

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

***BIOSENSORES ELETROQUÍMICOS COM
ACETILCOLINESTERASE E PRODUTOS NATURAIS PARA O
CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS***

Gabriele Fernanda da Silva*

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

*bolsista CAPES

São Carlos - SP

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Gabriele Fernanda da Silva, realizada em 25/08/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. João Batista Fernandes (UFSCar)

Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho (UFSCar)

Prof. Dr. Evair Dias Nascimento (UEPA)

Quando o olho brilhou, entendi

Quando criei asas, voei...

— Chico César

AGRADECIMENTOS:

Agradeço a Deus pela proteção e por estar ao meu lado todos os dias, dando-me forças e me sustentando.

À minha mãe, que sozinha lutou muito para que eu pudesse realizar os meus sonhos e me dedicar aos estudos. Sem você, eu não estaria aqui. Te amo mais que tudo neste mundo.

À minha segunda mãe, minha avó Ester, que sempre cuidou de mim e me apoiou. Ao meu avô Benício, que, mesmo com a distância, está sempre no meu coração. À minha avó Antônia, que me olha lá do céu — amo vocês!

Ao Gabriel Hiroshi Seki Rosa, o meu companheiro de vida. Nunca poderia imaginar estar ao lado de uma pessoa tão incrível como você. Agradeço pela sua existência e pela nossa família. Amo você, a Tica, o Chorão e a Tchutchu.

À minha família: minhas tias Vanderleia, Niceia e Claudineia; meus primos Paola, Lara, Gabriel e Isaac; minhas irmãs Letícia e Lediane; meus sobrinhos Kauan, Heitor e Benício; meu tio Marcos, meu padrinho Miranda e meu pai. Obrigada por fazerem parte da minha vida. Amo vocês!

Aos meus amigos Ariel, Jayme e Ângelo, Natália, Marina, Tiago, Rafael e aos meninos do laboratório ao lado — Samuel, Tiago, Pedro e Eliakin — por me ouvirem tantas vezes reclamar.

À Gabriela, à Sthéfane e à Ana Paula, por todas as conversas e trocas que tivemos ao longo desses dois anos.

Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes, pela orientação desde a minha iniciação científica. Sou muito grata por todo o aprendizado e pelo investimento neste projeto.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, pela coorientação, aprendizado e auxílio no desenvolvimento deste trabalho e pela cessão de seu laboratório para o desenvolvimento das pesquisas.

À Prof^ª Dr^ª Dulce Helena Ferreira de Souza, por ceder o seu laboratório, e ao Prof. Dr. Odair Corrêa Bueno, por ceder as formigas utilizadas nesta pesquisa.

Ao Dr. Sean dos Santos de Araújo, que esteve presente desde o início deste trabalho, orientando-me. Sua participação foi essencial para esta pesquisa.

À Dr^ª Janaina Brandão Seibert, pelo apoio desde a minha iniciação científica até a conclusão deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório, ao Departamento de Química, ao corpo docente e administrativo.

Aos órgãos de fomento: CNPq, FAPESP e CAPES. Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Código de Financiamento 001.

LISTA DE ABREVIACÕES

A Ampere

a Amplitude

ACh Acetilcolina

AChE Acetilcolinesterase

AChE-E Acetilcolinesterase eritrocitária

AChE-R Acetilcolinesterase solúvel

AChE-S Acetilcolinesterase sináptica

AsAChE Acetilcolinesterase *Atta sexdens*

ATChCl Cloreto de acetiltiocolina

ATChI Iodeto de acetiltiocolina

BChE Butirilcolinesterase

CAS Sítio catalítico ativo

CE Contra eletrodo

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DOE Planejamento experimental

DTNB ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)

DTT diclorodifeniltricloroetano

E Potencial

EDC 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide

EelAChE Acetilcolinesterase *Electrophorus electricus*

ER Eletrodo de referência

ET Eletrodo de trabalho

f frequência

g grama

GABA Ácido γ -aminobutírico

Glu Glutamato

His Histidina

HOBt Hidroxibenzotriazol

Hz Hertz

I Corrente

I% Porcentagem de inibição

I_p Corrente de pico

I_{pa} Corrente de pico anódica

kDa kilo Dalton

K_m constante de Michaelis

LD Limite de detecção

LQ Limite de Quantificação

M mol por litro

MES Tampão ácido 2-etanossulfônico

mg miligramas

min minutos

mL mililitros

mm² milímetro ao quadrado

mmol milimol

MSEP média quadrática do erro puro

MSfalta de ajuste Média quadrática de falta de ajuste

MSreg Médias quadráticas de regressão

MSres médias quadráticas de resíduos

mV milivolts

N nano (10^{-9})

NHS N-Hydroxysuccinimide

OF organofosforado

PAS Sítio aniônico periférico

PBS Tampão fosfato salino

PCC Planejamento composto central

pH Potencial Hidrogeniônico

PM Partícula magnética de ácido carboxílico

PVC Folha de policloreto de vinila

s Step

SD desvio padrão

Ser Serina

SPCE Screen-printed carbon electrodes

SQEP Soma quadrática do erro puro

TNB ânion 5-tio-2-nitrobenzoato

TWEEN 20 Monolaurato de polietilenoglicol sorbitano

v Variáveis

V volts

VOQ Voltametria de onda quadrada

β Coeficientes

[S] concentração de substrato

μ migro

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1-1: Dados dos microrganismos utilizados no estudo.	20
TABELA 3.6-1: Preparo do gel de poliacrilamida para SDS-PAGE.	25
TABELA 3.8-1: Planejamento composto central com valores codificados e reais.	30
TABELA 3.9-1: Planejamento composto central com valores codificados e reais para avaliação da resposta eletroquímica.	32
TABELA 4.1-1: Planejamento composto central codificado com a média das respostas obtidas em quintuplicata.	37
TABELA 4.1-2: Porcentagem de influência das variáveis e interações a partir do planejamento composto central para <i>EelAChE</i>	39
TABELA 4.1-3: Confirmação do planejamento composto central com pontos axiais para <i>AsAChE-A</i> e <i>AsAChE-B</i>	41
TABELA 4.1-4: Repetibilidade intra-dia e inter-dia para as três enzimas.	42
TABELA 4.2-1: Planejamento composto central para avaliação da resposta eletroquímica frente a <i>EelAChE</i> codificado com a média das respostas obtidas em quadruplicata.	47
TABELA 4.2-2: Planejamento composto central para avaliação da resposta eletroquímica frente a <i>AsAChE-A</i> codificado com a média das respostas obtidas em quadruplicata.	48
TABELA 4.2-3: Planejamento composto central para avaliação da resposta eletroquímica frente a <i>AsAChE-B</i> codificado com a média das respostas obtidas em quadruplicata.	49
TABELA 4.2-4: Análise estatística do ajuste e validação do modelo para <i>EelAChE</i> , <i>AsAChE-A</i> e <i>AsAChE-B</i>	51
TABELA 4.2-5: Porcentagem de influência das variáveis e interações a partir do planejamento composto central para avaliação da resposta eletroquímica frente as enzimas <i>EelAChE</i> , <i>AsAChE-A</i> e <i>AsAChE-B</i>	53

TABELA 4.3-1: Efeito da reposta eletroquímica de oxidação da tiocolina referente a mudança de pH da solução de ATChCl Respostas eletroquímicas em μA	57
TABELA 4.4-1: Desempenhos analítico de biossensores eletroquímicos de acetilcolinesterase para detecção de malation.....	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.2-1: (a) Formiga cortadeira do gênero <i>Acromyrmex</i> . (b) Fungo mutualista <i>Leucoagaricus</i> (Agência FAPESP, 2015). (c) <i>Escovopsis</i> , fungo parasita do <i>Leucoagaricus</i> (Francoeur et al., 2021). (d) <i>Pseudonocardia</i> , bactéria mutualista da formiga cortadeira (Goldstein; Klassen, 2020). (e) <i>Phialophora</i> , fungo negro que possui relações negativas com a <i>Pseudonocardia</i> . As setas indicam o tipo de interação: linhas verdes representam relações positivas, linhas vermelhas indicam relações negativas e linhas verdes tracejadas indicam relações positivas indiretas. Figura modificada de HEINE et al. 2018.....	5
FIGURA 1.5-1 Representação de uma célula eletroquímica convencional e serigrafada. A): Célula eletroquímica convencional composta por um eletrodo de trabalho (WE, carbono vítreo com 3 mm de diâmetro), um contraeletrodo (CE, fio de níquel) e um eletrodo de referência (RE, eletrodo de calomelano saturado). B): Eletrodo serigrafado de carbono contendo um eletrodo de trabalho (3,1 mm de diâmetro), um contraeletrodo de carbono e um eletrodo de referência de Ag/AgCl (Crapnell; Banks, 2024).	11
FIGURA 1.6-1 Representação esquemática das interações no interior do sítio ativo da AChE. É destacando a região onde ocorre a hidrólise da acetilcolina catalisada pela enzima. Apresentando o processo de reconhecimento da colina, mediado por interações π com resíduos aromáticos que promovem o posicionamento adequado do substrato, bem como a atuação dos subsítios esteráticos, responsáveis pela clivagem da ligação éster (Assis et al., 2018).....	13
FIGURA 1.6-2 Representação da interação OF-AChE que resulta na inibição enzimática (Assis et al., 2018).	15
FIGURA 3.7-1 Primeira etapa de imobilização das AChEs em partícula magnética (Ativação EDC/HOBt) Fonte: Elaborado pela autora, 2025.....	27
FIGURA 3.7-2: Reação EDC/HOBt com grupos carboxila das partículas magnéticas.....	27

FIGURA 3.7-3: Metodologia de imobilização para enzimas expressando a reação com grupos aminas de seus aminoácidos. <i>AsAChE</i> -A e <i>AsAChE</i> -B (Santos, 2017) <i>EelAChE</i> (Bourne <i>et al.</i> , 1999).	28
FIGURA 3.7-4: Metodologia de bloqueio dos sítios ativos remanescentes com etanolamina.	29
FIGURA 3.11-1: Metodologia de inibição da acetilcolinesterase analisadas pela reação eletroquímica da acetiltiocolina. Fonte: Elaborado pela autora, 2025. ...	34
FIGURA 3.11-2: Eletrodos descartáveis conectados ao potenciostato(A); Potenciostato de bancada (B).	34
FIGURA 4.1-1 Gráficos de superfície (A) e de contorno (B) do planejamento composto central para a imobilização PM's/ <i>EelAChE</i> . Realizados no software PyCharm Community Edition 2023.1.2 através Equação 8. A codificação se encontra em Anexo 1.....	40
FIGURA 4.2-1: Fórmulas estruturais do Iodeto de acetiltiocolina (A) e Cloreto de acetiltiocolina (B).	43
FIGURA 4.2-2: Esquema da reação eletroquímica de oxidação da tiocolina ocasionada pela corrente aplicada formando o dímero ditio-bis-colina (Souza et al., 2022).	43
FIGURA 4.2-3: Voltamograma cíclico dos compostos 1-propanethiol e iodeto de potássio. Correntes obtidas por VC em $[KI] = 5,5 \mu\text{mol}$ e $[C_3H_8S] = 13 \mu\text{mol}$, Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} . Intervalo de potencial: $+0,1$ a $+0,9 \text{ V}$...	44
FIGURA 4.2-4: Voltamograma cíclico dos compostos ATCh-I e I_2 . Correntes obtidas por VC em $[ATCh-I] = 5,06 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $[I_2] = 7 \mu\text{mol}$, $f = 50 \text{ Hz}$ Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} . Intervalo de potencial: $+0,1$ a $+0,9 \text{ V}$...	45
FIGURA 4.2-5: Voltamograma cíclico dos compostos PBS, C_3H_8S , ATChCl e ATChCl clivado pela acetilcolinesterase. Correntes obtidas por VC em $[ATCh-Cl] = 5,06 \text{ mmol.L}^{-1}$, $[C_3H_8S] = 13 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $[PBS] = 10 \text{ mmol.L}^{-1}$, $f = 50 \text{ Hz}$. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} . Intervalo de potencial: $+0,1$ a $+0,9 \text{ V}$...	45

