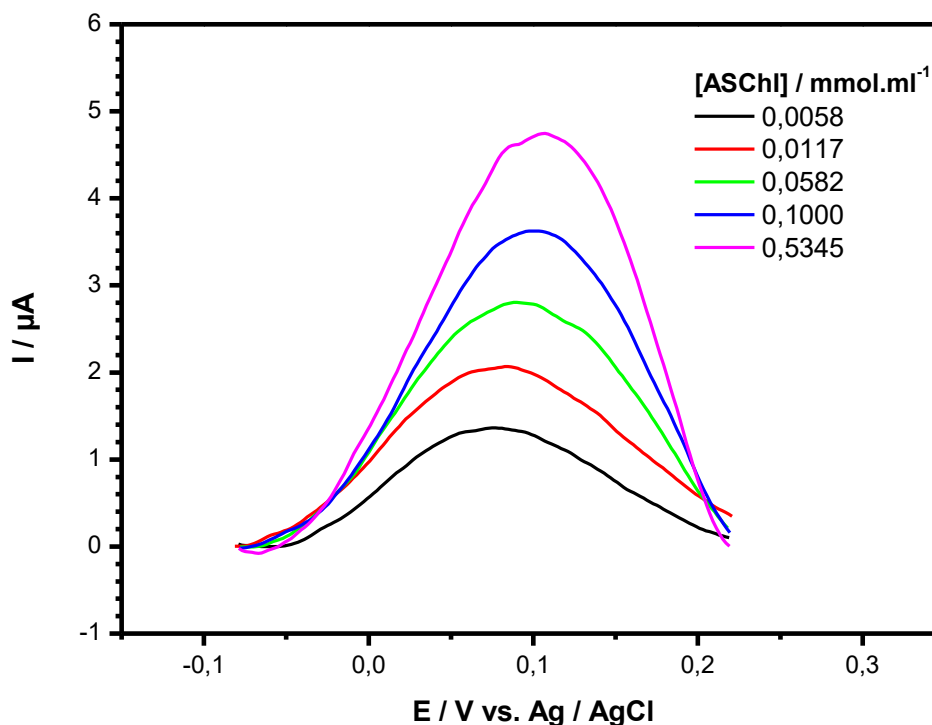


FIGURA 4.6- Voltamogramas de onda quadrada do potencial de oxidação da tiocolina em função da concentração de substrato em tampão fosfato 0,01 mol.L⁻¹ (pH 7,4). [AChE]= 1,25 x 10⁻¹ mg.mL⁻¹. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.

Pelo voltamograma da FIGURA 4.6 verifica-se que a corrente de pico da oxidação da tiocolina encontra-se em aproximadamente 100 mV. Quando a solução contendo o substrato é adicionada sobre a superfície do eletrodo ocorre a reação entre a AChE e o ASChI, a enzima hidrolisa o substrato formando os produtos tiocolina e ácido acético, a tiocolina é oxidada pelo potencial aplicado e o sinal é registrado pelos voltamogramas, como representado na FIGURA 4.7.⁸⁶

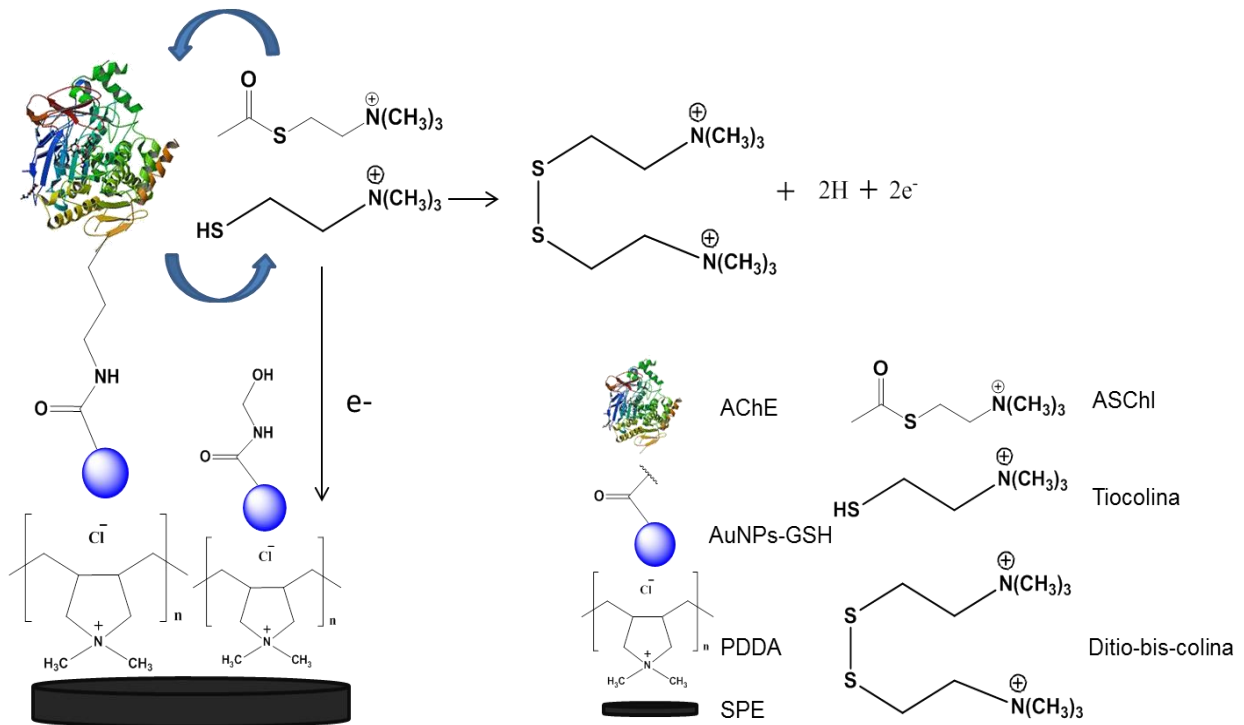


FIGURA 4.7- Representação esquemática do mecanismo de resposta do biossensor enzimático.

Para escolher a concentração ideal de substrato para os testes posteriores, levou-se em consideração a resposta de cada concentração nas correntes medidas e o desvio padrão calculado para cada uma. O gráfico da FIGURA 4.8 apresenta as correntes de picos para cada concentração testada conforme o tempo decorrido de reação com seus respectivos desvios padrões (FIGURA 4.8).

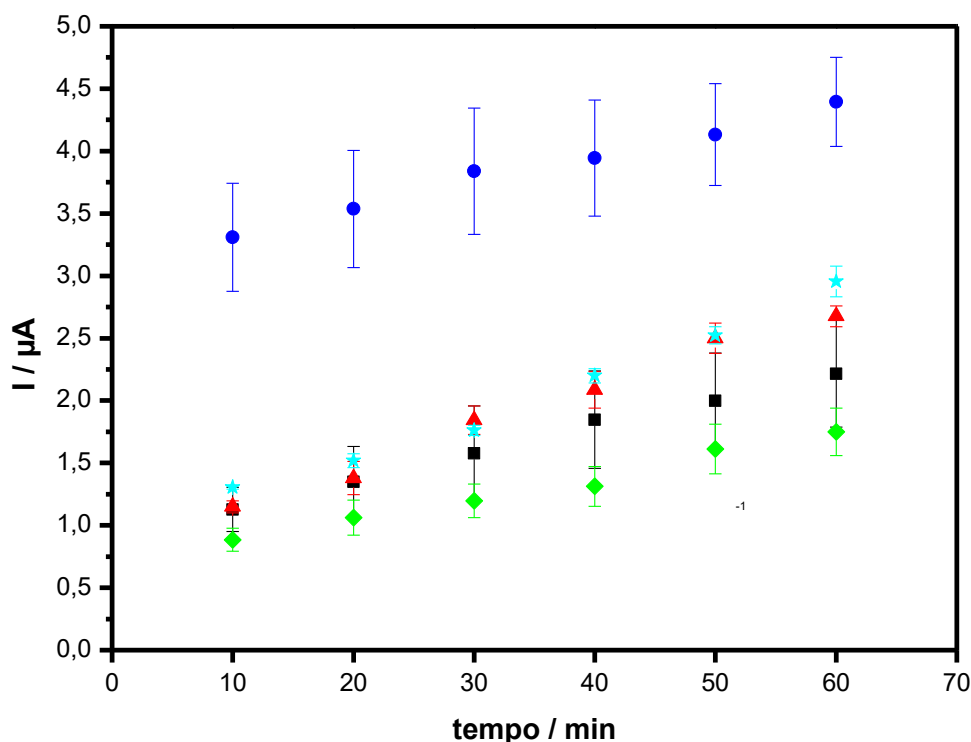


FIGURA 4.8- Correntes de pico anódica em função da variação da concentração do substrato, do tempo de reação enzimática e seus desvios padrões. Em tampão fosfato 0,01 mol.L⁻¹ (pH 7,4). $\blacklozenge = 5,88 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; $\blacksquare = 1,17 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹; $\blacktriangle = 5,82 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹; $\star = 10,10 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹; $\bullet = 53,45 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹. [AChE]= $1,25 \times 10^{-1}$ mg.mL⁻¹. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.

Analisando a priori as respostas de correntes que cada concentração produziu, as correntes maiores em função do tempo de reação foram da solução de substrato mais concentrada, porém a mesma possui um alto desvio padrão em cada corrente registrada conforme o tempo. Assim, a concentração de $5,82 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹, foi selecionada para os estudos seguintes.

4.4 Avaliação da resposta eletroquímica em diferentes concentrações de enzima

As correntes de oxidação da tiocolina em função da variação de concentrações da AChE imobilizada nos eletrodos foram avaliadas por Voltametria de onda quadrada. As concentrações variaram de $1,25 \times 10^{-2}$ até $1,25 \times 10^{-1}$ mg.mL⁻¹. A FIGURA 4.9 mostra os efeitos desta relação.

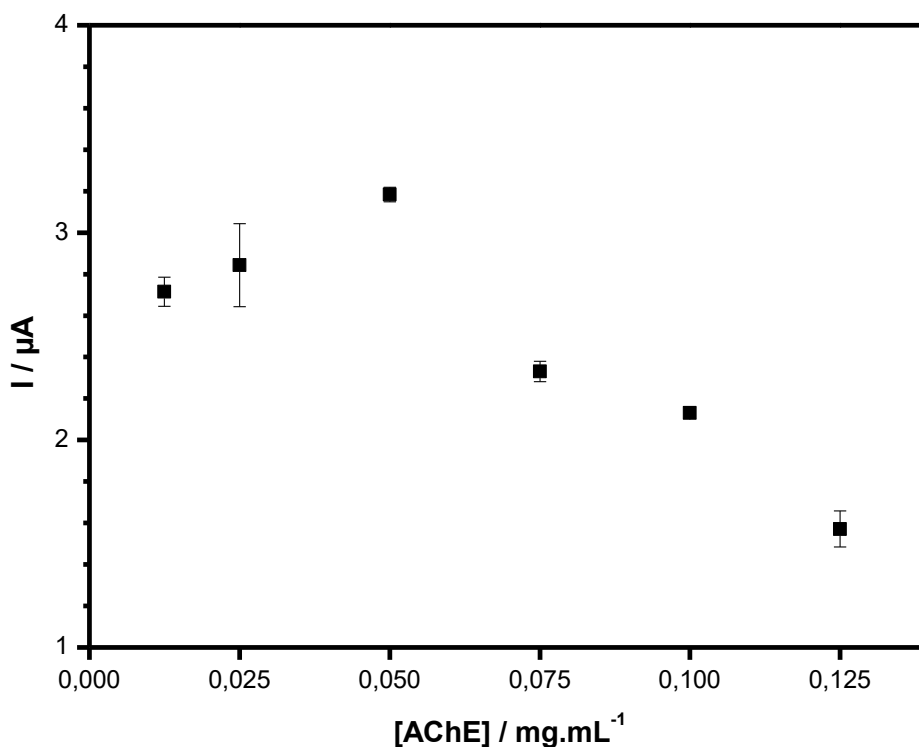


FIGURA 4.9- Efeito na corrente de oxidação da tiocolina em função da quantidade de enzima AChE imobilizada nos biossensores. Correntes obtidas por voltametria de onda quadrada em ASChI $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,4). Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.

O primeiro comportamento de corrente da concentração $1,25 \times 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$ até $5 \times 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$ demonstra o aumento de corrente devido a disponibilidade de mais sítios catalíticos para a reagir com o substrato, o segundo comportamento onde ocorre o decréscimo de corrente para as concentrações maiores que 5×10^{-2} de enzima nos SPEs pode estar relacionado com o aumento da espessura da camada enzimática⁸⁷, dificultando assim a oxidação da tiocolina próxima a região eletródica. A concentração de AChE escolhida para os testes seguintes foi de $5 \times 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$.

4.5 Avaliação da resposta eletroquímica em diferentes valores de pH

Este estudo teve como objetivo verificar se o pH na faixa de 7,4, que já estava sendo utilizada nos testes anteriores, é a ideal para que ocorra a reação entre a acetilcolinesterase e o iodeto de acetiltiocolina nesse sistema, de forma que variou-

se as faixas de pH entre 6,0 e 8,0. Aponta-se que é o pH onde a ASChI é solubilizada e então depositada na superfície do eletrodo. A técnica utilizada por este estudo foi SWV, e os valores estão no gráfico da FIGURA 4.10.