- FIGURA 4.2-6:** Gráficos de superfície (A) e de contorno (B) do planejamento composto central para a avaliação da resposta eletroquímica frente a *EelAChE*. Realizados no software PyCharm Community Edition 2023.1.2 através Equação 10. A codificação se encontra no Anexo 1..... 55
- FIGURA 4.3-1:** Efeito da reposta eletroquímica de oxidação da tiocolina referente a mudança de pH da solução de ATChCl. As correntes foram obtidas por VOQ em ATChCl 5,06 mmol.L⁻¹, PBS 10 mmol.L⁻¹. $a = 50$ mV; $f = 50$ Hz; $s = 0,002$ V. Tempo de reação = 10 min. [AChE] = 7 µg.mL⁻¹..... 56
- FIGURA 4.4-1:** Efeito nas correntes de atividade enzimática em relação ao tempo de ação do malation nos biossensores de *AsAChE*-A e *AsAChE*-B. [Malation] = 21,2 µmol.L⁻¹, [*AsAChE*] = 7 µg.mL⁻¹. Corrente obtidas por VOQ. $a = 50$ mV; $f = 50$ Hz; $s = 0,002$ V. [ATChCl] = 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7. Tempo de reação de 10 min..... 59
- FIGURA 4.4-2:** Porcentagem de inibição em função da concentração de malation para a *AsAChE* A em um tempo de 25 min (A). Porcentagem de inibição em função da concentração de malation para a enzima *AsAChE* B em um tempo de 25 min (B). Correntes obtidas por VOQ em [ATChCl] 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7,0. $a = 50$ mV; $f = 50$ Hz; $s = 0,002$ V. Tempo de reação = 10 min. [*AsAChE* A e B] = 7 µg.mL⁻¹..... 62
- FIGURA 4.5-1:** Gráfico da concentração de galantamina versus a porcentagem de inibição da atividade das enzimas *AsAChE*-A, *AsAChE*-B e *EelAChE* em um tempo de 25 min. Correntes obtidas por VOQ em [ATChCl] 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7,0. $a = 50$ mV; $f = 50$ Hz; $s = 0,002$ V. Tempo de reação = 10 min. [*AsAChE* A e B] = 7 µg.mL⁻¹. 64
- FIGURA 4.6-1:** Porcentagem de inibição enzimática do extrato de *E. microspora* em diferentes concentrações. Correntes obtidas por VOQ em [ATChCl] 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7,0. $a = 50$ mV; $f = 50$ Hz; $s = 0,002$ V. Tempo de reação = 10 min. Inibição calculada através das médias das correntes obtidas. 66

FIGURA 4.7-1: Porcentagem de inibição enzimática dos extratos de *E. dermatitidis* e *E. spinifera* em mono e co-cultivo com *E. microspora* em diferentes concentrações. 69

FIGURA 4.7-2: Porcentagem de inibição enzimática dos extratos de *E. dermatitidis*, *E. spinifera* em mono e co-cultivo com *E. microspora* em diferentes concentrações para cada enzima. (A) Inibição *AsAChE*-A frente ao mono e co-cultivo *E. dermatitidis*; (B) Inibição *AsAChE*-B frente ao mono e co-cultivo *E. dermatitidis*; (C) Inibição *EelAChE* frente ao mono e co-cultivo *E. dermatitidis*; (D) Inibição *AsAChE*-A frente ao mono e co-cultivo *E. spinifera*; (E) Inibição *AsAChE*-B frente ao mono e co-cultivo *E. spinifera* (F) Inibição *EelAChE* frente ao mono e co-cultivo *E. spinifera*. Correntes obtidas por VOQ em [ATChCl] 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol L⁻¹, pH 7,0. $a = 50$ mV; $f = 50$ Hz; $s = 0,002$ V. Tempo de reação = 10 min. Inibição calculada através das médias das correntes obtidas. 71

FIGURA 4.7-3: Porcentagem de inibição enzimática dos extratos do gênero *Exophiala* em diferentes concentrações para cada enzima. (A) Inibição *AsAChE*-A frente a duas espécies do gênero de *Exophiala*; (B) Inibição *AsAChE*-B frente a duas espécies do gênero de *Exophiala*; (C) Inibição *EelAChE* frente a duas espécies do gênero de *Exophiala*. Correntes obtidas por VOQ em [ATChCl] 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol L⁻¹, pH 7,0. $a = 50$ mV; $f = 50$ Hz; $s = 0,002$ V. Tempo de reação = 10 min. Inibição calculada através das médias das correntes obtidas. 72

FIGURA 4.8-1: Porcentagem de inibição enzimática dos extratos de *P. attae* e *P. capiguarae* em mono e co-cultivo com *E. microspora* em diferentes concentrações. (A) *P. attae*; (B) *P. capiguarae*; (C) co-cultivo *P. attae* e *E. microspora*; (D) co-cultivo *P. capiguarae* e *E. microspora*. Correntes obtidas por VOQ em [ATChCl] 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7,0. $a = 50$ mV; $f = 50$ Hz; $s = 0,002$ V. Tempo de reação = 10 min. Inibição calculada através das médias das correntes obtidas. 74

FIGURA 4.8-2: Porcentagem de inibição enzimática dos extratos *P. attae* e *P. capiguarae* em mono e co-cultivo com *E. microspora* em diferentes concentrações. (A) Inibição *AsAChE*-A frente ao mono e co-cultivo de *P. attae*; (B) Inibição *AsAChE*-B frente ao mono e co-cultivo de *P. attae*; (C) Inibição *EelAChE* frente ao mono e co-cultivo de *P. attae*; (D) Inibição *AsAChE*-A frente ao mono e co-cultivo de *P. capiguarae*; (E) Inibição *AsAChE*-B frente ao mono e co-cultivo de *P. capiguarae* (F) Inibição *EelAChE* frente ao mono e co-cultivo de *P. capiguarae*. Correntes obtidas por VOQ em [ATChCl] 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7,0. $a = 50$ mV; $f = 50$ Hz; $s = 0,002$ V. Tempo de reação = 10 min. Inibição calculada através das médias das correntes obtidas. 76

FIGURA 4.8-3: Porcentagem de inibição enzimática dos extratos do gênero *Phialophora* em diferentes concentrações para cada enzima. (A) Inibição *AsAChE*-A frente a duas espécies do gênero *Phialophora*; (B) Inibição *AsAChE*-B frente a duas espécies do gênero *Phialophora*; (C) Inibição *EelAChE* frente a duas espécies do gênero *Phialophora*. Corrente obtidas por VOQ. Amplitude = 50mV; $f = 50$ Hz, oxidação de [TChCl] = 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7, tempo de reação de 10 min. Inibição calculada através das médias das correntes obtidas. 78

FIGURA 4.8-4: Mapa de calor (heatmap) representando a porcentagem de inibição da atividade enzimática por diferentes extratos fúngicos e pela galantamina sobre três formas de acetilcolinesterase (*AsAChE*-A, *AsAChE*-B e *EelAChE*). Os valores percentuais são apresentados no interior de cada célula, enquanto a intensidade da cor varia de forma inversa à magnitude: tons mais escuros indicam maior inibição, e tons mais claros, menor inibição. Os nomes dos microrganismos estão destacados em *itálico* conforme a nomenclatura científica. 79

RESUMO

BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS COM ACETILCOLINESTERASE E PRODUTOS NATURAIS PARA O CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS. A agricultura é um setor essencial para a economia brasileira, mas enfrenta grandes desafios no controle de pragas, como as formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*), responsáveis por expressivas perdas na produtividade agrícola e florestal. Embora os pesticidas sintéticos ainda sejam amplamente utilizados, seus efeitos colaterais sobre a saúde humana, o meio ambiente e organismos não-alvos impulsionam a busca por alternativas mais seguras e seletivas. Neste trabalho, foram desenvolvidos biossensores eletroquímicos descartáveis utilizando as enzimas acetilcolinesterases (AChE) extraídas de formigas cortadeiras (*AsAChE-A* e *AsAChE-B*) e de enguia elétrica (*EelAChE*). As enzimas foram imobilizadas em partículas magnéticas e aplicadas em eletrodos de carbono serigrafados. O processo de imobilização foi otimizado com auxílio do planejamento composto central (PCC), permitindo determinar a condição ideal com 1,4 mg/mL de partículas magnéticas, 7 µg/mL de AChE e tempo de imobilização de 30 minutos. Os biossensores construídos demonstraram sensibilidade frente ao inibidor específico malation. Os limites de detecção (LD) foram de 2,6 nM para *AsAChE-A* e 14 nM para *AsAChE-B*. Esses resultados reforçam a aplicabilidade das enzimas nativas de formigas cortadeiras em dispositivos analíticos para triagem de inibidores, com potencial para o desenvolvimento de bioinseticidas seletivos e sustentáveis. Os sensores demonstraram ainda sensibilidade e seletividade frente a galantamina, outro inibidor anticolinesterásico, além de serem aplicáveis à triagem de extratos microbianos associados ao ninho das formigas. A proposta mostra-se promissora como ferramenta para identificação de novos compostos bioinseticidas, contribuindo para um controle de pragas mais ecológico e específico, com menor impacto ambiental.

ABSTRACT

ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS WITH ACETYLCHOLINESTERASE AND NATURAL PRODUCTS FOR THE CONTROL OF LEAF-CUTTING ANTS. Agriculture is an essential sector for the Brazilian economy but faces major challenges in pest control, such as leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*), which are responsible for significant losses in agricultural and forestry productivity. Although synthetic pesticides are still widely used, their side effects on human health, the environment, and non-target organisms drive the search for safer and more selective alternatives. In this work, disposable electrochemical biosensors were developed using acetylcholinesterase (AChE) enzymes extracted from leaf-cutting ants (*AsAChE-A* and *AsAChE-B*) and electric eel (*EelAChE*). The enzymes were immobilized on magnetic particles and applied to screen-printed carbon electrodes. The immobilization process was optimized with the aid of central composite design (CCD), allowing the determination of optimal conditions with 1.4 mg/mL of magnetic particles, 7 µg/mL of AChE, and an immobilization time of 30 minutes. The constructed biosensors demonstrated sensitivity toward the specific inhibitor malathion. The limits of detection (LOD) were 2.6 nM for *AsAChE-A* and 14 nM for *AsAChE-B*. These results reinforce the applicability of native enzymes from leaf-cutting ants in analytical devices for inhibitor screening, with potential for the development of selective and sustainable bioinsecticides. The sensors also showed sensitivity and selectivity toward galantamine, another anticholinesterase inhibitor, in addition to being applicable to the screening of microbial extracts associated with ant nests. This proposal proves promising as a tool for the identification of new bioinsecticidal compounds, contributing to more ecological and specific pest control with lower environmental impact.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Setor Agrícola e seus desafios:</i>	1
1.2 <i>Formigas cortadeiras:</i>	3
1.3 <i>Danos causados por inseticidas sintéticos:</i>	6
1.4 <i>Métodos de triagem para descoberta de novos bioinseticidas:</i>	9
1.5 <i>Biossensores eletroquímicos:</i>	10
1.6 <i>Acetilcolinesterase:</i>	12
1.7 <i>Otimização por Planejamento Composto Central:</i>	16
2 OBJETIVO GERAL	18
2.1 <i>Objetivos Específicos:</i>	18
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	19
3.1 <i>Materiais e reagentes utilizados:</i>	19
3.2 <i>Equipamentos utilizados:</i>	20
3.3 <i>Preparo de soluções:</i>	20
3.4 <i>Obtenção dos extratos dos microrganismos:</i>	21
3.5 <i>Construção dos eletrodos descartáveis:</i>	22
3.6 <i>Extração da acetilcolinesterase de formigas cortadeiras:</i>	22
3.6.1 <i>Extração das enzimas:</i>	22
3.6.2 <i>Precipitação das enzimas:</i>	23
3.6.3 <i>Diálise da solução:</i>	23
3.6.4 <i>Purificação em coluna HiPrep DEAE Sepharose FF:</i>	23
3.6.5 <i>Concentração da AsAChE-B:</i>	24
3.6.6 <i>Purificação da AsAChE-A em coluna HiTrapTMPhenyl HP:</i>	24
3.6.7 <i>Concentração da AsAChE-A:</i>	24
3.6.8 <i>Determinação da concentração das enzimas pelo protocolo de Bradford:</i>	25
3.6.9 <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida:</i>	25
3.6.10 <i>Ensaio de atividade das enzimas acetilcolinesterase:</i>	26
3.7 <i>Imobilização das AChE's em partícula magnética:</i>	26
3.8 <i>Otimização da imobilização enzima/partículas magnéticas:</i>	29

3.9	<i>Avaliação da resposta eletroquímica frente a acetiltiocolina utilizando planejamento composto central:</i>	31
3.10	<i>Avaliação da resposta eletroquímica frente a variação de pH da acetiltiocolina:</i>	33
3.11	<i>Estudo de inibição das enzimas pelo Malation:</i>	33
3.12	<i>Avaliação da atividade inibitória através da concentração:</i>	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	<i>Planejamento composto central para imobilização da acetilcolinesterase em partículas magnéticas:</i>	36
4.2	<i>Avaliação da resposta eletroquímica frente a acetiltiocolina:</i>	42
4.2.1	<i>Escolha do substrato:</i>	42
4.2.2	<i>Avaliação da resposta eletroquímica para EelAChE, AsAChE-A e AsAChE-B utilizando planejamento composto central:</i>	46
4.3	<i>Avaliação da resposta eletroquímica frente a variação de pH da acetiltiocolina:</i>	56
4.4	<i>Estudo de inibição das enzimas pelo Malation:</i>	58
4.5	<i>Estudo de inibição de acetilcolinesterases frente a galantamina:</i>	63
4.6	<i>Estudo de inibição de acetilcolinesterases frente ao extrato de microrganismo Escovopsis microspora:</i>	65
4.7	<i>Estudo de inibição da acetilcolinesterase frente ao extrato de microrganismo Exophiala dermatitidis, Exophiala spinifera e seus co-cultivos com Escovopsis microspora:</i>	67
4.8	<i>Estudo de inibição da acetilcolinesterase frente ao extrato de microrganismo Phialophora attae, Phialophora capiguarae e seus co-cultivos com Escovopsis microspora:</i>	73
5	CONCLUSÕES	80
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
	ANEXOS	97
	ANEXO 1	98
	ANEXO 2	99

1. INTRODUÇÃO

1.1 Setor Agrícola e seus desafios:

O setor agrícola é um importante campo para países em ascensão no quadro econômico mundial, tendo fundamental participação no desenvolvimento e arrecadação monetária no Produto Interno Bruto (PIB) de cada país. No Brasil, a participação deste setor na economia em 2021 foi responsável por 27,4% do PIB brasileiro (MAPA. Ministério da Agricultura, 2022), no ano de 2022, o valor registrado foi de 25% (CNA - Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil; CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada., 2023).

Além de sua contribuição para o PIB, a agricultura possui uma grande influência no meio ambiente e na segurança alimentar de toda sociedade (FAO, 2023). Necessitando atender a todos, o aumento da produção de alimentos é visado pela maioria dos países devido ao crescimento constante da população mundial, sendo previsto que em 2050 seja atingido quase 10 bilhões de pessoas (Okagu *et al.*, 2023).

Sendo meta central para o desenvolvimento humano global, o combate a fome e a segurança alimentar é uma das prioridades estabelecidas pela Organização das Nações Unidas na Agenda 2030 (Nações Unidas, 2023). Em 2022 a fome afetou 9,2% da população mundial, o que representa entre 691 e 783 milhões de pessoas, sendo 122 milhões de pessoas a mais do que em 2019 (FAO, 2023). Em 2022, a exposição à insegurança alimentar grave atingiu 900 milhões da população mundial de acordo com a Escala de Experiência de Insegurança Alimentar (FIES) (FAO, 2023).

A insegurança alimentar existe pela falta de acesso a alimentos suficientes, seguros e nutritivos que supram as necessidades alimentares para uma vida mais saudável (Dana *et al.*, 2025). Para promover segurança alimentar e combater a fome com alimentos mais saudáveis, a produção alimentícia de vegetais, cereais integrais, frutas e leguminosas deve aumentar, devido a composição de vitaminas e fibras alimentares (Sarić *et al.*, 2020). Entretanto, danos causados por insetos

estão entre 15 e 20% das perdas na produção global de vegetais (Ouaarous *et al.*, 2025).

Insetos como as brocas do caule (*Busseola fusca*) são responsáveis por causar perdas de 82% nas produções de milho no Quênia. Enquanto a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) afeta a produção em 21-53% (Benjamin *et al.*, 2024). Porém, outros dados sobre esta lagarta apontam danos de até 80-100% de perdas na produtividade de milho (Zanzana *et al.*, 2024).

Estima-se que até 30% dos custos de gestão de plantações florestais sejam destinados para o controle de formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*) (Masiulionis; Samuels, 2025). Cortando pedaços de folhas e outros tecidos vegetais, este inseto-praga é capaz de remover até 20% do material foliar de plantas individuais e 50% de plantas presentes na vizinhança das colônias (Schulze-Sylvester *et al.*, 2022).

Os danos causados pelas formigas cortadeiras são apresentados em diferentes espécies de plantas, como em *Eucalyptus* e *Pinus* presentes em áreas agrícolas e de reflorestamento, reduzindo o volume de madeira em até 13% após um único evento de desfolha causado por essa praga (Masiulionis; Samuels, 2025). Em *Salix nigra*, foram estimados danos entre 80 e 100% após o plantio (Jiménez *et al.*, 2021), e em frutas cítricas calcula-se perdas de até 30% em mudas, mesmo com práticas convencionais de manejo de pragas (Schulze-Sylvester *et al.*, 2022). Em relação a cana-de-açúcar, as formigas cortadeiras podem consumir até três toneladas anualmente (Masiulionis; Samuels, 2025).

Insetos-pragas que possuem partes bucais projetadas para cortar e mastigar alimentos causam a fragmentação de plantas para se alimentar mastigando as camadas externas. Em consequência disso, danos como destruição de brotos, flores, frutos e sementes são causados, além de desfolha, perda de tecidos fotossintéticos, interrupção do fluxo de seiva, danos no caule, que causam enfraquecimento físico e danos em mudas e plantas jovens (Ouaarous *et al.*, 2025).

Dessa forma, o controle de insetos-pragas é indispensável para a produção agrícola. Entretanto, há insetos em que o seu manejo é dificultado devido a diversos fatores, como a sociabilidade que reduz a probabilidade de erradicação de pragas artrópodes. Segundo o estudo realizado por Howse; Haywood; Lester, 2023, as chances de erradicação para espécies sociais foram 79% menores que para insetos não sociáveis.

O controle das formigas cortadeiras, causadoras de danos irreparáveis, é dificultado devido a sua sociabilidade e interações com outros microrganismos. Em virtude da sua complexa estrutura social se torna necessária à sua compreensão para obtenção de um manejo mais efetivo.

1.2 Formigas cortadeiras:

As formigas cortadeiras são da tribo “Attini”, tribo que é composta por 16 gêneros, porém apenas os gêneros *Atta* e *Acromymex* são reconhecidos como formigas cortadeiras (Colombari *et al.*, 2023; Khayat, 2024). Estando entre as mais derivadas das tribos, devido ao cultivo de fungos do gênero *Leucoagaricus*, as formigas cortadeiras utilizam material vegetal fresco como substrato, enquanto os fungos mutualistas produzem gongilídios, estruturas utilizadas para alimentar a rainha e a ninhada (Gómez-Díaz *et al.*, 2022).

Aproximadamente há 50-60 milhões de anos ocorre a relação simbiótica entre as formigas cortadeiras e o fungo *Leucoagaricus*, também conhecido como fungo cultivar. Por efeito da incapacidade do fungo de se reproduzir sexualmente por meio de esporos, as formigas cultivam os fungos com folhas frescas, aparas de gramas, frutas, bagas, flores e excrementos de insetos. As formigas se alimentam dos gongilídios, fonte obrigatória de alimento (Goldstein; Klassen, 2020).

Entretanto, o fungo *Leucoagaricus* sofre ameaça de outros fungos encontrados nos ninhos das formigas cortadeiras, dos gêneros *Escovopsioides* e *Escovopsis*. O *Escovopsisoides nivea* foi a única espécie descrita até o momento, demonstrando ser capaz de inibir o fungo simbiote. Em relação ao gênero

Escovopsis, esse fungo é considerado um parasita especializado do *Leucoagaricus*, sendo altamente virulento ao seu hospedeiro (Mendonça *et al.*, 2021). Além disso, foram estudadas interações químicas entre o *Escovopsis* e seu hospedeiro, mostrando que espécies desse gênero inibem o crescimento do fungo cultivado (Elliot *et al.*, 2024).

Para proteção contra a infecção causada pelo fungo *Escovopsis*, as operárias das *Acromyrmex* mantêm uma simbiose com a *Pseudonocardia*, esta actinobactéria produz antibióticos mantidos na cutícula do exoesqueleto da formiga (Gómez-Díaz *et al.*, 2022; Maurice-Lira *et al.*, 2025). Muitas espécies de formigas cultivadoras de fungos possuem uma crosta branca cobrindo uma região da cutícula. Inicialmente esta crosta foi descrita como uma “floração cerosa”, sendo posteriormente identificada como um biofilme formado pela *Pseudonocardia* (Diarra; Osborne-Naikatini; Subramani, 2024; Goldstein; Klassen, 2020). Entretanto, as espécies de *Atta* perderam ou reduziram a simbiose com *Pseudonocardia*, protegendo as colônias com a desinfecção química e imunidade coletiva (Gómez-Díaz *et al.*, 2022).

Todavia, há relatos que o *Escovopsis* produz dois metabólitos capazes de inibir a *Pseudonocardia* quando infecta a cultivar, além de reduzir as defesas comportamentais das operárias e ser letal quando se acumula nos tecidos das formigas (Heine *et al.*, 2018). Assim, os dois microrganismos *Escovopsis* e *Pseudonocardia* estão em uma espécie de corrida armamentista evolutiva ativa, na qual se as infecções aumentarem ocorre um colapso nas colônias devido a presença do *Escovopsis* (Goldstein; Klassen, 2020; Heine *et al.*, 2018).

A complexidade dos ninhos das formigas cortadeiras é ainda maior com a presença de leveduras negras, como *Cladophialophora*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Ochroconis*, *Phaeococcomyces*, *Phialophora* e *Penidiella*, encontradas e isoladas de ninhos desses insetos sociais (Duarte *et al.*, 2014; Giraldo *et al.*, 2022). Essas leveduras negras são consideradas como parasitas do simbionte *Pseudonocardia* ocorrendo entre eles uma competição por nutrientes

na cutícula da formiga cortadeira (Attili-Angelis *et al.*, 2014; Goldstein; Klassen, 2020; Little; Currie, 2007). Quando o crescimento da *Pseudonocardia* é suprimido há a proliferação do *Escovopsis*, levando a diminuição do *Leucoagaricus* e subsequentemente a ausência de alimentação básica para as formigas cortadeiras. As interações descritas ao longo do texto estão resumidas na Figura 1.2-1.

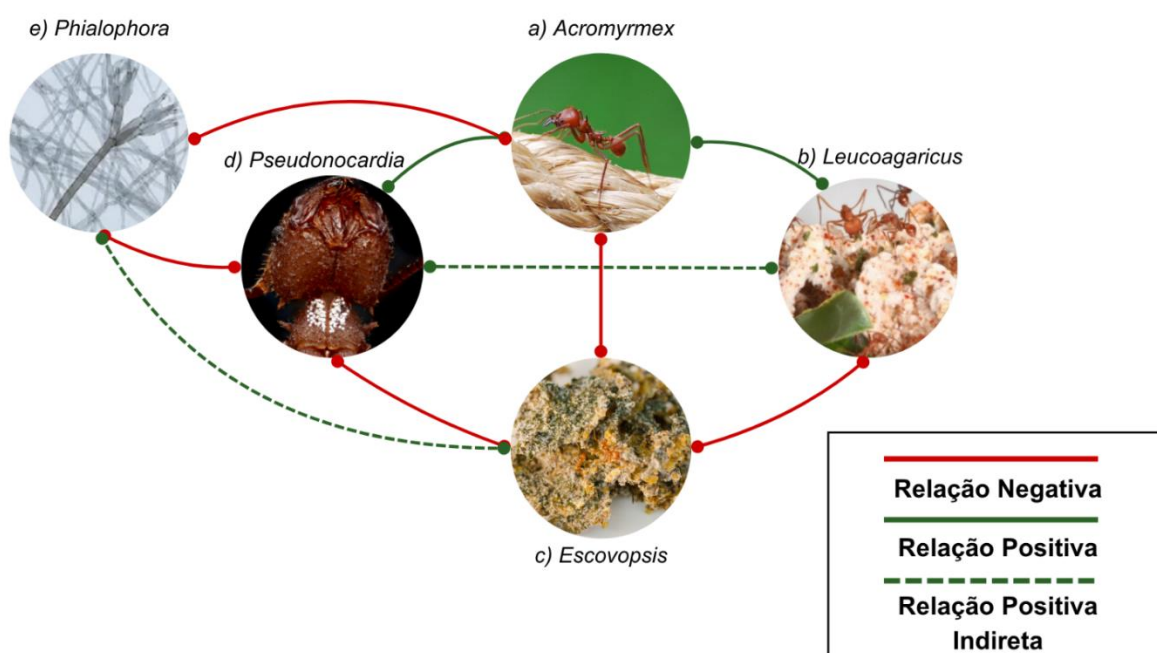


FIGURA 1.2-1: (a) Formiga cortadeira do gênero *Acromyrmex*. (b) Fungo mutualista *Leucoagaricus* (Agência FAPESP, 2015). (c) *Escovopsis*, fungo parasita do *Leucoagaricus* (Francoeur et al., 2021). (d) *Pseudonocardia*, bactéria mutualista da formiga cortadeira (Goldstein; Klassen, 2020). (e) *Phialophora*, fungo negro que possui relações negativas com a *Pseudonocardia*. As setas indicam o tipo de interação: linhas verdes representam relações positivas, linhas vermelhas indicam relações negativas e linhas verdes tracejadas indicam relações positivas indiretas. Figura modificada de HEINE et al. 2018.