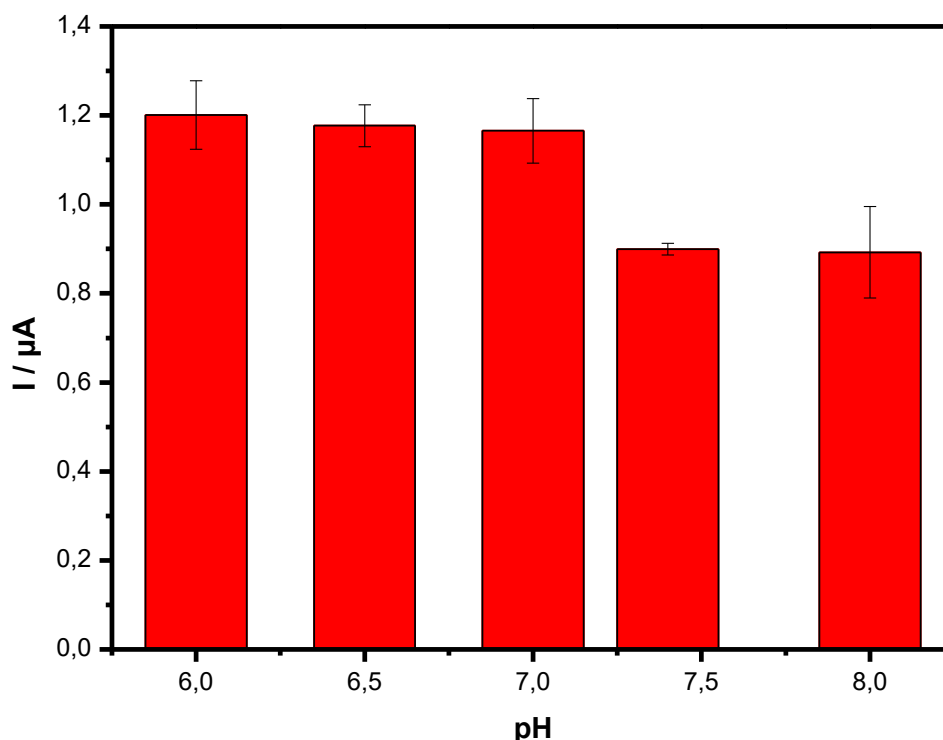


FIGURA 4.10- Resposta da corrente de pico anódica da oxidação da tiocolina em função da variação do pH da solução de ASChI $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$. [AChE]= $5 \times 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.

Nota-se que em soluções mais ácidas ocorre um aumento na resposta da corrente de pico, justificado pela cinética da hidrólise espontânea da acetiltiocolina, ou seja, uma reação não-enzimática, que comparada a pH mais altos é mais intensa⁸⁸.

O processo de hidrólise do substrato ocorre principalmente pelos resíduos de aminoácidos serina e histidina, responsáveis pela acilação e deacilação da molécula de ASChI no sítio catalítico da enzima. A histidina possui um pKa de 6,3 e em valores que estão na mesma faixa do pH fisiológico (7,4) atua como base de Lewis e realiza catálise ácida no processo de hidrólise do substrato^{42,84}, sendo desta maneira um ponto relevante para a escolha da melhor faixa de pH. À vista disto, manteve-se o pH em 7,4 para os estudos em sequência.

Uma vez selecionadas as condições ideais para os testes de inibição, sendo estas, a concentração de ASChI ($5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$), a concentração de AChE ($5 \times 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$) e a faixa de pH (7,4), avaliou-se a repetibilidade dos SPEs calculando o DPR intra-dia e inter-dia (n= 3) (TABELA 4.2).

TABELA 4.2- Desvio Padrão Relativo para intra e inter-dia de SPEs nas condições escolhidas para os testes de inibição.

Parâmetro	Eletrodos	DPR / %
Repetibilidade	Intra-dia	1,46
	Inter-dia	0,90

Os valores de DPR confirmam um ótimo desempenho para o biossensor desenvolvido e a excelente repetibilidade do protocolo proposto para a imobilização da enzima e das condições propostas para determinações de potenciais inibidores.

4.6 Determinação de atividade inibitória da Azadiractina frente a AChE

4.6.1 Tempo de incubação

O primeiro parâmetro para se avaliar a atividades de potenciais inibidores sobre a enzima é o tempo de incubação destes sobre os biossensores e avaliar as respostas de correntes em função deste tempo. Para este estudo, 50 μL do composto Azadiractina em concentração de $7,2 \text{ mg.L}^{-1}$ em solução foram gotejados sobre os biossensores e após cada tempo estipulado para a ação do composto, os eletrodos foram lavados e realizou-se as medidas eletroquímicas. As correntes foram medidas por Voltametria de Onda Quadrada, em 50 μL de solução $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de ASChI em tampão fosfato $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,4. Medidas realizadas após 10 minutos de reação com o substrato. Explica-se que o tempo 0 de minuto é referente ao controle, ou seja, o SPE não foi incubado com a solução de Azadiractina (FIGURA 4.11).

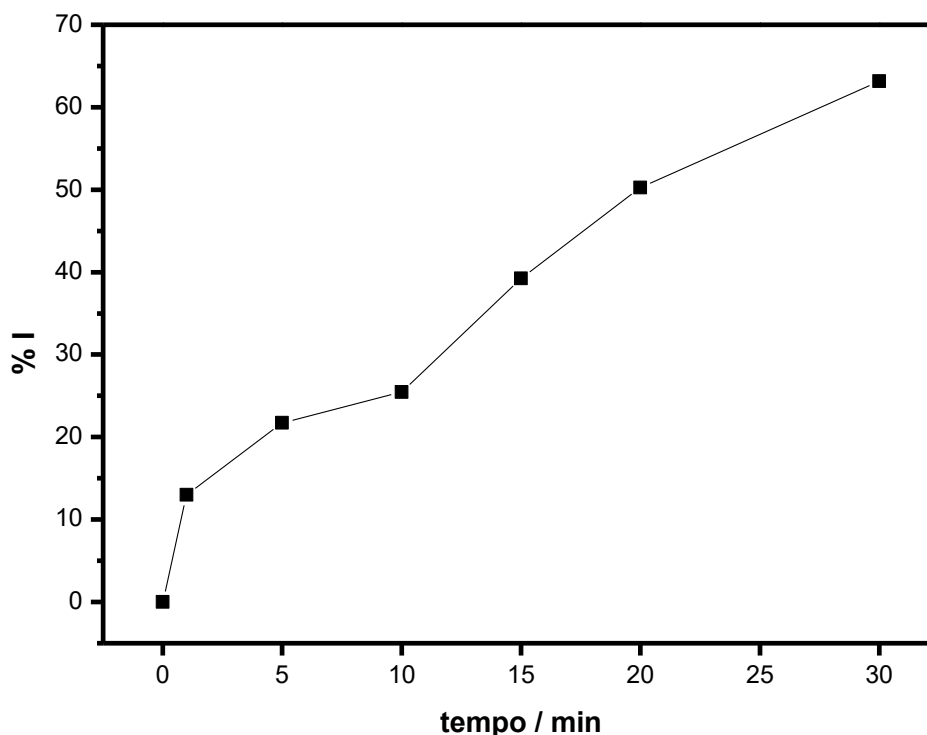


FIGURA 4.11- Efeito dos tempos de incubação da Azadiractina nas correntes de pico de oxidação da tiocolina calculado pela porcentagem de inibição. Solução de ASChI $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. [AChE]= $5 \times 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.

Nota-se na FIGURA 4.11 que a inibição é proporcional ao tempo de ação do composto sobre a AChE, de forma que em 20 minutos de incubação nos SPEs a corrente de inibição está em 50%, optando-se então trabalhar com esta faixa de tempo para o estudo de variação de concentrações de Azadiractina.

4.6.2 Resposta da atividade inibitória em função da variação de Azadiractina

A FIGURA 4.12 apresenta o gráfico de correlação entre a porcentagem de inibição enzimática e a variação das seguintes concentrações de Azadiractina: $0,72 \text{ mg.L}^{-1}$; $1,4 \text{ mg.L}^{-1}$; $2,8 \text{ mg.L}^{-1}$; $4,3 \text{ mg.L}^{-1}$ e $5,7 \text{ mg.L}^{-1}$. Com tempo de incubação de 20 minutos para as concentrações, as correntes foram medidas por SWV, após 10 minutos de reação com o substrato. O tempo de 0 minuto é referente ao controle.

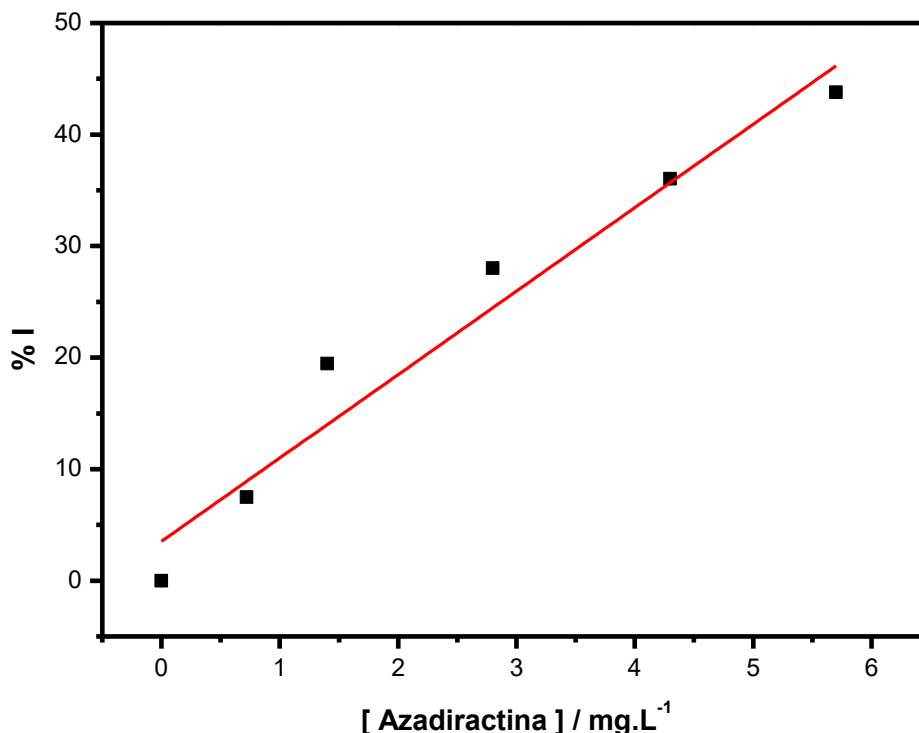


FIGURA 4.12- Gráfico de correlação entre a porcentagem de inibição e a variação de concentração de Azadiractina. Solução de ASChI $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$. [AChE]= $5 \times 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.

A Azadiractina apresentou atividade inibitória mesmo em concentrações menores (comparada à concentração do estudo anterior), obtendo 7,5% de inibição em $0,72 \text{ mg.L}^{-1}$ até 43,7% em $5,7 \text{ mg.L}^{-1}$. Esta substância já possui atividade estabelecida sobre a AChE⁸⁹. O composto também apresenta atividade inseticida tendo como mecanismo de ação, por exemplo, o controle no crescimento dos insetos⁹⁰. Não foi encontrada na literatura a aplicação deste produto natural em biosensores eletroquímicos de acetilcolinesterase. O valor de R calculado neste teste é 0,990.

4.7 Determinação de atividade inibitória de extratos de *Picramnia* frente a AChE

4.7.1 Tempo de incubação

Neste estudo, o extrato etanólico de folhas de *Picramnia ciliata* e *Picramnia riedelli* foram ensaiados com o intuito de constatar possíveis produtos naturais responsáveis pela atividade inibitória sobre a acetilcolinesterase. A solução para os dois extratos foram preparadas para uma concentração de $7,2 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo $50 \mu\text{L}$ destas soluções depositadas sobre os eletrodos, aplicadas em tempos

diferentes. De forma semelhante ao estudo anterior, após os tempos cronometrados, os mesmos foram lavados e as medidas eletroquímicas foram realizadas por SWV, após 10 minutos de reação em 50 μL de solução $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de ASChI em tampão fosfato $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,4. O tempo de 0 minuto é referente ao controle (FIGURA 4.13).

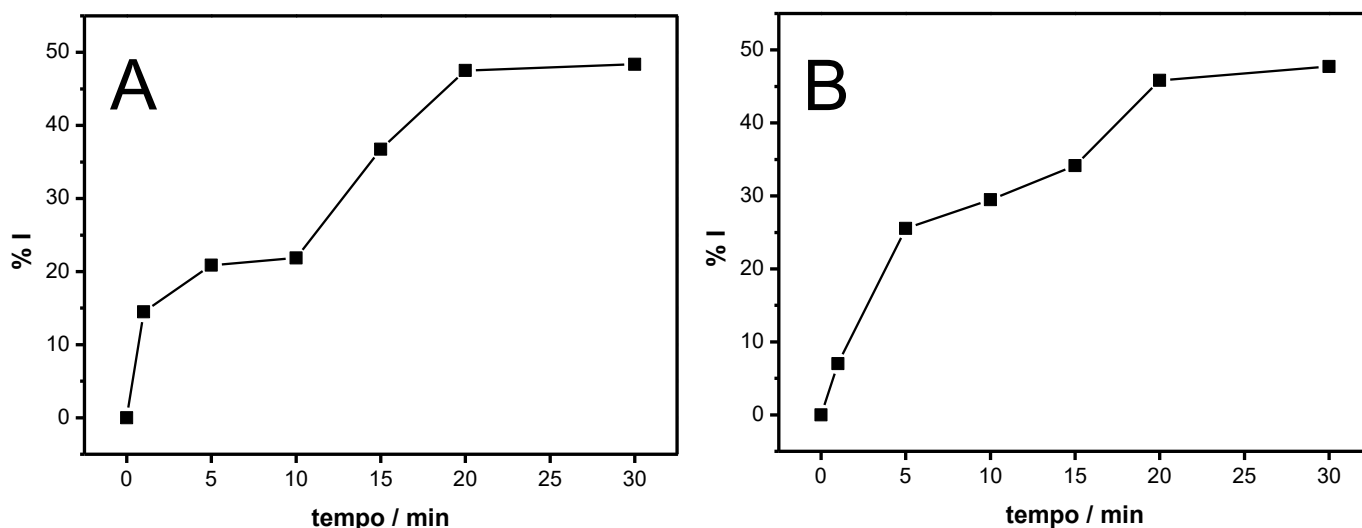


FIGURA 4.13- Efeito dos tempos de incubação dos extratos de *Picramnia riedelli* (A) e *Picramnia ciliata* (B) nas correntes de pico de oxidação da tiocolina calculado pela porcentagem de inibição. Solução de ASChI $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$. [AChE]= $5 \times 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.