Na Figura 1.2-1 há a representação das interações simbióticas e antagônicas na comunidade microbiana associada a formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*. As formigas cultivam ativamente o fungo mutualista *Leucoagaricus*

(b)(Agência FAPESP, 2015), o qual serve como principal fonte alimentar para a colônia, mantendo com ele uma relação positiva direta. Para proteger esse fungo do parasitismo causado por *Escovopsis* (c)(Francoeur et al., 2021), as formigas mantêm associações simbióticas com bactérias do gênero *Pseudonocardia* (d)(Goldstein; Klassen, 2020) que produzem compostos antimicrobianos com ação antagonista contra o fungo patogênico. Entretanto, fungos negros como *Phialophora* (e) (Attili-Angelis et al., 2014) também estão presentes nos ninhos e interagem negativamente com *Pseudonocardia*, competindo pelo espaço e possivelmente inibindo sua atividade. Além disso, esses fungos negros podem indiretamente favorecer *Escovopsis*, ao reduzir a eficácia da proteção bacteriana (Heine et al., 2018).

Devido à complexidade das interações dos organismos presentes nos ninhos de formigas cortadeiras seu manejo é dificultado, sendo aplicado o uso de pesticidas para o seu controle, como a sulfluramida e fipronil que são os compostos mais utilizados (Catalani *et al.*, 2019).

1.3 Danos causados por inseticidas sintéticos:

Apesar da necessidade e dos benefícios dos pesticidas, seus efeitos sobre organismos não-alvo têm sido uma preocupação global. Devido a sua falta de especificidade, os pesticidas não atingem só as pragas, mas também seus predadores que atuam por si só como um controle biológico, sendo benéficos ao meio ambiente (Okagu *et al.*, 2023). Além dos predadores, os polinizadores também são atingidos, como pássaros, besouros e abelhas, que possuem papéis vitais no processo agrícola durante a polinização, podendo resultar em baixa produtividade de colheitas em suas ausências (Okagu *et al.*, 2023).

Além disso, os pesticidas sintéticos são capazes de afetar o solo, a ciclagem regular de nutrientes, a mineralização, a biomassa do solo e a agroprodutividade. Afetam ainda, ecossistemas aquáticos e aéreos (Okagu *et al.*, 2023). Pesticidas químicos sintéticos podem causar diversos problemas para a saúde humana ocasionando distúrbios dermatológicos, gastrointestinais, carcinogênicos,

respiratórios, reprodutivos etc. (Sarailoo *et al.*, 2022). Uma única exposição a alguns pesticidas leva a condições agudas de curto prazo e podem levar a condições crônicas de longo prazo que ocorrem durante meses e anos após a exposição (Okagu *et al.*, 2023).

Os inseticidas atingem principalmente três locais-alvo no sistema nervoso: GABA, receptores de acetilcolina e acetilcolinesterase (AChE) (Chikte *et al.*, 2024). Os produtos químicos que interferem nos sistemas nervosos são normalmente tóxicos, atuando no sistema nervoso central se ligando a receptores GABA e inundando os neurônios de íons cloreto, além de inibir a AChE responsável por quebrar a acetilcolina, um neurotransmissor envolvido nos impulsos nervosos (Chikte *et al.*, 2024).

Entretanto, a intoxicação ocasionada pelos pesticidas não ocorre apenas em pessoas que tiveram contato direto com a substância, mas também devido a sua inserção na cadeia alimentar por meio da água potável e dos sistemas solo-planta (Shekhar *et al.*, 2024).

Este contexto evidencia a necessidade de redução do uso de pesticidas. Entretanto, desde 2000 apenas houve aumento em seu consumo, sendo que entre os anos de 2000 e 2021 o uso global de pesticida aumentou em 62%, sendo o Brasil o maior consumidor de pesticida em 2021 com 0,72 milhões de toneladas (20% do total mundial) compradas (FAO, 2023). Mesmo sendo um dos maiores produtores agrícolas, não há justificativa para o alto consumo de pesticidas no Brasil, pois de acordo com o uso por área de cultivo, o Brasil ainda obteve o maior consumo com 10,9 kg/ha, quase seis vezes maior que o valor da China com 1,9 kg/ha (FAO, 2023).

Para a diminuição do uso de pesticidas necessita-se levar em consideração as suas consequências na produtividade agrícola (Beaumelle *et al.*, 2023). Com isso, a agricultura orgânica, que possui como característica a ausência de fertilizantes e pesticidas sintéticos, surge como um aspecto visível de tornar o setor agrícola mais sustentável. Em 2021, a área agrícola com status orgânico ou

em conversão para orgânico foi de 77 milhões de hectares, com destaque para a Austrália que representou 46% do total (FAO, 2023). Algumas alternativas para uma forma mais sustentável para o controle de pragas são:

1. Tratamento com fitormônios:

Ao longo dos anos, as plantas foram capazes de coevoluir seus mecanismos de defesa para combater ou repelir seus agressores direta ou indiretamente (Shang *et al.*, 2024). Os fitormônios são um grupo de substâncias orgânicas e naturais que influenciam nos processos fisiológicos, eles são essenciais para a detecção de estressores, incorporação de sinais em vias de sinalização endógenas e promoção de estratégias de adaptação, tendo potencial para aumentar a resistência e produtividade em culturas agrícolas (Panozzo *et al.*, 2025).

2. Agentes de biocontrole de manejo de pragas:

Nesta metodologia há a introdução de agentes de biocontrole para o manejo de insetos herbívoros, para isso ocorre a aplicação de inimigos naturais para suprimir a densidade populacional da praga, em sua maioria inofensiva para humanos e vertebrados (Shang *et al.*, 2024). Porém, a eficácia do biocontrole depende de características funcionais dos predadores e das pragas, identidade da espécie, tipo de cultura e heterogeneidade ambiental (Boldorini *et al.*, 2024).

3. Feromônios de insetos:

Os feromônios podem ser divididos em feromônios sexuais, de agregação, de alarme, de trilha etc. Providos de insetos, os feromônios são semioquímicos essenciais para a sobrevivência dos insetos e a comunicação coespecíficas. Devido possuírem efeitos específicos da espécie, os feromônios são menos tóxicos para o meio ambiente, apresentando vantagens para o controle de pragas (Shang *et al.*, 2024).

4. Bioinseticidas de metabólitos secundários:

Metabólitos secundários com potencial bioinseticida podem ser encontrados em plantas e microrganismos. Em plantas os metabólitos secundários mais encontrados são terpenóides e flavonóides, que podem atuar como

herbicidas, inseticidas, fungicidas e nematicidas. Enquanto em microrganismos podem ser encontrados peptídeos e antibióticos que são usados para o controle de insetos, ervas daninhas, fungos e bactérias (Priya *et al.*, 2023).

1.4 Métodos de triagem para descoberta de novos bioinseticidas:

Para a descoberta de novos bioinseticidas são necessárias técnicas de triagem, para avaliar seu potencial. Para a utilização do próprio organismo vivo em contato com o composto de análise, há a inserção do composto por diversas vias, tais como: (I) o contato direto – aplicação diretamente no corpo do organismo, (II) via oral – ingestão pelo organismo, (III) injeção – aplicação no interior do corpo do organismo, (IV) fumigação – exposição via sistema respiratório e (V) contato indireto – exposição via solo, água ou superfície contaminada (Ángel-Salazar *et al.*, 2023; Blouquy *et al.*, 2021; Gokulakrishnaa; Thirunavukkarasu, 2023; Hao *et al.*, 2024).

Uma forma de triagem rápida é o uso da bioinformática, um campo em evolução importante para a agricultura e pesquisa científica. Esta ferramenta é capaz de analisar dados biológicos permitindo a descoberta de novas abordagens para o controle de pragas, tanto formulando novos compostos como detectando pesticidas e seus metabólitos, além de seus mecanismos de ação (Hou *et al.*, 2023; Kim; Seo, 2025; Melo; Andrade, 2024).

Além disso, existem bioensaios com a enzima AChE, que é inibida por pesticidas organofosforados (OF) (Chikte *et al.*, 2024). Este bioensaios são realizados por métodos como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), ensaios colorimétricos e biossensores de fluorescência (Bhattu; Verma; Kathuria, 2021). Entretanto, tais métodos possuem algumas limitações, por exemplo a CLAE, mesmo que adequada, possui altos custos, tempos longos de análise e a necessidade de treinamento do operador (Songa *et al.*, 2009). Métodos de biossensores fluorescentes exigem altas concentrações de fluoróforos, podendo levar à extinção devido a agregação (Bhatt *et al.*, 2021). Enquanto métodos colorimétricos utilizando o reagente de Ellman pode levar a falso-positivos e

negativos, devido a sua medição indireta da atividade da AChE (de Lima *et al.*, 2019; Martin-Romera *et al.*, 2024). Em contrapartida, sensores eletroquímicos são comumente utilizados para detectar organofosforados e carbamatos, devido a diversas vantagens (Bilal *et al.*, 2022; dos Santos Araújo *et al.*, 2025; Rodrigues *et al.*, 2018).

1.5 Biossensores eletroquímicos:

Sensores eletroquímicos em escala laboratorial são desenvolvidos com três eletrodos, sendo eles de trabalho (WE), de referência (RE) e um contra eletrodo (CE). A utilização de uma célula analítica de três eletrodos permite que o potenciostato mantenha constante o potencial entre o eletrodo de referência (RE) e o eletrodo de trabalho (WE), fornecendo a corrente necessária através do eletrodo auxiliar (CE). Esse arranjo evita que o RE conduza corrente e reduz erros experimentais. (Nehru; Chen; Dong, 2024). Entretanto, com os eletrodos convencionais (Figura 1.5-1, A) é necessário o reabastecimento da superfície do eletrodo de trabalho por meio da limpeza do eletrodo, podendo resultar em contaminações cruzadas, sendo possível contornar este problema com a utilização de eletrodos de *Screen-Printed carbon electrode* (Figura 1.5-1, B) (Eletrodo de carbono serigrafado) (Crapnell; Banks, 2024).

A escolha do material na qual os biossensores eletroquímicos são fabricados é de fundamental importância. Biossensores eletroquímicos de carbono, como os serigrafados, e de ouro são os materiais mais explorados para a construção de dispositivos devido a sua alta estabilidade, propriedades eletroquímicas, ampla janela de potencial operacional, custo-efetividade e facilidade de modificações de superfície (Duan *et al.*, 2025).

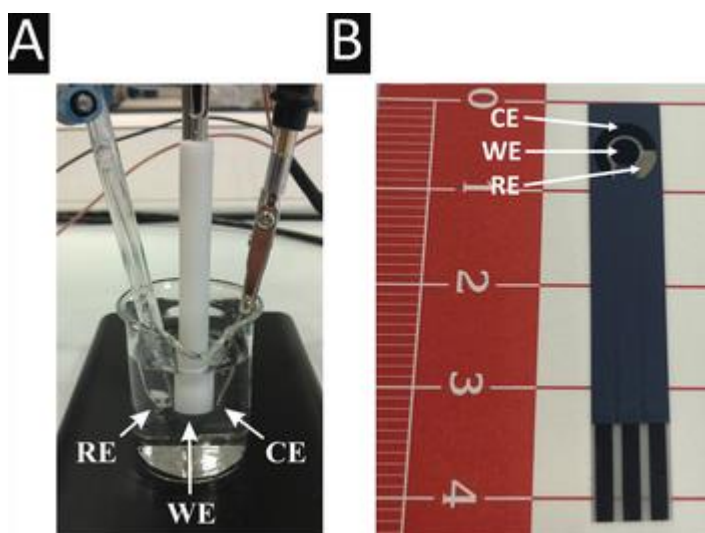


FIGURA 1.5-1 Representação de uma célula eletroquímica convencional e serigrafada. A): Célula eletroquímica convencional composta por um eletrodo de trabalho (WE, carbono vítreo com 3 mm de diâmetro), um contraeletrodo (CE, fio de níquel) e um eletrodo de referência (RE, eletrodo de calomelano saturado). B): Eletrodo serigrafado de carbono contendo um eletrodo de trabalho (3,1 mm de diâmetro), um contraeletrodo de carbono e um eletrodo de referência de Ag/AgCl (Crapnell; Banks, 2024).

Sensores serigrafados possuem diversas vantagens como: 1) Baixo custo - econômicos para pesquisa e indústria. 2) Descartáveis – evitam a contaminação e limpeza. 3) Miniaturização – permitem o uso de reagentes em microvolumes. 4) Uso de materiais diversos – como carbono, metais e grafeno. 5) Fabricação simples – aplicação da técnica de serigrafia é escalável e reproduzível. 6) Alta performance – transferência eletrônica eficiente. 7) Multitécnica - compatíveis com voltametria, impedância e etc. 8) Portáteis - ideais para campo e integração com smartphones. 9) Facilidade de comercialização – prontos para aplicação prática. 10) Pronto para uso – Sem necessidade de pré-tratamento com polimento. 11) Variedade de superfícies – Grafite, nanotubos, grafeno. 12) Resultados confiáveis – boa reprodutibilidade e repetibilidade. 13) Múltiplas aplicações- Saúde, ambiente, alimento, energia (Crapnell; Banks, 2024).

Além da escolha do material, na formulação de um biossensor é essencial selecionar adequadamente o biorreceptor, que é normalmente imobilizado na

superfície do eletrodo e tem a função de reconhecer seletivamente o analito de interesse. A transdução do sinal gerado a partir dessa interação é realizada pelo transdutor, que converte o evento bioquímico em um sinal mensurável (Duan *et al.*, 2025). Os tipos mais frequentes de biorreceptores são anticorpos, enzimas, células, aptâmeros, DNAs, biomiméticos (Khaleque *et al.*, 2024). Essa interação específica entre o analito alvo e a interface eletroquímica minimiza efetivamente os sinais falsos (Duan *et al.*, 2025). Além disso, biossensores baseados em enzimas possuem uma vantagem devido a rotatividade catalítica da enzima, que permite a transdução contínua do sinal (Duan *et al.*, 2025). A imobilização entre biorreceptores e a superfície dos sensores pode ser realizada com o aprisionamento em membrana e matriz, ligação covalente e iônica, adsorção física e reticulação intermolecular (Khaleque *et al.*, 2024).

Para o monitoramento da resposta bioquímica comumente é utilizado métodos voltamétricos, como voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada e voltametria de corrente alternada. Essas abordagens permitem acompanhar alterações associadas à transferência eletrônica do analito, oferecendo excelente sensibilidade e clareza nas correntes obtidas, facilitando a interpretação dos resultados (Wang, Yizhou *et al.*, 2024).

1.6 Acetilcolinesterase:

Biossensores eletroquímicos baseados em AChE são comumente utilizados para detecção de pesticidas (Bilal *et al.*, 2022; dos Santos Araújo *et al.*, 2025; Rodrigues *et al.*, 2018). Esse uso é devido a ação inibitória dos pesticidas sobre a AChE (Chikte *et al.*, 2024).

A AChE é uma serina protease que regula a neurotransmissão colinérgica, tendo importância biomédica devido a sua influência nos processos de memória e concentração (Bagrowska; Karasewicz; Góra, 2024). Sua função primária é a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético, esta hidrólise permite o término da sinalização colinérgica na sinapse (Reynoso-García *et al.*, 2025) (Figura 1.6-1). A região de ligação da AChE com a acetilcolina é

formada por uma fenda estreita e profunda, que abriga dois sítios funcionais: o sítio aniônico periférico (PAS), situado próximo à entrada, e o sítio catalítico ativo (CAS), localizado na parte mais profunda da fenda (Shi *et al.*, 2024).

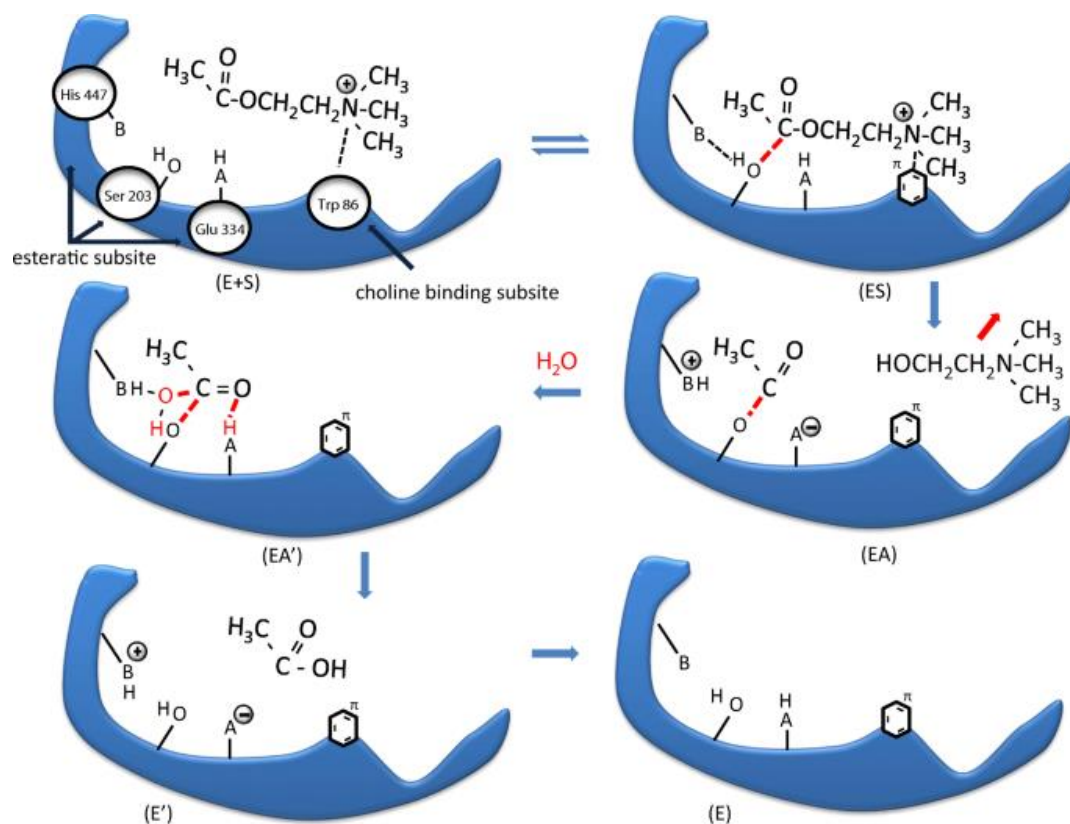


FIGURA 1.6-1 Representação esquemática das interações no interior do sítio ativo da AChE. É destacando a região onde ocorre a hidrólise da acetilcolina catalisada pela enzima. Apresentando o processo de reconhecimento da colina, mediado por interações π com resíduos aromáticos que promovem o posicionamento adequado do substrato, bem como a atuação dos subsítios esteráticos, responsáveis pela clivagem da ligação éster (Assis *et al.*, 2018).

Além da acetilcolinesterase, a butirilcolinesterase (BChE) também é capaz de hidrolisar ésteres de colina. Enquanto a AChE é específica para a acetilcolina a BChE não possui especificidade para este substrato e pode hidrolisar a butirilcolina. Ambas são da família das serinas esterases devido ao seu sítio catalítico caracterizado pela tríade Serina, Histidina e Glutamato (Ser-His-Glu), essencial para o mecanismo de ação (Reynoso-García *et al.*, 2025).

Em mamíferos, a AChE é originada de um único gene que gera três variantes por *splicing* alternativo: AChE-S (sináptica), AChE-E (eritrocitária) e AChE-R (solúvel), cada uma com diferentes regiões carboxi-terminais que definem sua localização e interações. Já nos insetos, a AChE é codificada por dois genes distintos, *ace-1* e *ace-2*, e a isoforma funcional dominante varia conforme a espécie. Uma das isoformas desempenha o papel sináptico clássico da enzima, enquanto a função da outra ainda é pouco compreendida (Knorr *et al.*, 2022).

A primeira purificação e cristalização em larga escala da AChE foi realizada com a enzima obtida da enguia elétrica (*Electrophorus electricus*), uma colinesterase que se apresenta como um tetrâmero (Salazar *et al.*, 2024). Enquanto a primeira purificação de acetilcolinesterase de formigas cortadeiras (*AsAChE-A* e *AsAChE-B*) foi relatada pela primeira vez em 2017, identificando que a *AsAChE-A* é um dímero e a *AsAChE-B* é um monômero (Santos, 2017).

O uso das AChEs como biomarcador de inseticidas organofosforados e carbamatos ocorre devido a esta enzima ser o primeiro alvo específico da ação desses pesticidas (Assis *et al.*, 2018). Quando bloqueada pelo pesticida a enzima pode seguir dois caminhos distintos, o primeiro é hidrolisá-lo em reativação espontânea lenta e o segundo, que ocorre com maior frequência, é o envelhecimento, em que a ligação entre a enzima e o pesticida se torna irreversível (Assis *et al.*, 2018) (Figura 1.6-2).

A exposição a organofosforados pode provocar efeitos tóxicos que variam de agudos a crônicos, conforme a intensidade e duração do contato com o composto. Em casos de intoxicação aguda, a inibição da acetilcolinesterase pode levar a uma estimulação excessiva do sistema nervoso, resultando em convulsões, falência respiratória e, potencialmente, morte (Assis *et al.*, 2018). Dessa forma, um inibidor específico para formigas cortadeiras levariam ao seu controle sem influenciar outros organismos ou meio ambiente.

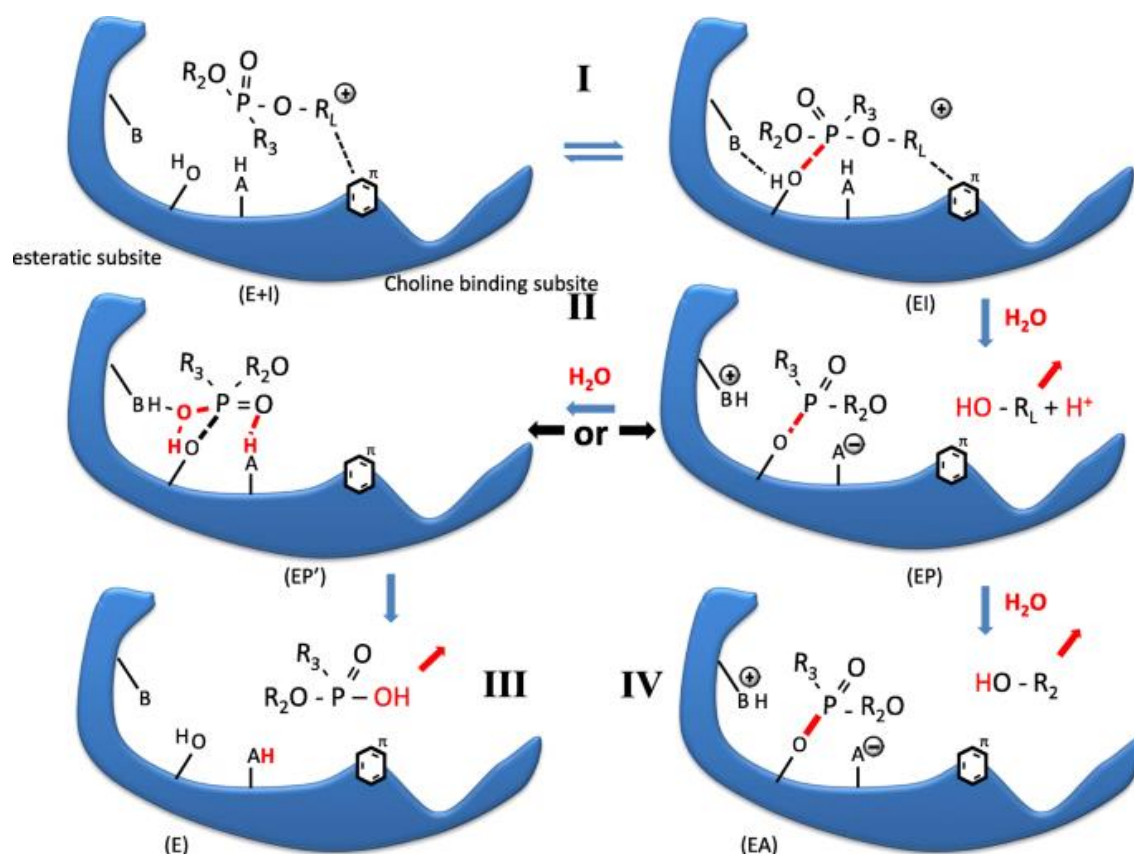


FIGURA 1.6-2 Representação da interação OF-AChE que resulta na inibição enzimática (Assis et al., 2018).