Conforme a FIGURA 4.13 as correntes de inibição para os dois extratos de *Picramnia* aumentam até o tempo de 20 minutos de ação dos mesmos sobre a AChE, possuindo similar porcentagem de inibição com 30 minutos, indicando que a partir de 20 minutos as correntes tendem a se estabilizar. Optou-se por trabalhar com 20 minutos de incubação uma vez que para o extrato de *Picramnia riedelli* a inibição foi de 47% e de *Picramnia ciliata*, 45%.

4.7.2 Resposta da atividade inibitória em função da variação dos extratos de *Picramnia riedelli* e *Picramnia ciliata*

A FIGURA 4.14 apresenta a correlação entre a porcentagem de inibição enzimática e a variação das seguintes concentrações dos extratos de *Picramnia*: $0,72 \text{ mg.L}^{-1}$; $1,4 \text{ mg.L}^{-1}$; $2,8 \text{ mg.L}^{-1}$; $4,3 \text{ mg.L}^{-1}$ e $5,7 \text{ mg.L}^{-1}$. As correntes foram medidas por SWV após 10 minutos de reação com ASChI, com tempo de incubação de 20 minutos para as concentrações. O tempo de 0 minuto é referente ao controle.

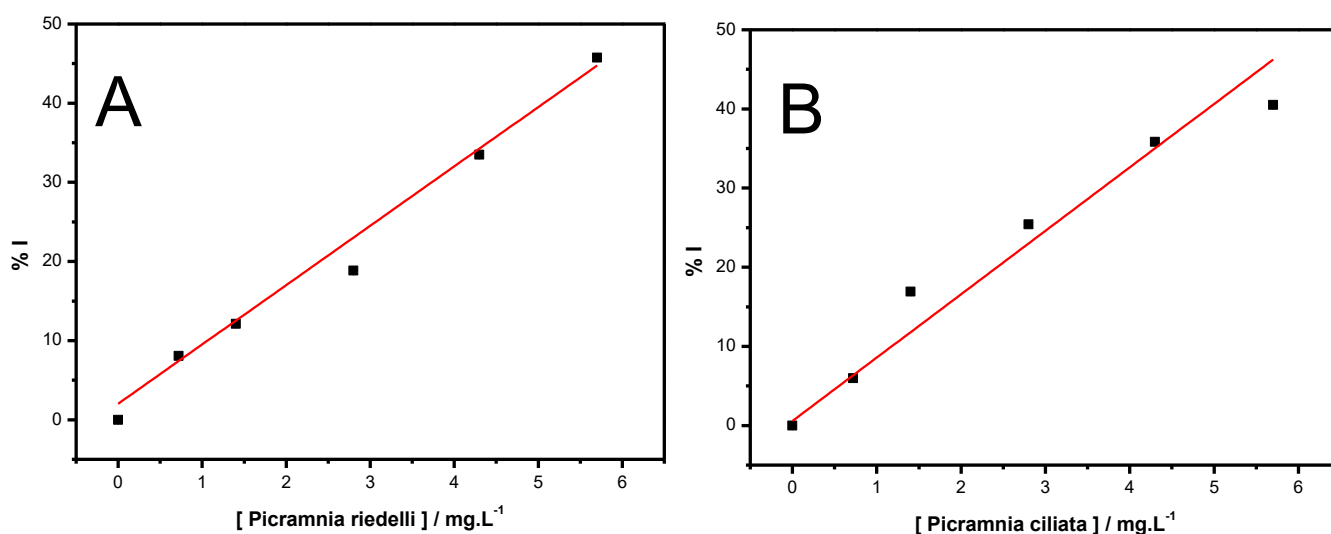


FIGURA 4.14- Gráfico de correlação entre a porcentagem de inibição e a variação de concentração de extrato de (A) *Picramnia riedelli* e (B) *Picramnia ciliata*. Solução de ASChI $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$. $[\text{AChE}] = 5 \times 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.

Analisando a FIGURA 4.14, observa-se que similar a Azadiractina, a atividade dos extratos de *Picramnia* também ocorre em concentrações pequenas, obtendo 8,07% para a espécie *riedelli* e 5,98% de inibição para a espécie *ciliata* na concentração de $0,72 \text{ mg.L}^{-1}$. O valor de R para o teste com *P. riedelli* é 0,995 e para *P. ciliata* é 0,992. Os dois bioensaios realizados com os extratos de *Picramnia* (tempo de incubação e variação de concentração) confirmam a atividade inibitória que estes possuem sobre a AChE, sinalizando assim, que os mesmos possuem composto(s) que interaje(m) com a enzima, ou seja, que contém afinidade a algum sítio da proteína, podendo ser este ativo ou não-ativo. Não foi encontrada na literatura a aplicação de extratos brutos de plantas para testes de atividade inibitória em biossensores de acetilcolinesterase.

4.7.3 Espectroscopia por RMN dos extratos de *Picramnia*

Este estudo apresenta os deslocamentos químicos referentes aos prótons de Hidrogênio do extrato metanólico de *Picramnia riedelli* e etanólico de *Picramnia ciliata* com o objetivo de propor possíveis classes de compostos naturais e possíveis estruturas dos mesmos, de forma a indicar quais destes podem ser responsáveis para a inibição da AChE.

O extrato de *Picramnia riedelli* foi solubilizado em CDCl_3 e o seguinte

espectro foi obtido (FIGURA 4.15):

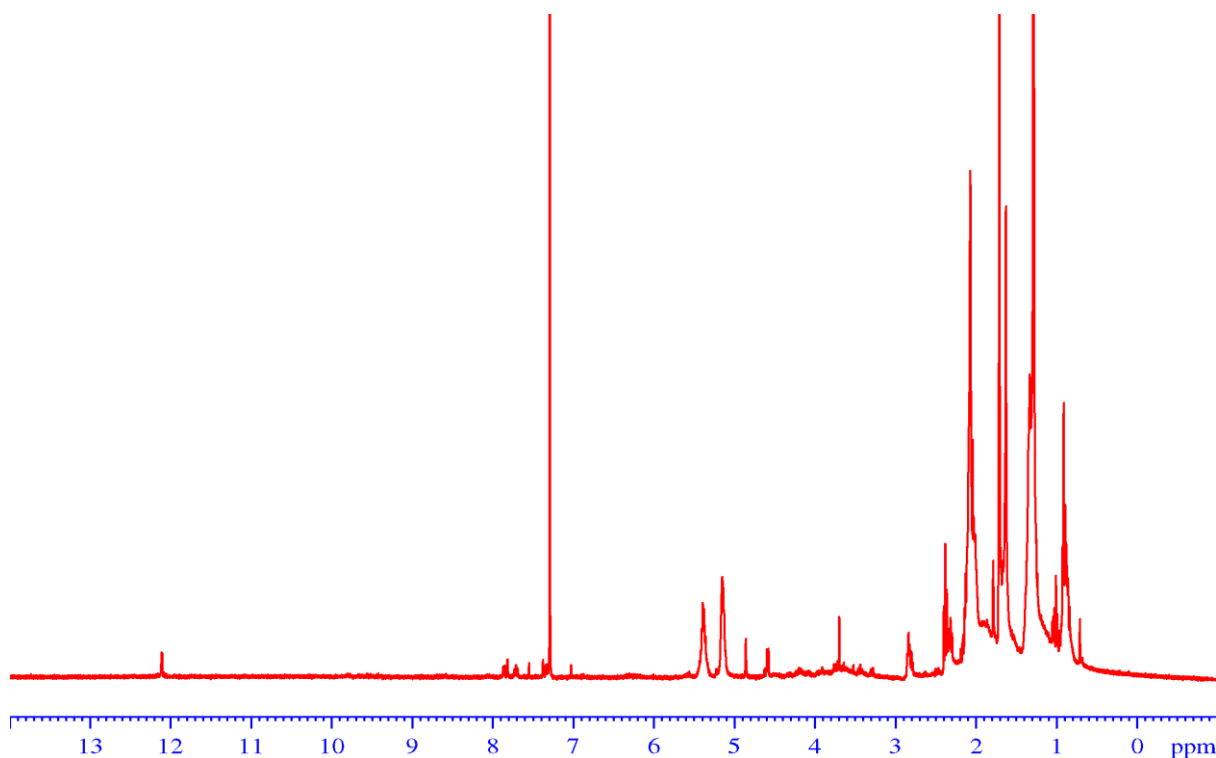


FIGURA 4.15- Espectro de RMN de ^1H do extrato de *Picramnia riedelli* em CDCl_3 (400 MHz).

Estudos de identificação de compostos naturais do gênero *Picramnia*, relatam a presença de antronas⁹¹, oxantronas⁹², triterpenos⁹³, ácidos graxos⁹⁴, dentre outros. De forma que sinais característicos de algumas classes dos compostos mencionados também foram encontrados no extrato em questão. Os deslocamentos químicos que indicam a presença de antraquinona estão destacados no espectro da FIGURA 4.16.

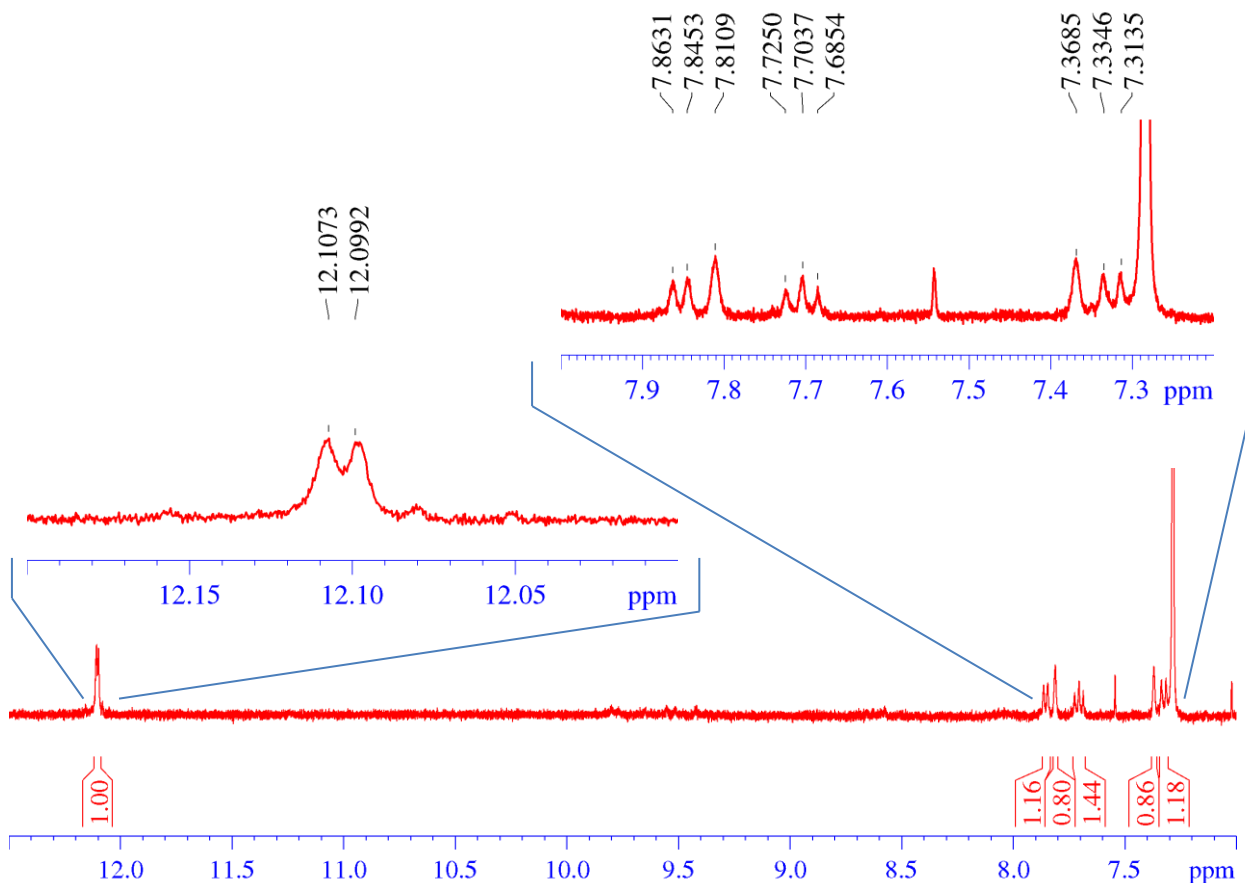


FIGURA 4.16- Espectro de RMN de ¹H com destaques nas regiões características de estrutura de antraquinona (400 MHz). Valores de integrais abaixo das curvas do espectro, deslocamentos químicos acima das curvas.