Na Figura 1.6-2 em I — O pesticida organofosforado (OF) se aproxima do sítio catalítico da enzima, sendo direcionado tanto pela afinidade com o subsítio de ligação da colina quanto pela estabilização do estado de transição durante a interação enzimática. As principais interações moleculares e ligações envolvidas são destacadas; II — Diagrama ilustrando os dois caminhos possíveis após a formação do complexo enzima-OP: à esquerda, a reativação espontânea da enzima; à direita, o processo de envelhecimento, que compromete sua atividade catalítica; III — Representação da enzima em sua forma livre, antes da ligação com o pesticida; IV — Inicialmente, o grupo R_2 retira densidade eletrônica do átomo de fósforo, enfraquecendo a ligação com a serina. Após sua remoção (envelhecimento), os elétrons são redistribuídos e fortalecem a ligação entre o

fósforo e o oxigênio da serina, tornando-a estável e resistente à clivagem, mesmo na presença de agentes reativadores como as oximas (Assis et al., 2018).

1.7 Otimização por Planejamento Composto Central:

A forma mais usual de se realizar a otimização de um trabalho é através do desenvolvimento de uma variável por vez, variando apenas os níveis de um dos fatores que influenciam a resposta, enquanto os demais estão fixados. Após esse processo, o nível otimizado é fixado e outro fator de influência é variado até que todas as variáveis sejam otimizadas (Almeida *et al.*, 2025; Neishaboori *et al.*, 2025). Entretanto, esse método necessita de muitos experimentos tornando-o demorado e sem valores ótimos, em razão do mesmo não considerar os efeitos mútuos das variáveis desejadas (Neishaboori *et al.*, 2025).

Assim, é aconselhável o uso de métodos que tem por objetivo a otimização de um estudo, como a combinação de inúmeras variáveis em substituição da otimização individual de cada uma, e uma vez que o número de ensaios é reduzido, o processo é então otimizado (Araujo; Silva, 2024). Nisso, o planejamento de experimentos (DoE) é uma das técnicas de otimização multivariada que atende diversas áreas do conhecimento humano. (Almeida *et al.*, 2025).

O DoE envolve um conjunto de técnicas estatísticas voltadas à análise sistemática das interações entre fatores e suas influências sobre um determinado processo. Ao explorar essas interações, é possível identificar as condições ideais para alcançar o melhor desempenho. O uso dessa abordagem proporciona benefícios expressivos, como aumento de eficiência, redução na dispersão dos dados, economia de tempo no desenvolvimento e diminuição dos custos operacionais (Araujo; Silva, 2024).

Entre as várias estratégias disponíveis, o planejamento composto central (PCC) se destaca por ser uma matriz clássica para construção de modelos de segunda ordem, sendo amplamente utilizado em diferentes áreas, como a indústria alimentícia, química, farmacêutica e de materiais. Sua popularidade se deve não

apenas à eficácia, mas também à sua acessibilidade e ampla aceitação no meio acadêmico como ferramenta prática e versátil (Almeida *et al.*, 2025).

Além disso, o PCC surgiu como uma evolução dos experimentos fatoriais clássicos, apresentando uma alternativa mais racional e econômica. Enquanto um planejamento fatorial completo com três fatores e cinco níveis exigiria 125 ensaios, o PCC atinge resultados comparáveis com apenas 20 execuções. Isso porque ele integra pontos fatoriais, axiais (ou estrela) e centrais, possibilitando a análise de cada fator em cinco níveis distintos (Lee *et al.*, 2015).

Outro aspecto importante é que o PCC oferece maior precisão na avaliação de efeitos combinados entre variáveis, superando modelos que analisam apenas uma variável por vez. Isso permite não apenas observar as interações entre os fatores, mas também construir superfícies de resposta que auxiliam na compreensão do sistema como um todo (Araujo; Silva, 2024). Assim, torna-se possível realizar otimizações robustas e bem fundamentadas estatisticamente, reduzindo tempo de desenvolvimento e custos operacionais.

A partir da análise estatística dos dados experimentais, utilizando técnicas de regressão múltipla, os pesquisadores conseguem interpretar o impacto individual e combinado das variáveis sobre a resposta. Com isso, podem identificar parâmetros críticos, estabelecer relações significativas entre as variáveis e definir as condições ótimas de operação (Iro *et al.*, 2024).

Neste trabalho, apresentamos a construção de biossensores baseados em acetilcolinesterase da enguia elétrica (*EelAChE*) e da formiga cortadeira (*AsAChE-A* e *AsAChE-B*) para a realização de uma triagem de possíveis inibidores de formigas cortadeiras através de fungos parasitas ao ninho, utilizando como método de otimização o planejamento composto central (PCC).

2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver plataformas de biossensores eletroquímicos baseados em acetilcolinesterases extraídas de formigas cortadeiras e acetilcolinesterase comercial de enguia elétrica, imobilizadas sobre eletrodos de carbono impressos descartáveis (*screen-printed carbon electrodes* — SPCEs), e aplicar estes biossensores na triagem de extratos microbianos visando à identificação de compostos com potencial inibitório enzimático.

2.1 Objetivos Específicos:

- Obter extratos de microrganismos presentes ao ninho de *Atta sexdens*;
- Construir biossensores eletroquímicos modificados com enzimas-alvo (acetilcolinesterase de formigas cortadeiras e da enguia elétrica (*Electrophorus electricus*));
- Otimizar a metodologia de biossensores eletroquímicos com planejamento composto central;
- Análise de inibidores conhecidos para validação do método;
- Analisar os extratos extraídos em mono e co-cultivo para triagem de potenciais inseticidas.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e reagentes utilizados:

1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), Hidroxibenzotriazol (HOBt), Tampão ácido 2-etanossulfônico (MES), Cloridrato de trometamina (Tris HCl), Monolaurato de polietilenoglicol sorbitano (TWEEN 20), Malation, Cloreto de acetiltiocolina (ATChCl), Iodeto de acetiltiocolina (ATChI), 1-propanetiol (C_3H_8S), Iodeto de potássio (KI), Iodo (I_2), Acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (EelAChE) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). As formigas cortadeiras para extração da enzima acetilcolinesterase foram cedidas pelo Centro de Estudos de Insetos Sociais (UNESP). Partículas magnéticas de ácido carboxílico (Dynabeads™, MyOne™) foram adquiridas pela Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Bromidrato de galantamina foi adquirido pela Ambeed (Arlington Heights, Illinois). Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), metanol, etanol e hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Para fabricação dos eletros foram utilizados: Pasta de carbono, Tinta de Ag/AgCl da SunChemical (Guarulhos, Brasil), Folha de policloreto de vinila (PVC) e Folha de vinil obtida em loja local. Os microrganismos testados foram obtidos conforme a Tabela 3.1-1.

TABELA 3.1-1: Dados dos microrganismos utilizados no estudo.

Microrganismo	Cepa	Origem
<i>Escovopsis microspora</i>	LESF019	<i>Atta sexdens rubropilosa</i> – Botucatu/SP (2013)
<i>Phialophora attae</i>	AP399	Gynes de <i>Atta capiguara</i> – Botucatu/SP (2012)
<i>Phialophora capiguarae</i>	AP376	Gynes de <i>Atta capiguara</i> – Botucatu/SP (2012)
<i>Exophiala dermatitidis</i>	AP426	Pellet de <i>Atta laevigata</i> – Botucatu/SP (2012)
<i>Exophiala spinifera</i>	AP449	Bitú de <i>Atta laevigata</i> – Botucatu/SP (2012)

3.2 Equipamentos utilizados:

As soluções relacionadas aos testes de inibição foram preparadas com água purificada do sistema Mili-Q da Millipore (Millipore, Bedford, EUA). Enquanto, para a fabricação dos eletrodos descartáveis, realizou-se os cortes do vinil por uma Gravadora e corte Laser 5.5w Tts-55 (Translaser, Florianópolis, Brasil) pelo software Light Burn. Para os experimentos eletroquímicos utilizou-se um multipotenciostato portátil μ STAT8000 da Dropsens (Metrohm, Espanha) através do software DropView 8400.

Por fim, para a construção dos modelos por Planejamento composto central foi utilizado os softwares Octave Online (<https://octave-online.net/>) e PyCharm Community Edition 2023.1.2.

3.3 Preparo de soluções:

Para a solução de Tampão fosfato salino (PBS) 10 mmol.L^{-1} utilizou-se os sais Na_2HPO_4 10 mmol.L^{-1} , KH_2PO_4 $1,8 \text{ mmol.L}^{-1}$, KCl $2,7 \text{ mmol.L}^{-1}$, NaCl 137

mmol.L⁻¹, ajustando o pH ao final. Para a solução PBS-Tween 20 preparou-se uma solução a 0,1% (m/v) (PBS-TW).

Para o preparo da solução EDC-HOBt utilizou-se tampão MES 100 mmol.L⁻¹, pH 6,0 para a solubilização de HOBt, após a solubilização o pH da solução varia ficando mais ácido, sendo necessário o ajuste do pH para próximo de 6 com uma solução de NaOH 1 M. Esta solução obtém uma concentração final de 74 mmol.L⁻¹, e em sequência o EDC foi dissolvido nesta solução, obtendo uma concentração de 460 mmol.L⁻¹. A solução de *Eel*AChE foi preparada em tampão Tris HCl 20 mmol.L⁻¹ pH 8 e mantida a -20 °C, enquanto as soluções de *As*AChE foram preparadas em tampão fosfato de potássio 50 mmol.L⁻¹ pH 8,0 e armazenada em 4 °C. As soluções de ATChCl e ATChI são preparadas em tampão PBS 10 mmol.L⁻¹. Por fim os inibidores malation e galantamina foram solubilizados em água Milli-Q.

3.4 Obtenção dos extratos dos microrganismos:

Os extratos utilizados nesse estudo foram obtidos a partir de microrganismos simbiossiontes presentes no ninho das formigas cortadeiras: *Escovopsis microspora*, *Phialophora attae*, *Phialophora capiguarae*, *Exophiala dermatitidis* e *Exophiala spinifera* (Tabela 3.1-1). Os microrganismos foram mantidos em placa Petri contendo ágar batata dextrose e incubados em estufa a 25 °C durante 7 dias para a espécie *E. microspora* e 28 dias para as demais espécies.

Para o monocultivo em larga escala, uma amostra (5 mm) de cada microrganismo após crescimento em ágar foi adicionada em caldo malte de levedura (250 mL) e mantida em câmara incubadora à 25 °C com agitação de 110 rpm durante 7 dias para a espécie *E. microspora* e 28 dias para as espécies de leveduras negras. Para o co-cultivo entre as leveduras negras e o microrganismo parasita, inicialmente as espécies do gênero *Phialophora* e *Exophiala* foram incubadas durante 21 dias e, em seguida, foi adicionado *E. microspora*. O sistema foi, então, mantido nas mesmas condições por mais 7 dias.

Após o período de incubação, o meio de cultura foi filtrado e particionado com acetato de etila duas vezes (1:1). O solvente foi removido a partir de rotaevaporador à pressão reduzida e temperatura de 40 °C.

3.5 Construção dos eletrodos descartáveis:

Os eletrodos descartáveis foram desenvolvidos através da técnica screen-printing, de acordo com a metodologia de Afonso e colaboradores (2016). (Afonso *et al.*, 2016). O modelo do eletrodo foi desenvolvido utilizando o software Light Burn de forma unitária (Figura 3.5-1), contendo um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar. Após a confecção dos eletrodos pelo Light Burn uma folha de vinil foi recortada via corte laser obtendo o modelo proposto. Em seguida, o vinil recortado é transferido para uma folha de PVC com o auxílio de um adesivo transferidor, de forma que o adesivo é removido após a colagem do vinil no PVC.

Com isso, a tinta de carbono é dispersa sobre o vinil através de um rolo. Em seguida, ocorre o processo de cura térmica, em que os eletrodos são mantidos em uma estufa à 45 °C por 1 hora. Após a cura, acontece a pintura do eletrodo de referência com a tinta de Ag/AgCl com o auxílio de um pincel, ocorrendo novamente a cura térmica à 60 °C por 30 minutos. Por fim, o vinil é totalmente retirado e em cada eletrodo um corte de vinil é colocado para demarcar a parte em que as soluções entram em contato, sendo isolada da parte conectada ao potenciostato, a fixação deste vinil ocorre com auxílio de uma prensa térmica à 120 °C por 130 segundos, retirando os eletrodos após o resfriamento do equipamento.

3.6 Extração da acetilcolinesterase de formigas cortadeiras:

3.6.1 Extração das enzimas:

A extração das enzimas ocorreu conforme descrito por Santos (2017) (Santos, 2017). As formigas utilizadas são da espécie *Atta sexdens* (saúva-limão) e foram mantidas sob refrigeração -80 °C até seu uso. Para a extração das enzimas provindas das formigas cortadeiras é necessário o auxílio de um bisturi e pinça

para a retirada das cabeças das formigas, recolhendo cerca de 1 g em um cadinho e macerando vigorosamente com um auxílio de pistilo em 10 mL de tampão KH_2PO_4 50 mmol.L^{-1} pH 8. A solução formada é coletada em um tubo tipo falcon evitando as partes sólidas e centrifugada à 25 °C por 5 min à 1500 g.

3.6.2 Precipitação das enzimas:

A solução oriunda da extração foi precipitada com sulfato de amônio 2,66 M, para isto macera-se o sal para obtenção de um pó fino e adiciona-se aos poucos em um período de 10 min, sendo a solução mantida sob constante agitação. Após a adição completa do sulfato de amônio a agitação é cessada aguardando um período de 50 min. Com isso, o extrato é transposto para um tubo falcon e levado à centrifugação à 25 °C, 10300 g por 1 h. Nesta etapa o sobrenadante é descartado e o pellet ressuspendido com 1 mL de tampão KH_2PO_4 50 mmol.L^{-1} pH 8, a solução é transferida para outro tubo Falcon e completada com um volume de 2,5 mL de tampão.

3.6.3 Diálise da solução:

A solução adquirida na etapa anterior é imposta a um sistema de diálise (Slide-A-Lyzer MINI dialysis 2 mL) com aproximadamente 45 mL de tampão KH_2PO_4 50 mmol.L^{-1} pH 8, mantido à 4 °C e agitação branda com o auxílio de um agitador magnético por 1 h. O tampão deve ser repostado por 3 vezes com o intervalo de 1 h cada, permanecendo em período de overnight na última troca.

3.6.4 Purificação em coluna HiPrep DEAE Sepharose FF:

Para a purificação, as amostras foram aplicadas em uma coluna de exclusão molecular HiPrep DEAE Sepharose FF acoplada a um sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com tampão KH_2PO_4 50 mmol.L^{-1} (pH 8,0), sendo adicionado KH_2PO_4 com NaCl 1 mol.L^{-1} de forma gradiente pelo método desenvolvido. A eluição das frações foi realizada de forma isocrática, com vazão constante de 0,3 mL/min (Santos, 2017).

3.6.5 Concentração da *AsAChE-B*:

Através do cromatograma adquirido pelo AKTA FPLC (GE Healthcare), determinou-se quais frações se encontram a *AsAChE-A* e *AsAChE-B*. Como a *AsAChE-A* possui pouca afinidade com a coluna ela se encontra no início do cromatograma, enquanto a *AsAChE-B* se encontra em sequência. Para confirmar a presença das *AsAChEs* nos tubos de fracionamento utiliza-se o método descrito na sessão 3.6.10. Confirmando a presença de enzima, as frações são coletadas e concentradas em filtro para centrífuga (Amicon® Ultra, 10 kDa MWCO, 0,5 mL) a 10000 rcf, até o volume total de 200-250 µL. Após a concentração a enzima é armazenada à 4 °C até seu uso.

3.6.6 Purificação da *AsAChE-A* em coluna *HiTrap™Phenyl HP*:

Após a junção das frações da *AsAChE-A*, sendo a presença desta enzima confirmada pelo método da sessão 3.6.10, a solução é precipitada com sulfato de amônio 1,5 M. O sal é adicionado aos poucos em um período de 10 min sob agitação branda, aguardando 50 min após este processo e adicionando a solução resultante em um tubo falcon. Em seguida ocorre a centrifugação à 4 °C, 9000 rpm por 7 min. Por fim o sobrenadante é retirado e transposto para um novo Falcon.

Em sequência da nova precipitação a enzima é purificada em uma coluna de exclusão molecular. Para a purificação, as amostras foram aplicadas em uma coluna de exclusão molecular HiPrep DEAE Sepharose FF HiTrap™Phenyl HP acoplada a um sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com tampão (KH_2PO_4 com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M), pH 8 adicionando o tampão KH_2PO_4 gradativamente. A eluição das frações foi realizada de forma isocrática, com vazão constante de 0,3 mL/min.

3.6.7 Concentração da *AsAChE-A*:

O mesmo método descrito no tópico 3.6.5 foi aplicado para a concentração da *AsAChE-A*. Entretanto, o sulfato de amônio influencia no teste colorimétrico.

Assim, deve-se realizar um Branco para cada fração de acordo com a porcentagem de sulfato de amônio em que a fração se encontrava.

3.6.8 Determinação da concentração das enzimas pelo protocolo de Bradford:

Através de uma diluição com 25 μL de *AsAChE-B* em 25 μL de água Milli-Q, adicionou-se 20 μL da solução diluída em 980 μL de reagente Bradford em uma cubeta de quartzo, aguardando 5 min e analisando a amostra em um espectrofotômetro. O mesmo método ocorre para *AsAChE-A*, entretanto ela não é diluída. Além disso, o branco é composto por 1000 μL do reagente de Bradford.

3.6.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida:

Para confirmação e identificação das proteínas isoladas na suspensão final aplicou-se o método de eletroforese em gel de poliacrilamida. Para isso, dois géis são necessários, o de corrida e o de empilhamento, preparados segundo a Tabela 3.6-1.

TABELA 3.6-1: Preparo do gel de poliacrilamida para SDS-PAGE.

Gel de corrida		Gel de empilhamento	
Reagente	Volume (μL)	Reagente	Volume (μL)
H ₂ O	2.400	H ₂ O	1.350
Bis-acrilamida	3.000	Bis-acrilamida 30%	335
Tris HCl pH 8.8	1.950	Tris HCl pH 6.8	250
SDS 10%	45	SDS 10%	20
Persulfato de amônio	75	Bissulfato de amônio	20
TEMED	3	TEMED	2

Dessa forma, ocorre a polimerização do gel em um suporte acrílico, e é adicionado nos poços gerados 10 μL do controle de peso molecular 14-116 kD e 10 μL de amostra de cada etapa realizada em todo processo de purificação separadamente. As amostras correm através da cuba de eletroforese.

Com isso, ocorre a coloração do gel com corante azul de coomassie mantendo sobre agitação branda por 24 h. Em sequência o gel é transferido para um recipiente com solução de ácido acético 7% e visualizado através de um compartimento transiluminador pelo software ImageLab. As enzimas *AsAChE*-A e B devem ser identificadas aproximadamente em 48-55 kDa, respectivamente.

3.6.10 *Ensaio de atividade das enzimas acetilcolinesterase:*

Os ensaios de atividade são preparados pelo método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961), avaliado espectrofotometricamente (DU 800 UV/Vis Detector DTX 880 Beckman Coulter). A atividade enzimática foi determinada por meio da reação entre acetiltiocolina e o reagente de Ellman, o ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), na qual ocorre a formação do ânion 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), de coloração amarela e absorção em 412 nm. O sistema reacional foi constituído por tampão Tris-HCl (0,5 M; pH 8,0), DTNB (6 mmol.L⁻¹) e iodeto de acetiltiocolina (6 mmol.L⁻¹).

As análises foram conduzidas com volumes distintos de amostra enzimática: 30 µL para enzimas nativas. Após a preparação das reações, a leitura espectrofotométrica foi realizada após 10 minutos de incubação. A conversão da absorbância em unidades de atividade enzimática (U) seguiu a equação proposta por Ellman e colaboradores, 1961 (Santos, 2017).

$$U \text{ (M/min)} = \text{Absorbância/min}/\epsilon \quad \text{Equação 1}$$

Onde ϵ é o coeficiente de extinção.

3.7 *Imobilização das AChE's em partícula magnética:*

As partículas magnéticas (PMs) foram inicialmente dispersas em banho ultrassônico por 10 minutos para homogeneização. Em seguida, foram submetidas à agitação à 400 rpm por 5 minutos. Após essa etapa, 90 µL da suspensão de PMs foram transferidos para microtubos contendo 500 µL de tampão MES (100 mmol.L⁻¹, pH 6,0). As partículas foram lavadas três vezes por separação magnética com o mesmo tampão. As PMs lavadas foram então incubadas sob

agitação lenta, contendo 1 mL de uma solução de ativação contendo EDC ($0,46 \text{ mol.L}^{-1}$) e HOBt (74 mmol.L^{-1}) preparada em tampão MES (100 mmol.L^{-1} , pH 6,0) por 30 minutos. Após a ativação, as partículas foram novamente lavadas três vezes com tampão MES, como consta na Figura 3.7-1. A reação EDC/HOBt com os grupos carboxilas das partículas magnéticas está descrita na Figura 3.7-2.

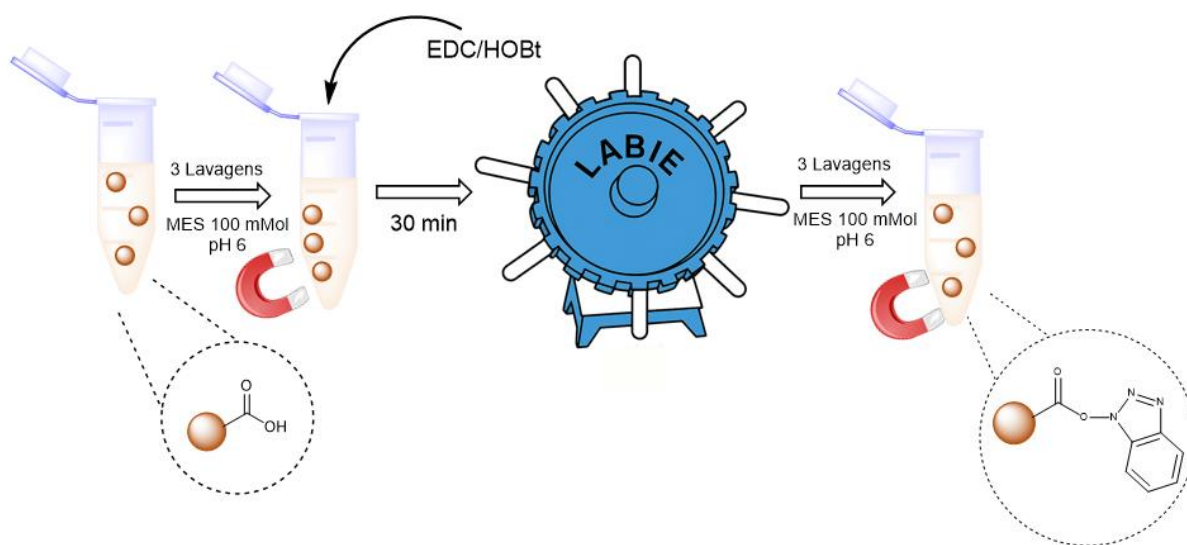


FIGURA 3.7-1 Primeira etapa de imobilização das AChEs em partícula magnética (Ativação EDC/HOBt) Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

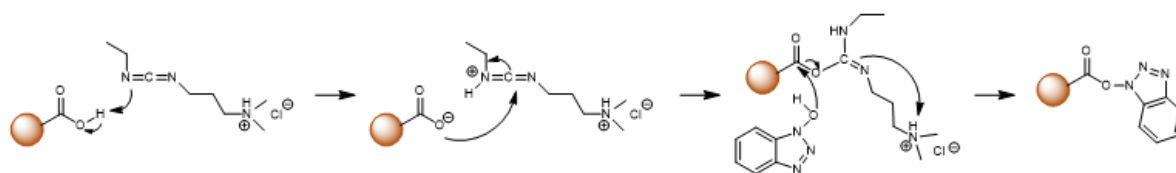


FIGURA 3.7-2: Reação EDC/HOBt com grupos carboxila das partículas magnéticas.