Os deslocamentos químicos correspondem com uma antraquinona reportada anteriormente, isolada do extrato de *Picramnia glazioviana*⁹⁵. A estrutura proposta e também já registrada na literatura está na FIGURA 4.17.

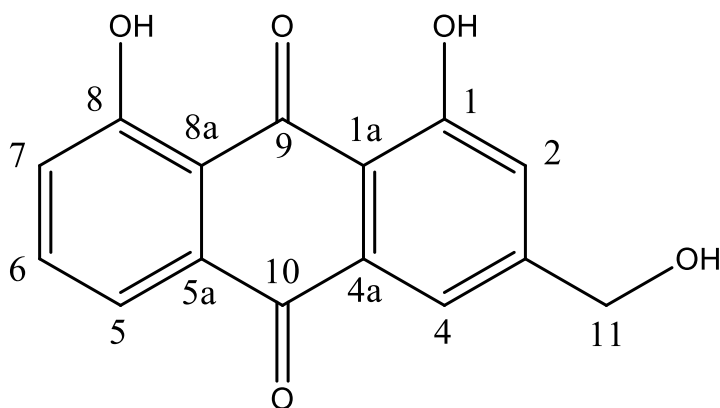


FIGURA 4.17- Antraquinona isolada de *Picramnia* com os carbonos enumerados.

Para confirmar a substância, os deslocamentos encontrados na FIGURA 4.16 estão tabelados em comparação com a antraquinona catalogada (TABELA 4.3).

TABELA 4.3- Dados de RMN de ^1H (400 MHz) da estrutura da FIGURA 4.17 (1) em CDCl_3 e da literatura referente a antraquinona (2)⁹⁵.

Posição	1	2
	δH (J em Hz)	δH (J em Hz)
2	7,36 <i>sl</i>	7,35 <i>sl</i>
4	7,81 <i>sl</i>	7,79 <i>sl</i>
5	7,85 <i>d</i> (7,3)	7,81 <i>d</i> (8,8)
6	7,70 <i>dd</i> (7,3-8,4)	7,70 <i>t</i> (8,8)
7	7,32 <i>d</i> (8,4)	7,30 <i>d</i> (7,4)
11	4,74 <i>d</i>	4,74 <i>d</i> (8,0)
OH	12,10 <i>s</i>	12,11 <i>s</i>
-	12,09 <i>s</i>	12,06 <i>s</i>

Analisando a TABELA 4.3 pode-se afirmar que a antraquinona presente na espécie *P. glazioviana* também encontra-se na espécie *P. riedelli*, que tem por nome aloe-emodina.

Outras regiões do espectro de RMN também foram exploradas para a determinação de possíveis produtos naturais presentes no extrato. Para os dois extratos de *Picramnia*, deslocamentos característicos de ácidos graxos foram encontrados como se pode ver na FIGURA 4.18, comparando os dois espectros.

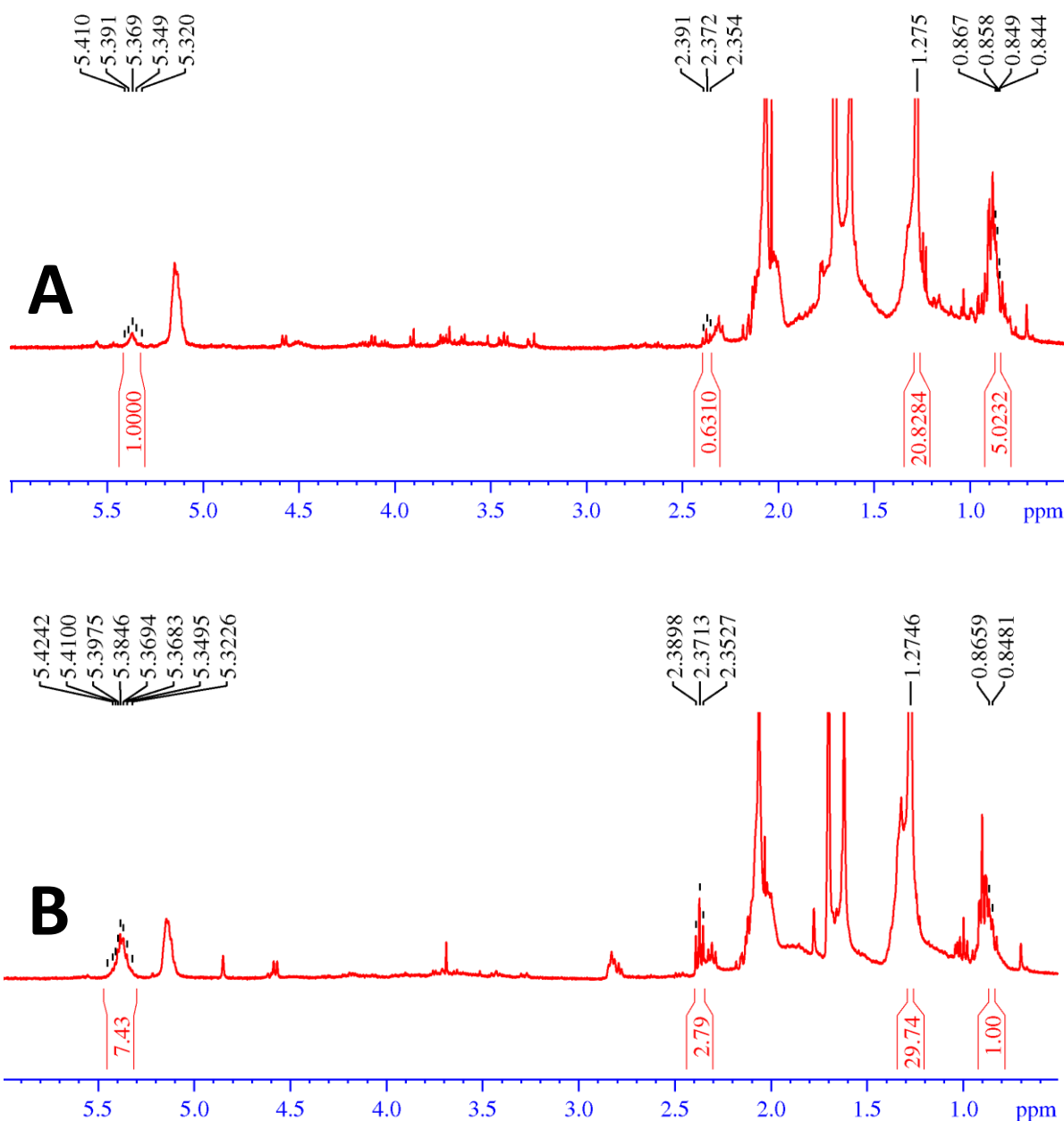


FIGURA 4.18- Espectro de RMN de ^1H com destaques nas regiões características de ácidos graxos (400 MHz). Espectro A- *Picramnia ciliata*; Espectro B- *Picramnia riedelli*. Valores de integrais abaixo das curvas do espectro, deslocamentos químicos acima das curvas.

Os multipletos nas regiões de 5,4-5,3 ppm são referentes aos hidrogênios olefínicos presentes em ácidos graxos com insaturações⁹⁶. Os hidrogênios de $-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ desdobram em um tripleto na região de 2,39-2,35 ppm^{96,94}. O singlete na região de 1,27 ppm é compatível aos hidrogênios de grupos CH_2 que não estão sobre forte influência do efeito de desblindagem⁹⁴. Os sinais na região de 0,86-0,84 ppm condizem com hidrogênios metilas (CH_3) que normalmente

desdobram em tripleto, podendo desdobrar em quarteto, caso haja sobreposição de tripletos⁹⁶.

Deslocamentos característicos da classe dos isoprenóides também foram encontrados nos dois espectros do gênero *Picramnia*, destacados na FIGURA 4.19:

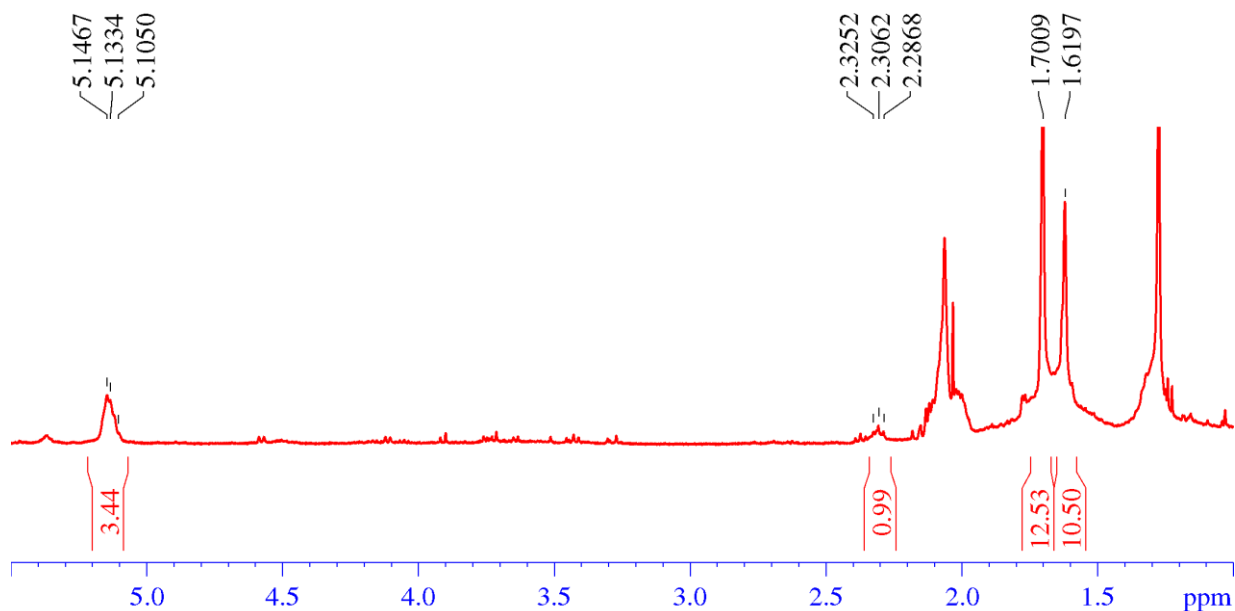


FIGURA 4.19- Espectro de RMN de ^1H de *Picramnia ciliata* com destaques nas regiões características de isoprenóides (400 MHz). Valores de integrais abaixo das curvas do espectro, deslocamentos químicos acima das curvas.

Os singletos em 1,70 e 1,61 ppm competem à hidrogênios de metilas vizinhos as duplas ligações da estrutura. Os sinais entre 2,32-2,28 ppm conferem aos hidrogênios de grupos CH_2 . Os hidrogênios olefínicos desta classe apresentam desdobramento em tripleto em regiões de 5,14-5,10 ppm. Estes sinais condizem com dados da literatura⁹⁷. A FIGURA 4.20 apresenta uma estrutura básica de um isoprenóide.

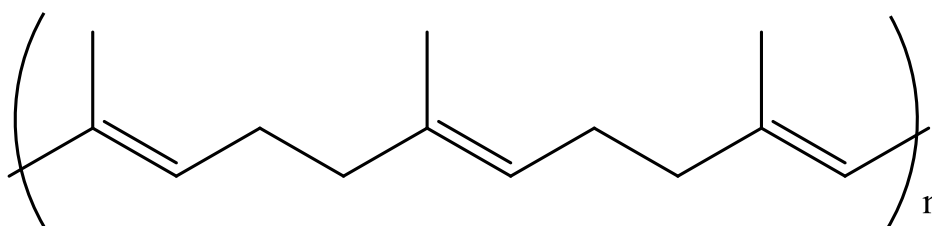


FIGURA 4.20- Estrutura para a classe dos isoprenóides.

4.8 Determinação de atividade inibitória de extrato de *Toona ciliata*

4.8.1 Tempo de incubação

De forma semelhante aos estudos anteriores, o primeiro parâmetro para este estudo foi o tempo de incubação. A solução foi preparada para uma concentração de $7,2 \text{ mg.L}^{-1}$. As medidas eletroquímicas ocorreram após 10 minutos de reação em $50 \text{ }\mu\text{L}$ de solução $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de ASChI em fosfato $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,4. O tempo de 0 minuto é referente ao controle (FIGURA 4.21).

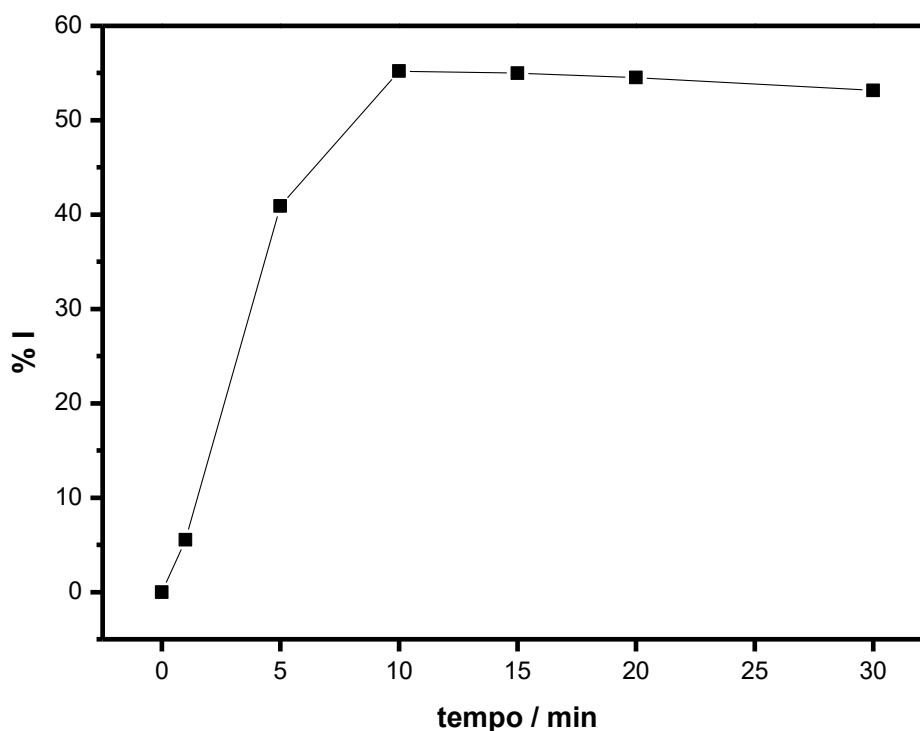


FIGURA 4.21- Efeito dos tempos de incubação do extrato *Toona* nas correntes de pico de oxidação da tiocolina calculado pela porcentagem de inibição. Solução de ASChI $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$. $[\text{AChE}] = 5 \times 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$. Amplitude = 50 mV ; $f = 50 \text{ Hz}$.

Percebe-se um tempo de reação mais rápido comparado aos extratos anteriores, com 40% de corrente de inibição em apenas 5 minutos de incubação e 55% a partir de 10 minutos. Considerando os desvios padrões, é razoável afirmar que a partir de 10 minutos a corrente tende a estabilizar. De forma que, 10 minutos foi o tempo escolhido para o estudo de variação de concentração.

4.8.2 Resposta da atividade inibitória em função da variação do extrato de *Toona ciliata*

A FIGURA 4.22 apresenta a correlação entre a porcentagem de inibição enzimática e a variação das seguintes concentrações do extrato de *Toona*: 0,72 mg.L⁻¹; 1,4 mg.L⁻¹; 2,8 mg.L⁻¹; 4,3 mg.L⁻¹ e 5,7 mg.L⁻¹. As correntes foram medidas por SWV após 10 minutos de reação com o substrato, com tempo de incubação de 10 minutos para as concentrações. O tempo de 0 minuto é referente ao controle.

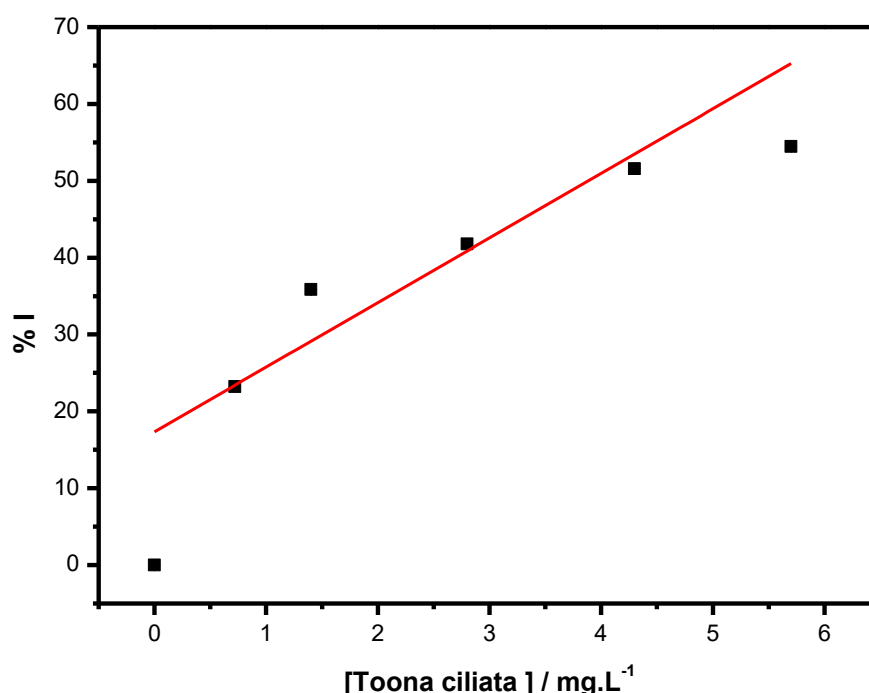


FIGURA 4.22- Gráfico de correlação entre a porcentagem de inibição e a variação de concentração do extrato de *Toona ciliata*. Solução de ASChI $5,82 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹ em tampão fosfato 0,01 mol.L⁻¹. [AChE]= 5×10^{-2} mg.mL⁻¹. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.

O extrato de *Toona* apresenta maior porcentagem de inibição comparado aos extratos de *Picramnia* e do composto Azadiractina no que se refere a menor concentração testada, 0,72 mg.L⁻¹, obtendo 23,21% e conseguindo inibir a enzima em 50% na concentração de 4,3 mg.L⁻¹ (FIGURA 4.22). A rápida ação de inibição do estudo anterior (10 minutos de incubação) e uma significativa porcentagem em concentrações menores pode indicar um composto responsável por esta atividade sobre a AChE, uma vez que inseticidas como Clorpirifós e Sarin, que agem sobre a proteína, foram aplicados sobre SPEs com tempos similares de incubação (10 e 5 minutos respectivamente) e obtiveram boa inibição mesmo em soluções de baixa concentração^{68,73}. Para este teste com o extrato de *Toona* o valor de R é 0,966.

4.8.3 Espectroscopia por RMN do extrato de *Toona ciliata*

Para averiguar alguma possível classe de composto natural, o espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.23) foi obtido em CDCl_3 para este extrato:

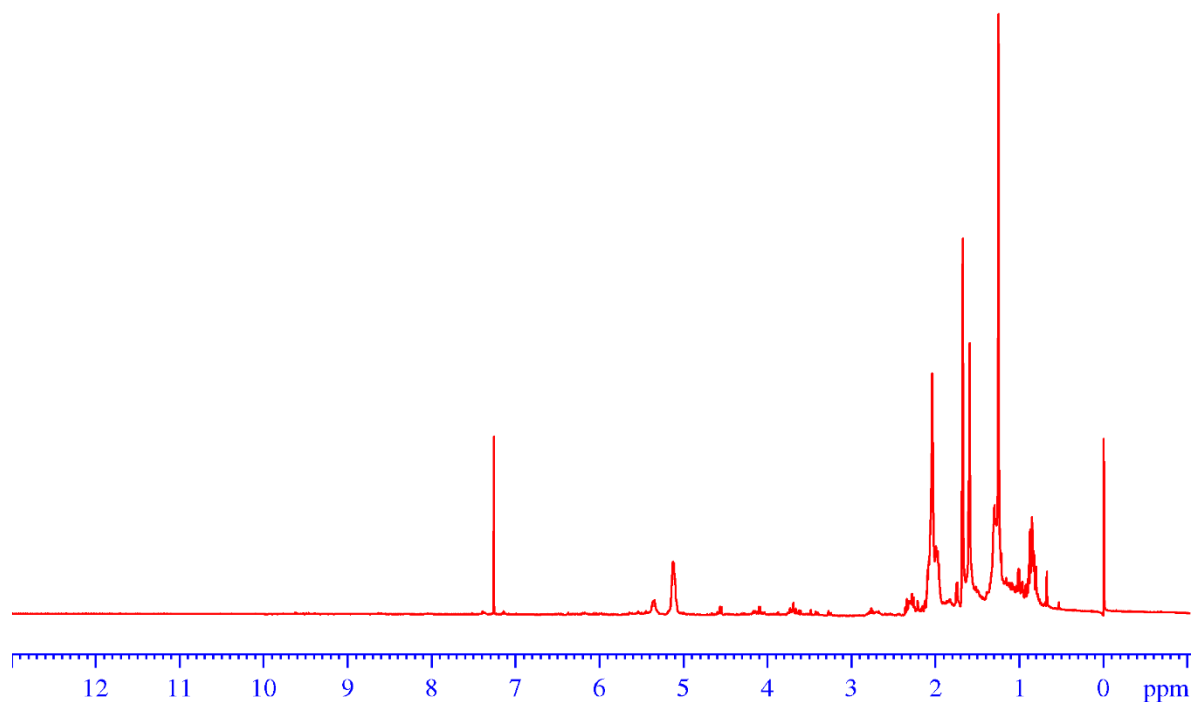


FIGURA 4.23- Espectro de RMN de ^1H do extrato de *Toona* em CDCl_3 (400 MHz).

A classe de produtos naturais limonóides isolados de *Toona* está bem identificada e elucidada na literatura, o gênero também possui a identificação de cumarinas e flavonóides^{98,99}. Analisando regiões próprias para estas classes, sinais de hidrogênios metilas e hidrogênios de furano presentes em limonóides foram observados (FIGURA 4.24).

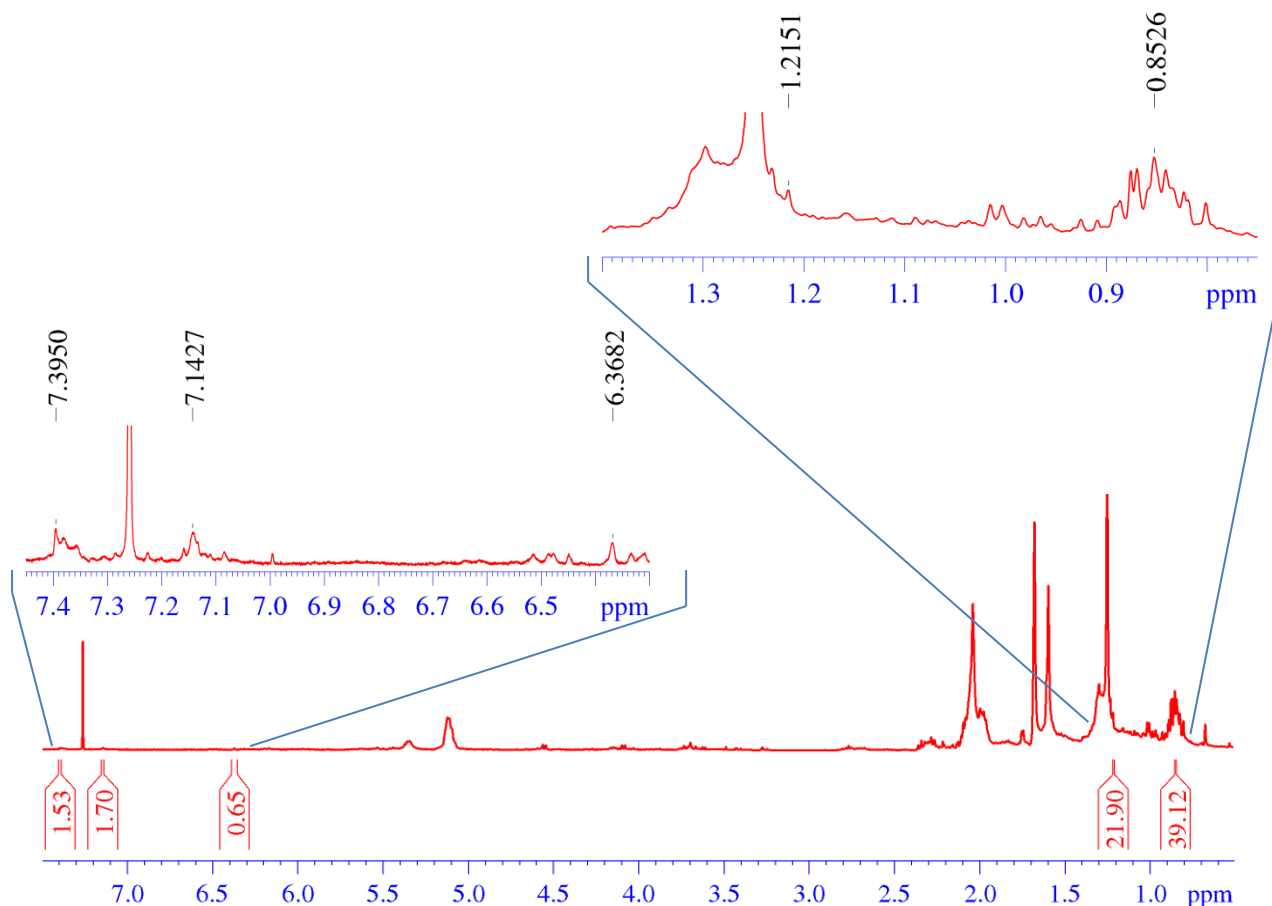


FIGURA 4.24- Espectro de RMN de ¹H com destaques nas regiões características para limonóides (400 MHz). Valores de integrais abaixo das curvas do espectro, deslocamentos químicos acima das curvas.

Os sinais em 7,39, 7,14 e 6,36 ppm pertencem aos hidrogênios do anel furano, nas posições 21, 23 e 22 (numeração usual para os carbonos deste anel) respectivamente (FIGURA 4.25). Deslocamentos similares para estes hidrogênios já foram observados na literatura^{100,101,102}. Sinais entre 1,21 e 0,85 ppm, em comparação com a literatura, são referentes aos hidrogênios metilas encontrados na estrutura de limonóides^{102,103,104}.

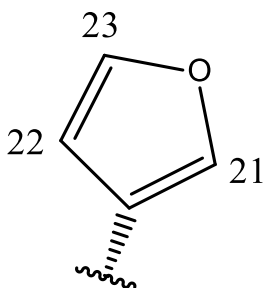


FIGURA 4.25- Estrutura de anel furano com as numerações usais para os carbonos presentes no mesmo.

4.9 Ensaio de inibição do crescimento *Atta sexdens rubropilosa*

O extrato bruto metanólico e éter de petróleo de folhas de *Picramnia riedelli* (PRM) e etanólico de folhas e galhos de *Picramnia ciliata* (PFE e PGE) foram ensaiados frente as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* conforme descrito no item 3.10. Para analisar os dados obtidos foram delineadas as curvas de sobrevivência das formigas submetidas ao tratamento por ingestão dos extratos incorporados à dieta, após período de 25 dias, em comparação com a curva para o controle, que contém apenas a dieta pura. Os resultados para os três extratos de *Picramnia* estão apresentados nos gráficos contidos nas FIGURAS 4.26 e 4.27, TABELAS 4.4 e 4.5.

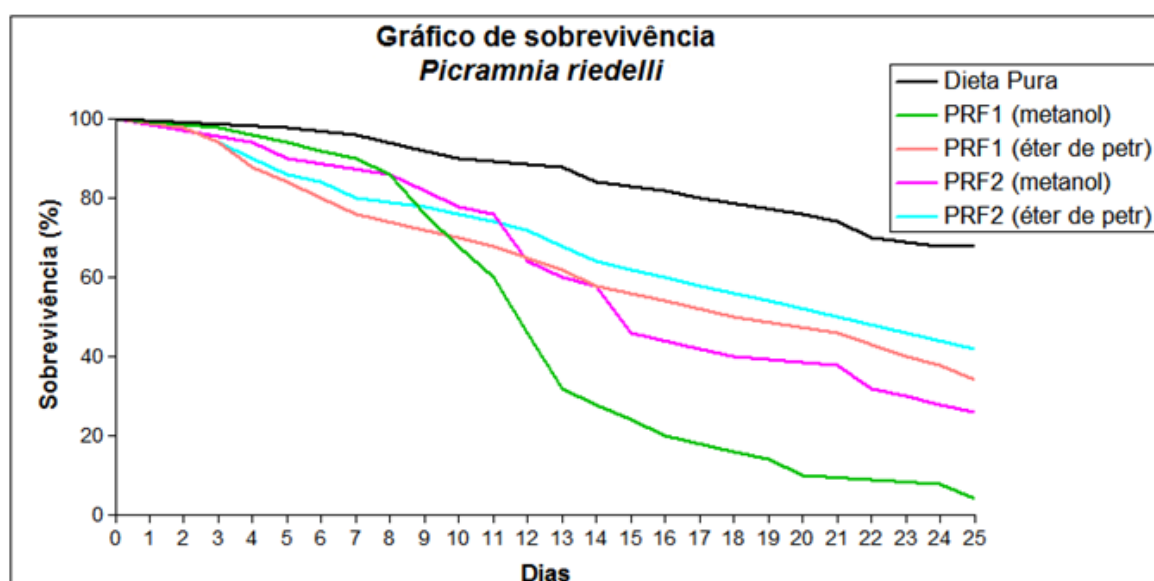


FIGURA 4.26- Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Picramnia riedelli* nas concentrações PRF1 (metanol) $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, PRF2 (metanol) $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, PRF1 (éter de petróleo) $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e PRF2 (éter de petróleo) $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$.

TABELA 4.4- Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Picramnia riedelli* nas concentrações nas concentrações PRF1 (metanol) 2,0 mg.mL⁻¹, PRF2 (metanol) 1,0 mg.mL⁻¹, PRF1 (éter de petróleo) 2,0 mg.mL⁻¹ e PRF2 (éter de petróleo) 1,0 mg.mL⁻¹.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	2	4	10	16	20	26	32	25a
PRF1 (met) 2,0 mg.mL ⁻¹	0	0	2	8	14	32	72	80	90	96	12b
PRF1 (ét p) 2,0 mg.mL ⁻¹	0	2	6	20	24	30	42	46	54	66	19,5b
PRF2 (met) 1,0 mg.mL ⁻¹	0	0	0	10	14	22	42	60	64	76	15b
PRF2 (ét p) 1,0 mg.mL ⁻¹	0	2	6	16	20	24	36	42	50	58	21b

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" (p< 0,05).

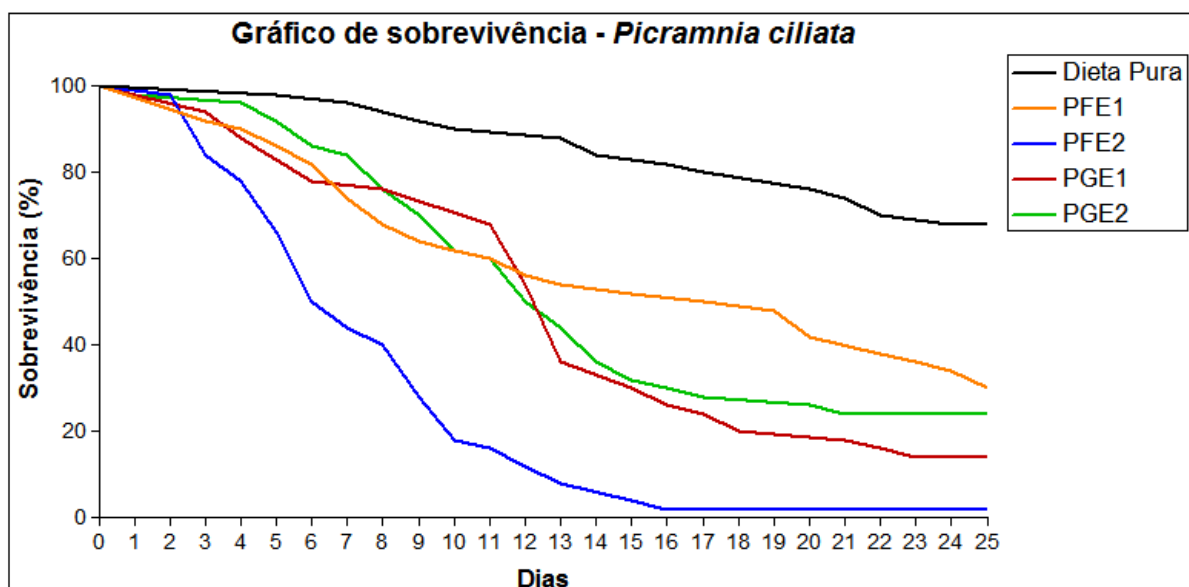


FIGURA 4.27- Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Picramnia ciliata* nas concentrações PFE1 1 mg.mL⁻¹, PFE2 2 mg.mL⁻¹, PGE1 2 mg.mL⁻¹ e PGE2 1 mg.mL⁻¹.

TABELA 4.5- Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Picramnia ciliata* concentrações PFE1 1 mg.mL⁻¹, PFE2 2 mg.mL⁻¹, PGE1 2 mg.mL⁻¹ e PGE2 1 mg.mL⁻¹.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	2	4	10	16	20	26	32	25 a
PFE1 1 mg.mL ⁻¹	0	0	8	18	32	38	46	50	58	70	17 b
PFE2 2 mg.mL ⁻¹	0	2	16	50	60	82	92	98	98	98	7 b
PGE1 2 mg.mL ⁻¹	2	2	6	22	24	24	64	76	82	84	13 b
PGE2 1 mg.mL ⁻¹	2	2	2	14	24	38	64	72	76	76	12,5 b

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank” (p< 0,05).

Dos extratos do gênero *Picramnia* observa-se que após 25 dias de tratamento, o extrato etanólico da espécie *ciliata* apresentou 98% de mortalidade e o extrato metanólico da espécie *riedelli* obteve 96% de mortalidade frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*, permitindo assim a escolha destes para os testes de atividade inibitória na AChE, como possível explicação de mecanismo de ação na formiga cortadeira.

O extrato hexânico de folhas de *Toona ciliata* também foi avaliado com porcentagem de mortalidade sobre a *A. sexdens rubropilosa*, as curvas de sobrevivência das formigas submetidas ao tratamento bem como a porcentagem de mortalidade por dia do bioensaio estão representados na FIGURA 4.28 e na TABELA 4.6.

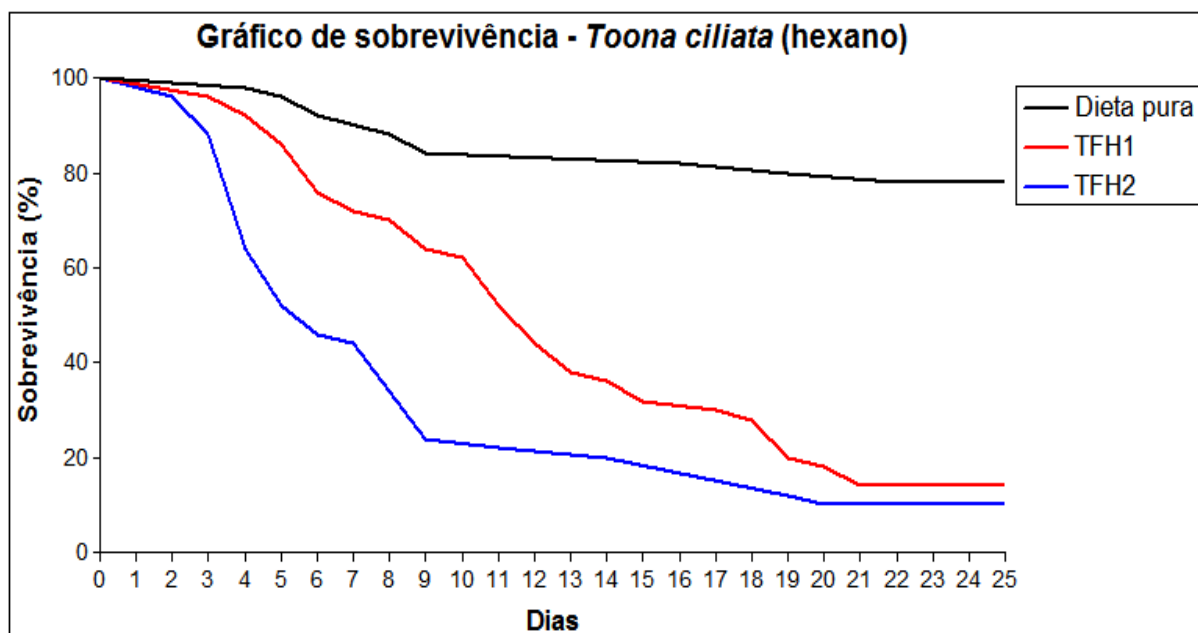


FIGURA 4.28- Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Toona ciliata* (hexano) nas concentrações TFH1 1 mg.mL⁻¹ e TFH2 2 mg.mL⁻¹.

TABELA 4.6- Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Toona ciliata* (hexano) nas concentrações TFH1 1 mg.mL⁻¹ e TFH2 2 mg.mL⁻¹.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	8	12	16	16	18	20	22	25a
TFH1 1 mg.mL ⁻¹	0	0	4	24	30	38	64	70	86	86	12b
TFH2 2 mg.mL ⁻¹	0	4	12	54	66	76	80	80	90	90	6b

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank” (p< 0,05).

Conforme a TABELA 4.6, o extrato de *Toona* apresenta 90% de mortalidade nas operárias das formigas cortadeiras, justificando o uso deste para os ensaios nos biossensores de acetilcolinesterase.

4.10 Ensaio de inibição do crescimento micelial de *Leucoagaricus gongylophorus*

O extrato bruto metanólico de folhas de *Picramnia riedelli* (PRM), etanólico de folhas e galhos de *Picramnia ciliata* (PFE e PGE) e o extrato hexânico de folhas de *Toona ciliata* (TFH) foram ensaiados frente o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* conforme a metodologia descrita no item 3.9. As concentrações para cada amostra foram as seguintes: PRM 1 mg.mL⁻¹ ; PFE 1,27 mg.mL⁻¹; PGE 1,13 mg.mL⁻¹; TFH 1,26 mg.mL⁻¹. Após 30 dias de tratamento da cultura do fungo com cada extrato no meio, a porcentagem de inibição em relação ao controle foi calculada e está representada na TABELA 4.7.

TABELA 4.7: Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *L. gongylophorus* após 30 dias do experimento.

Extratos	PRM	PFE	PGE	TFH	*Controle (Acetona)
Média	9,14	12,71	8,28	12,63	14,95
SD	0,48	0,27	0,90	0,37	0,29
RSD	5,27	2,15	10,97	2,96	1,98
Inibição	24%	15%	32%	15%	-

Analisando os dados obtidos deste bioensaio, percebe-se que os extratos não apresentaram resultados significativos, com porcentagens abaixo de 32%, indicando a priori que os mesmos não possuem atividade fungicida.

5 CONCLUSÃO

A proposta de fabricação de um biossensor modificado para a imobilização da enzima acetilcolinesterase, e determinação de potenciais inibidores da mesma, foi alcançado neste projeto.

O uso da técnica *layer-by-layer* é amplamente aplicado em estudos enzimáticos eletroquímicos, com diversas combinações de componentes para a imobilização da enzima alvo. A utilização das AUNPs-GSH neste trabalho não somente aumenta a condutividade e sensibilidade do microeletrodo, como também estabelece a ligação covalente através da formação de uma ligação amida entre os grupos carboxílicos ativados da glutatona com os grupos amins dos aminoácidos da proteína. Esta ligação só é possível com a etapa de reação EDC-HOBt, sendo o HOBt essencial para este trabalho, uma vez que o uso do NHS não foi eficiente para a AChE nas condições utilizadas para a imobilização.

O biossensor mostrou-se aplicável para a determinação de atividades inibitórias frente a AChE. A Azadiractina, um composto natural, que já teve atividade sobre a AChE relatada, foi utilizado como padrão de inibição para os extratos que foram testados em sequência, e como esperado, apresentou porcentagem de inibição mesmo em concentrações baixas.

Os extratos de *Picramnia riedelli* e *P. ciliata* apresentaram atividade similar. Estas atividades demandam investigações sobre os possíveis compostos responsáveis pelas mesmas. O espectro de RMN de ^1H para estes extratos indicam a presença de antraquinona, ácidos graxos e isoprenóides.

O extrato de *Toona ciliata* apresentou uma rápida ação sobre a AChE, com 55% de inibição em 10 minutos de incubação. Deslocamentos característicos de partes de estrutura de limonóides foram identificados por espectro de RMN de ^1H . A rápida e forte inibição deste extrato indica um estudo mais detalhado para identificar o(s) composto(s) responsável(eis) por este mecanismo de ação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CNA Brasill. Agronegócio fecha 2017 com alta produção e preços em baixa refletindo em menor renda no setor. Disponível em: https://www.cnabrasil.org.br/agronegocio-fecha-2017-com-alta-producao-e-precos-em-baixa-refletindo-em-menor-renda-no-setor#_ftn1. Acessado em 18/03/2019.
2. FAO. Country fact sheet on food and agriculture policy trends. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i3759e/i3759e.pdf>. Acessado em 18/03/2019.
3. RIBEIRO, L. P.; VENDRAMIM, J. D.; BICALHO, K. U.; ANDRADE, M. S.; FERNANDES, J. B.; MORAL, R. A.; DEMÉTRIO, C. G. B. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): A promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 55, p. 6–14, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jspr.2013.06.001>>.
4. RIBEIRO, L. P.; VENDRAMIM, J. D.; GONÇALVES, G. L. P.; ANSANTE, T. F.; GLORIA, E. M.; LOPES, J. C.; MELLO-SILVA, R.; FERNANDES, J. B. Searching for promising sources of grain protectors in extracts from Neotropical Annonaceae. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 15, n. 4, p. 215–232, 2016.
5. RIBEIRO, L. P.; VENDRAMIM, J. D.; ANDRADE, M. S.; BICALHO, K. U.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C., FERNANDES, J. B. Tropical Plant Extracts as Sources of Grain-Protectant Compounds Against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 43, n. 5, p. 470–482, 2014.
6. UDO, I. O. Phytochemical screening of *Dracaena arborea* (Asparagaceae) for insecticidal activity in the control of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 33, n. 2, p. 136–143, 2013.
7. CAMAROTI, J. R. S. L.; DE ALMEIDA, W. A.; DO REGO BELMONTE, B.; OLIVEIRA, A. P. S.; LIMA, T. A.; FERREIRA, M. R. A.; PAIVA, P. M. G.; SOARES, L. A. L.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.. *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (StELL). **Industrial Crops and Products**, v. 116, n. February, p. 81–89, 2018.
8. CHU, S. S.; DU, S. S.; LIU, Z. L. Fumigant compounds from the essential oil of Chinese *Blumea balsamifera* leaves against the Maize Evil (*Sitophilus zeamais*). **Journal of Chemistry**, v. 2013, Article ID 289874, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/289874>.
9. MATOS, A. P.; LEITE, A. C.; BATISTA-PEREIRA, L. G.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. Effects of limonoids from *Cipadessa fruticosa* on fall armyworm. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 64, n. 5–6, p. 441–446, 2009.
10. NEBO, L.; MATOS, A. P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. Atividade inseticida dos frutos de *Trichilia clausenii* (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda*. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1849-1852, 2010.

11. MATOS, A. P.; MYAMOTO, D. T.; ALVES, A. R.; LEITE, A. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. Atividade de *Cedrelela fissilis* e *Cipadessa fruticosa* (Meliaceae) sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **BioAssay**, v. 5, n. 0, p. 1–7, 2010.
12. MATOS, A.; NEBO, L.; CALEGARI, E. R.; BATISTA-PEREIRA, L.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; FILHO, P. F.; RODRIGUES, R. R. Atividade Biológica de Extratos Orgânicos de *Trichilia* sp (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Dieta Artificial. **BioAssay**, v. 1, n. 0, p. 1–6, 2009.
13. RIBEIRO, S. S.; DA SILVA, T. B.; DE SOUZA MORAES, V. R.; NOGUEIRA, P. C. L.; COSTA, E. V.; BERNARDO, A. R.; MATOS, A. P.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; PESSOA, A. M. S.; SILVA-MANN; R. Chemical constituents of methanolic extracts of *Jatropha curcas* L and effects on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Quimica Nova**, v. 35, n. 11, p. 2218–2221, 2012.
14. MATOS, A. P.; NEBO, L.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *Trichilia catigua* (Meliaceae). **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1553–1556, 2009.
15. SARRIA, A. L. F.; SOARES, M. S.; MATOS, A. P.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Effect of triterpenoids and limonoids isolated from *Cabralea canjerana* and *Carapa guianensis* (Meliaceae) against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 66 C, n. 5–6, p. 245–250, 2011.
16. GALLO, M. B. C.; ROCHA, W. C.; CUNHA, U. S.; DIOGO, F. A.; SILVA, F. C.; VIEIRA, P. C.; VENDRAMIM, J. D.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; BATISTA-PEREIRA, L. G. Bioactivity of extracts and isolated compounds from *Vitex polygama* (Verbenaceae) and *Siphoneugena densiflora* (Myrtaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 62, p. 1072-1081, 2006.
17. BATISTA PEREIRA, L. G.; PETACCI, F.; FERNANDES, J. B.; CORREA, A.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; MALASPINA; O. Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* against *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science**, v. 58, n. 5, p. 503–507, 2002.
18. FORIM, M. R.; COSTA, E. S.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; MONDEGO, J. M.; JUNIOR, A. L. B. Development of a new method to prepare nano-/microparticles loaded with extracts of *Azadirachta indica*, their characterization and use in controlling *Plutella xylostella*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 38, p. 9131–9139, 2013.
19. YANG, H.; PIAO, X.; ZHANG, L.; SONG, S.; XU, Y. Ginsenosides from the stems and leaves of *Panax ginseng* show antifeedant activity against *Plutella xylostella* (Linnaeus). **Industrial Crops and Products**, v. 124, n. 2888, p. 412–417, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.054>>.
20. YANG, R.; XU, T.; FAN, J.; ZHANG, Q.; DING, M.; HUANG, M.; DENG, L.; YUCHAO, L.; GUO, Y.. Natural products-based pesticides: Design, synthesis and pesticidal activities of novel fraxinellone derivatives containing N-phenylpyrazole

moiety. **Industrial Crops and Products**, v. 117, n. February, p. 50–57, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.088>>.

21. JI, X.; GUO, J.; LIU, Y.; LU, A.; WANG, Z.; LI, Y. Marine-Natural-Product Development: First Discovery of Nortopsentin Alkaloids as Novel Antiviral, Anti-phytopathogenic-Fungus, and Insecticidal Agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 16, p. 4062–4072, 2018.

22. WEBSTER, A. E.; MANNING, P.; SPROULE, J. M.; NICOLETTA, F.; CUTLER, G. C. Insecticidal and synergistic activity of two monoterpenes against diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Canadian Entomologist**, v. 150, n. 2, p. 258–264, 2018.

23. AGROLINK. RS proíbe uso da sulfluramida. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/noticias/rs-proibe-uso-da-sulfluramida_405223.html. Acessado em 25/03/2019.

24. TEREZAN, A. P.; ROSSI, R. A.; ALMEIDA, R. N. A.; FREITAS, T. G.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; PIRANI, J. R. Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 882–886, 2010.

25. MARSARO, A. L.; SOUZA, R. C.; DELLA LUCIA, T. M. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. Behavioral changes in workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical components of *Eucalyptus maculata* leaves. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 9, p. 1771–1780, 2004.

26. BIGI, M. F. M. A.; TORKOMIAN, V. L. V.; DE GROOTE, S. T. C. S.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O.; PAGNOCCA, F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Activity of *Ricinus communis* (euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (hymenoptera: formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. **Pest Management Science**, v. 60, n. 9, p. 933–938, 2004.

27. PEÑAFLORES, M. F. G. V.; ALMEIDA, R. N. A.; SIMOTE, S. Y.; YAMANE, E.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; PAGNOCCA, F. Toxicity of substances isolated from *Simarouba versicolor* St. Hil. (Simaroubaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay**, v. 4:1, p. 7, 2009.

28. BIAVATTI, M. W.; WESTERLON, R.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; PEÑAFLORES, M. F. G. V.; BUENO, O.; ELLENA, J. Leaf-cutting ants toxicity of limonexic acid and degraded limonoids from *Raulinoa echinata*. X-ray structure of epoxy-fraxinellone. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6 B, p. 1443–1447, 2005.

29. LEITE, A. C.; BUENO, F. C.; OLIVEIRA, C. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O.; PAGNOCCA, F.; HEBLING, M. J. A.; JUNIOR, M. B. Limonoids from *Cipadessa fruticosa* and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6 B, p. 1391–1395, 2005.

30. ALMEIDA, R.; PEÑAFLORES, M.; SIMOTE, S.; BUENO, O.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Toxicity of Substances Isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the Leaf-cutting Ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the Symbiotic Fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay**, v. 2, n. 0, p. 1–8, 2009.
31. PEÑAFLORES, M. F. G. V.; VICTOR, S.R.; BUENO, O.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F.; LEITE, A. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Toxicity of straight-chain fatty acids to leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. **Sociobiology**, v. 47, n.3, p. 843-858, 2006.
32. PAGNOCCA, F. C.; VICTOR, S. R.; BUENO, F. C.; CRISÓSTOMO, F. R.; CASTRAL, T. C.; FERNANDES, João Batista; CORRÊA, Arlene G.; BUENO, Odair; BACCI, Maurício; HEBLING, MARIA J. A.; VIEIRA, Paulo César; SILVA, Maria Fátima das Graças Fernandes. Synthetic amides toxic to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* L. and its symbiotic fungus. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 8, n. 1, p. 17–23, 2006.
33. VICTOR, S. R.; CRISÓSTOMO, F. R.; BUENO, F. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; CORRÊA, A. G.; BUENO, O.; BACCI, M.; HEBLING, M. J. A.; BACCI, M.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Toxicity of synthetic piperonyl compounds to leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. **Pest Management Science**, v. 57, n. 7, p. 603–608, 2001.
34. ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: A pharmacological interesting enzyme. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.
35. BOURNE, Y.; GRASSI, J.; BOUGIS, P. E.; MARCHOT, P. Conformational flexibility of the acetylcholinesterase tetramer suggested by x-ray crystallography. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 43, p. 30370–30376, 1999.
36. PATOCKA, J.; JIRI, C.; KUČA, K.; DANIEL, J.; Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus ester: In vitro kinetics and thermodynamics. **Journal of applied biomedicine**, v. 3, p. 91-99, 2005.
37. QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States. **Chemical Reviews**, v. 87, n. 5, p. 955–979, 1987.
38. CHIERRITO, T. P. Cantuária. Síntese de potencial inibidor de acetilcolinesterase para tratamento da Doença de Alzheimer. **Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas**, Universidade de São Paulo, 2016.
39. SZEGLETES, T.; MALLENDER, W. D.; THOMAS, P. J.; ROSENBERG, T. L. Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. **Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 122–133, 1999.
40. SHAFFERMAN, A.; BARAK, D.; KAPLAN, D.; ORDENTLICH, A.; KRONMAN, C.; VELAN, B. Functional requirements for the optimal catalytic configuration of the AChE active center. **Chemico-Biological Interactions**, v. 157–158, p. 123–131, 2005.

41. MATOS, S. K. Aspectos moleculares da reativação da acetilcolinesterase inibida por ciclosarin e carbofurano. **Dissertação de Mestrado em Agroquímica**, Universidade Federal de Lavras, 2012.
42. OBREGON, A. D. C. 3-alcoxi-4-hidroxi pirrolidin-2-onas, 2-metilsulfanil pirimidina, enoilcarbamatos e 3-dialcoxi fosforiloxi trialometilados: síntese e potencial inibitório sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase. **Tese de Doutorado em Química Orgânica**, Universidade Federal de Santa Maria, 2006.
43. LOURENÇO VANZOLINI, K.; JIANG, Z.; ZHANG, X.; VIEIRA, L. C.; GONÇALVES, A. C.; CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B.; MOADDEL, R. Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors coupled to protein coated magnetic beads: A new tool for plant extract ligand screening. **Talanta**, v. 116, p. 647–652, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.07.046>>.
44. PUNDIR, C. S.; CHAUHAN, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. **Analytical Biochemistry**, v. 429, n. 1, p. 19–31, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.06.025>>
45. VANZOLINI, K. L.; VIEIRA, L. C. C.; CORREIA, A. G.; CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B. Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors-tandem mass spectrometry: An on-flow tool for ligand screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 2038–2044, 2013.
46. TANG, Z.; WANG, T.; KANG, J. Immobilized capillary enzyme reactor based on layer-by-layer assembling acetylcholinesterase for inhibitor screening by CE. **Electrophoresis**, v. 28, n. 17, p. 2981–2987, 2007.
47. AHMAD, W.; AHMAD, B.; AHMAD, M.; IQBAL, Z.; NISAR, M.; AHMAD, M. In vitro Inhibition of Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Lipoyxygenase by Crude Extract of *Myricaria elegans* Royle. **Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 11, p. 1046-1049, 2003.
48. YANES, C. V. I.; DE MELO FILHO, A. A.; RIBEIRO, P. R. E.; MELO, A. C. G. R.; TAKAHASHI, J. A.; FERRAZ, V. P.; MOZOMBITE, D. M. S.; SANTOS, R. C. Inhibition of acetylcholinesterase and fatty acid composition in *Theobroma grandiflorum* seeds. **Orbital**, v. 9, n. 3, p. 127–130, 2017.
49. HA, J.; MD, A.; JUNG, H. J.; JEONG, H. O.; CHUNG, H. Y.; CHOI, J. S. Inhibitory activities of major anthraquinones and other constituents from *Cassia obtusifolia* against β -secretase and cholinesterases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 15, n. 191, p. 152-160, 2016.
50. DZOYEM, J. P.; TSAMO, A. T.; MELONG, R.; MKOUNGA, P.; NKENGFACK, A. E.; MCGAW, L. J.; ELOFF J. N. Cytotoxicity, nitric oxide and acetylcholinesterase inhibitory activity of three limonoids isolated from *Trichilia welwitschii* (Meliaceae). **Biological Research**, v. 48, 2015.
51. LÓPEZ, M. D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 284–288, 2010.

52. MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 51-54, 2002.
53. LI, R. S.; WANG, X. B.; HU, X. J.; KONG L. Y. Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potential multifunctional acetylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 9, p. 2636–2641, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.02.095>>.
54. ANDREESCU, S.; MARTY, J. L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. **Biomolecular Engineering**, v. 23, n. 1, p. 1–15, 2006.
55. SONGA, E. A.; AROTIBA, O. A.; OWINO, J. H.; JAHED, N.; BAKER, P. G., IWUOHA, E. I. Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. **Bioelectrochemistry**, v. 75, n. 2, p. 117–123, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.02.007>>.
56. CALIL, S. S.; QUEIROZ, P. R. Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade. **Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC Goiás**, v. 1, p. 1-20, 2011.
57. PUNDIR, C. S.; CHAUHAN, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. **Analytical Biochemistry**, v. 429, n. 1, p. 19–31, 2012.
58. MACHADO, D. F. Biossensores impressos baseados em peroxidase imobilizada em nanofios de titanato. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.
59. SILVA, T. R. Desenvolvimento de eletrodos nanoestruturados para a determinação de dopamina e levodopa em fármacos. **Tese de Doutorado em Química Analítica**, Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.
60. DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.
61. BENITES, T. A.; RIBEIRO, W. C.; GÓES, M. S.; FERREIRA, A. A. P.; BUENO, P. R. Efeitos da rugosidade superficial nas propriedades de passivação de monocamadas orgânicas automontadas. **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1533–1537, 2014.
62. MARTY, J. L.; MIONETTO, N.; NOGUER, T.; ORTEGA, F.; ROUX, C. Enzyme sensors for the detection of pesticides. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 8, n. 6, p. 273–280, 1993.
63. STEIN, K.; SCHWEDT, G. Comparison of immobilization methods for the development of an acetylcholinesterase biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 272, n. 1, p. 73–81, 1993.
64. IVANOV, Y.; MARINOV, I.; GABROVSKA, K.; DIMCHEVA, N.; GODJEVARGOVA, T. Amperometric biosensor based on a site-specific immobilization of acetylcholinesterase via affinity bonds on a nanostructured polymer membrane with

integrated multiwall carbon nanotubes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 63, n. 3–4, p. 141–148, 2010.

65. MARINOV, I.; IVANOV, Y.; GABROVSKA, K.; GODJEVARGOVA, T. Amperometric acetylthiocholine sensor based on acetylcholinesterase immobilized on nanostructured polymer membrane containing gold nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 66–74, 2010.

66. VISWANATHAN, S.; RADECKA, H.; RADECKI, J. Electrochemical biosensor for pesticides based on acetylcholinesterase immobilized on polyaniline deposited on vertically assembled carbon nanotubes wrapped with ssDNA. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 9, p. 2772–2777, 2009.

67. DU, D.; YE, X.; CAI, J.; LIU, J.; ZHANG, A. Acetylcholinesterase biosensor design based on carbon nanotube-encapsulated polypyrrole and polyaniline copolymer for amperometric detection of organophosphates. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 11, p. 2503–2508, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.04.018>>.

68. UPADHYAY, S.; RAO, G. R.; SHARMA, M. K.; BHATTACHARYA, B. K.; RAO, V. K.; VIJAYARAGHAVAN, R. Immobilization of acetylcholinesterase-choline oxidase on a gold-platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates and nerve agents. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 4, p. 832–838, 2009.

69. NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por “silk-screen”. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 614–629, 1998.

70. PEVERARI, C. R. Desenvolvimento de um imunossensor descartável acoplado a um sistema microfluídico para determinação de um biomarcador tumoral. **Dissertação de Mestrado em Química Analítica**, Universidade Federal de São Carlos, 2016.

71. SHI, M.; XU, J.; ZHANG, S.; LIU, B.; KONG, J. A mediator-free screen-printed amperometric biosensor for screening of organophosphorus pesticides with flow-injection analysis (FIA) system. **Talanta**, v. 68, n. 4, p. 1089–1095, 2006.

72. BUCUR, B.; FOURNIER, D.; DANET, A.; MARTY, J-L. Biosensors based on highly sensitive acetylcholinesterases for enhanced carbamate insecticides detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 562, n. 1, p. 115–121, 2006.

73. BONNET, C.; ANDREESCU, S.; MARTY, J-L. Adsorption: An easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 481, n. 2, p. 209–211, 2003.

74. LASCHI, S.; OGOŃCZYK, D.; PALCHETTI, I.; MASCINI, M. Evaluation of pesticide-induced acetylcholinesterase inhibition by means of disposable carbon-modified electrochemical biosensors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 485–489, 2007.

75. IVANOV, A. N.; YOUNUSOV, R. R.; EVTUGYN, G. A.; ARDUINI, F.; MOSCONE, D.; PALLESCI, G. Acetylcholinesterase biosensor based on single-walled carbon nanotubes-Co phtalocyanine for organophosphorus pesticides detection. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 216–221, 2011.

76. ALBAREDA-SIRVENT, M.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. Pesticide determination in tap water and juice samples using disposable amperometric biosensors made using thick-film technology. **Analytica Chimica Acta**, v. 442, n. 1, p. 35–44, 2001.
77. BRINK, B. D.; DEFRANCISCO, J. R.; HILLNER, J. A.; LINTON, B. Curtin-Hammett and steric effects in HOBt acylation regiochemistry. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 13, p. 5258–5263, 2011.
78. FIORAMONTE, M.; DE JESUS, H. C. R.; FERRARI, A. J. R.; LIMA, D. B.; DREKENER, R. L.; CORREIA, C. R. D.; OLIVEIRA, L. G.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; CARVALHO, P. C.; GOZZO, F. C. XPlEx: An Effective, Multiplex Cross-Linking Chemistry for Acidic Residues. **Analytical Chemistry**, v. 90, p. 6043-6050, 2018.
79. SANTOS, A. C. A. Estudo químico e ecológico de *Escovopsis* spp., invasor do jardim de fungos de formigas cortadeiras. **Tese de Doutorado em Química Orgânica**, Universidade Federal de São Carlos, 2018.
80. BUENO, O. C. Formigas Urbanas: Identificação e Controle. **BIOLÓGICO**, v. 59, n.2, p. 17-19, 1997.
81. BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods. Fundamentals and applications**, 2^o ed., p. 226-260, 2001.
82. TEIXEIRA, P. R. Estrutura e propriedades de nanopartículas de ouro sintetizadas na presença de polímeros. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Brasília, 2016.
83. HARRIS, A. R.; MOLINO, P. J.; KAPSA, R. M. I.; CLARK, G. M.; PAOLINI, A. G.; WALLACE, G. G. Optical and electrochemical methods for determining the effective area and charge density of conducting polymer modified electrodes for neural stimulation. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 738–746, 2015.
84. MARTINEZ, M. T. Desenvolvimento de biossensores de pasta de carbono e de pasta de nanotubos de carbono modificados com a enzima acetilcolinesterase para a detecção de pesticidas da classe carbamatos. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, 2011.
85. DRAGUNSKI, J. C. Desenvolvimento e testes de eletrodos modificados com enzimas colinesterase como sensor para a detecção de pesticidas em matrizes de alimento. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, 2007.
86. SANTOS, C. S. Desenvolvimento de diferentes dispositivos eletroquímicos a base de ouro aplicados como sensores e biossensores. **Tese de Doutorado em Química Inorgânica**, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2016.
87. ERONE, C. A. S.; CAPOBIANCO, M. P.; PAPARELI, J. S. Determination of polyphenols (tanines) in foods products (teas) using a biosensor of Polyphenol oxidase , obtained of crude extract of banana nanica peel (*Musa acuminata*) and characterization this biosensor. **Revista do Instituto de Ciência da Saúde**, v. 27, n. 1, p. 28–34, 2009.
88. PANDEY, P. C.; UPADHYAY, S.; PATHAK, H. C.; PANDEY, C.M.D.; TIWARI, I.

Acetylthiocholine/acetylcholine and thiocholine/choline electrochemical biosensors/sensors based on an organically modified sol-gel glass enzyme reactor and graphite paste electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 62, n. 2, p. 109–116, 2000.

89. SENTHIL-NATHAN, S.; MAN, Y. C.; HONG, Y. S.; CHAE, H. P.; KANDASWAMY, K.; JAE, D. K. Effect of Azadirachtin on acetylcholinesterase (AChE) activity and histology of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, p. 244-250, 2008.

90. SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 35, 271-297, 1990.

91. DIAZ, Fredyc; CHAI, Hee Byung; MI, Qiuwen; *et al.* Anthrone and Oxanthrone C-Glycosides from *Picramnia latifolia* Collected in Peru. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 3, p. 352–356, 2004.

92. HERNANDEZ-MEDEL, M. R.; GARCIA-SALMONES, I.; SANTILLAN, R.; TRIGOS, A. An anthrone from *Picramnia antidesma*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2599–2601, 1998.

93. RODRÍGUEZ-GAMBOA, T.; FERNANDES, J. B.; RODRIGUES FILHO, E.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; BARRIOS, M. C.; CASTRO-CASTILLO, O.; VICTOR, S. R.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Triterpene Benzoates from the Bark of *Picramnia teapensis* (Simaroubaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 3, p. 386–390, 2001.

94. HERNANDEZ-MEDEL, M. R.; MÉNDEZ-OLIVARES, R.; SOLÍS-FUENTES, J. A.; MÉNDEZ-VENTURA, L. M. Characterization and Biological Activity of Fatty Acids From *Picramnia polyantha* Fruits. **Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana**, n. June, p. 262–269, 2009.

95. VIEIRA, I. J. C. Uma contribuição à família Simaroubaceae. **Tese de Doutorado em Química Orgânica**, Universidade Federal de São Carlos, 1995.

96. ALEXANDRI, E.; AHMED, R.; SIDDIQUI, H.; CHOUDHARY, M.; TSIAFOULIS, G. C.; GEROTHANASSIS, I. P. High resolution NMR spectroscopy as a structural and analytical tool for unsaturated lipids in solution. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1–71, 2017.

97. ZHOU, X.; REILLY, J. E.; LOERCH, K. A.; HOHL, R. J.; WIEMER, D. F. Synthesis of isoprenoid bisphosphonate ethers through C-P bond formations: Potential inhibitors of geranylgeranyl diphosphate synthase. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 1645–1650, 2014.

98. CHEN, H. D.; YANG, S. P.; WU, Y.; DONG, L.; YUE, J-M. Terpenoids from *Toona ciliata*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 4, p. 685–689, 2009.

99. ZHANG, W.; LI, C.; YOU, L. J.; FU, X.; CHEN, Y-S.; LUO, Y-Q. Structural identification of compounds from *Toona sinensis* leaves with antioxidant and anticancer activities. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 427–435, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.015>>.

100. LIAO, S-G.; YANG, S-P.; YUAN, T.; ZHANG, C-R.; CHEN, H. D.; WU, Y.; XU, Y. K.; YUE, J. M. Limonoids from the leaves and stems of *Toona ciliata*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 8, p. 1268–1273, 2007.

101. ZHANG, F.; LIAO, S. G.; ZHANG, C. R.; XIU, F. H.; CHEN, W. S.; YUE, J. M. Limonoids and diterpenoids from *Toona ciliata* Roem.var. *yunnanensis*. **Planta Medica**, v. 77, n. 14, p. 1617–1622, 2011.

102. PINHEIRO, A.; OIANO NETO, J.; SILVA, M. F. G. F.; FO, E. R; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Norlimonoids from seeds of *Toona ciliata*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1369–1373, 1998.

103. MENG, Q. Q.; PENG, X. R.; LU, S. Y.; WAN, L. S.; WANG, S.; DONG, J. R.; CHU, R.; ZHOU, L.; LI, X. N.; QIU, M. H. Lactam Triterpenoids from the Bark of *Toona sinensis*. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 6, n. 5, p. 239–245, 2016.

104. PINHEIRO, A. L.; VILELA, E. F. Limonoids From Seeds of *Toona ciliata* and Their Chemosystematic significance. **Phytochemistry** v. 38, n. 2, p. 2–6, 1995.