Em seguida, adicionou-se $500 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução enzimática $7 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ preparada em PBS (10 mmol.L^{-1} , pH 7,4), e a suspensão foi incubada sob agitação leve por um período de 30 min. As duas etapas descritas resultam em uma reação essencial para a imobilização das enzimas nas partículas magnéticas. Nessa reação, o EDC promove a ativação dos grupos carboxila presentes na superfície das partículas, permitindo a formação de ligações amida por meio da reação com

grupos amins dos aminoácidos das enzimas. O HOBt, por sua vez, estabiliza o intermediário reacional gerado, favorecendo a formação da ligação amida de forma mais eficiente. Além disso, o uso do HOBt possibilita a reação com uma variedade maior de resíduos de aminoácidos em comparação a reagentes convencionais, como o NHS (Fioramonte *et al.*, 2018). A reação e metodologia está descrita na Figura 3.7-3.

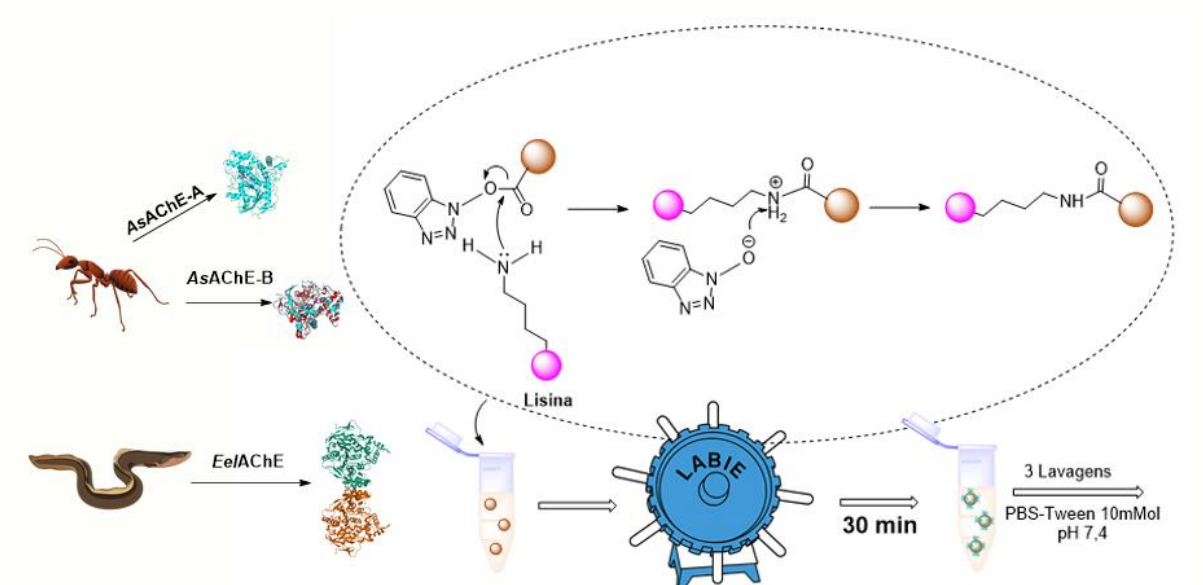


FIGURA 3.7-3: Metodologia de imobilização para enzimas expressando a reação com grupos amins de seus aminoácidos. *AsAChE-A* e *AsAChE-B* (Santos, 2017) *EelAChE* (Bourne *et al.*, 1999).

Após a imobilização, as PMs foram lavadas três vezes com PBS (pH 7,4) contendo 0,01% de Tween 20 e incubadas com 1 mL de etanolamina (1 mmol.L^{-1} em PBS, pH 7,4) por 1 hora para bloqueio dos sítios ativos remanescentes. Finalizada a incubação, foram realizadas mais três lavagens com PBS/Tween 0,05%, e as PMs foram ressuspensas em $500 \text{ }\mu\text{L}$ de PBS (pH 7,4). Como ilustrado na Figura 3.7-4. Por fim, as partículas funcionais foram armazenadas a 4°C até o uso.

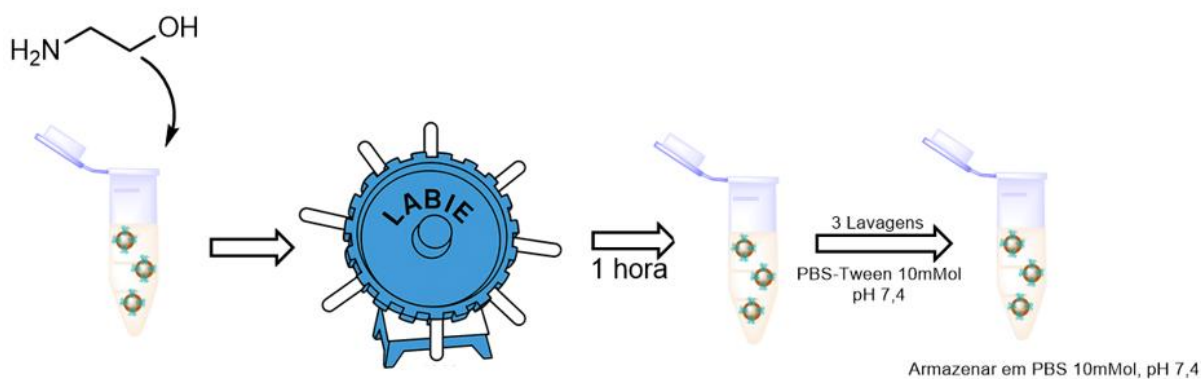


FIGURA 3.7-4: Metodologia de bloqueio dos sítios ativos remanescentes com etanolamina.

3.8 Otimização da imobilização enzima/partículas magnéticas:

Para a otimização da etapa de imobilização da enzima nas partículas magnéticas, um estudo baseado em planejamento composto central foi realizado, obtendo 4 pontos centrais e pontos axiais em -2 e 2. Para isso foram realizados 18 experimentos distintos apresentados na Tabela 3.8-1 e para cada experimento foram realizadas 5 medidas diferentes (uma medida por biossensor). Os resultados apresentados na Tabela 3.8-1 são a média dos cinco valores de correntes anódicas (μA) obtidas para cada experimento. A metodologia de imobilização está descrita na sessão 3.7 e as respostas eletroquímicas foram obtidas através da reação de oxidação da tiocolina, que é o produto da reação entre a AChE e o substrato cloreto de acetiltiocolina (Figura 4.2-2). Para as respostas da otimização da imobilização da AChE nas partículas magnéticas, foram adicionados 260 μL de uma solução de cloreto de acetiltiocolina ($5,06 \text{ mol.L}^{-1}$) em PBS 10 mmol L^{-1} pH 7,4, em um volume de 50 μL de PMs-AChE.

TABELA 3.8-1: Planejamento composto central com valores codificados e reais.

Experimentos	v1	[PM's]	v2	[ACHE]	v3	Tempo
<i>1</i>	-1	50	-1	3	-1	2
<i>2</i>	1	90	-1	3	-1	2
<i>3</i>	-1	50	1	7	-1	2
<i>4</i>	1	90	1	7	-1	2
<i>5</i>	-1	50	-1	3	1	5
<i>6</i>	1	90	-1	3	1	5
<i>7</i>	-1	50	1	7	1	5
<i>8</i>	1	90	1	7	1	5
<i>9</i>	0	70	0	5	0	3,3
<i>10</i>	0	70	0	5	0	3,3
<i>11</i>	0	70	0	5	0	3,3
<i>12</i>	0	70	0	5	0	3,3
<i>13</i>	-2	30	0	5	0	3,3
<i>14</i>	2	110	0	5	0	3,3
<i>15</i>	0	70	-2	1	0	3,3
<i>16</i>	0	70	2	9	0	3,3
<i>17</i>	0	70	0	5	-2	0,3
<i>18</i>	0	70	0	5	2	6,3

V1 = Variável 1

[PM's] = Concentração de partícula magnética (mg/mL)

V2 = Variável 2

[ACHE] = Concentração de acetilcolinesterase (µg/mL)

V3= Variável 3

Tempo = Tempo de imobilização da enzima com a partícula magnética (min)

De acordo com os resultados obtidos, foi calculado um modelo de regressão linear, utilizando o software Octave, na sua versão online, com a rotina computacional “regression2”. Empregando a Equação 2, cujos termos derivam do modelo de regressão, foram então gerados os gráficos de contorno e superfície de resposta utilizando uma codificação implementada no software PyCharm Community Edition 2023.1.2 (Anexo 1), de modo a verificar a região de máxima resposta.

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3$$

Equação 2

Sendo y a resposta, β_0 o coeficiente constante na qual estima o valor médio de todas as respostas. β_1 , β_2 e β_3 os coeficientes lineares dos efeitos principais. β_{11} , β_{22} e β_{33} os coeficientes quadráticos, que apresenta a curvatura da resposta em relação as variáveis, e β_{12} , β_{13} e β_{23} às variáveis e suas interações, obtidos a partir do modelo de regressão. Ademais, foram calculados os efeitos de cada uma das variáveis e suas interações.

3.9 Avaliação da resposta eletroquímica frente a acetiltiocolina utilizando planejamento composto central:

Para realizar a otimização da imobilização enzima/partículas magnéticas, um estudo baseado em planejamento fatorial 2^3 completo foi realizado, obtendo 4 pontos centrais e pontos axiais em -2 e 2. Este planejamento apresentou respostas com diferentes concentrações de acetiltiocolina, de tempo de reação entre a enzima e o substrato e concentração de partícula magnética imobilizada. Para isso foram realizados 18 experimentos distintos apresentados na Tabela 3.9-1 e para cada experimento foram realizadas 4 medidas diferentes. Os resultados apresentados na Tabela 3.9-1 são a média dos quatro valores de correntes anódicas (μA) obtidas para cada experimento. As respostas amperométricas foram obtidas através da reação de oxidação da tiocolina, produto da reação entre cloreto de acetiltiocolina e a AChE.

Para o processo de avaliação da resposta eletroquímica frente a acetiltiocolina, foram utilizadas as condições de imobilização encontradas no planejamento fatorial composto central de imobilização, em que a concentração de partícula magnética utilizada é de $1,4 \text{ mg mL}^{-1}$, a concentração de acetilcolinesterase de $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ e um tempo de imobilização de 30 min. Diferente do planejamento para a imobilização, esta avaliação ocorreu para as três enzimas acetilcolinesterase.

TABELA 3.9-1: Planejamento composto central com valores codificados e reais para avaliação da resposta eletroquímica.

Experimentos	v1	[ATCh]	v2	Tempo	v3	[PM's+Sub]
1	-1	2,53	-1	10	-1	40
2	1	10,1	-1	10	-1	40
3	-1	2,53	1	20	-1	40
4	1	10,1	1	20	-1	40
5	-1	2,53	-1	10	1	80
6	1	10,1	-1	10	1	80
7	-1	2,53	1	20	1	80
8	1	10,1	1	20	1	80
9	0	5,06	0	15	0	60
10	0	5,06	0	15	0	60
11	0	5,06	0	15	0	60
12	0	5,06	0	15	0	60
13	-2	1,26	0	15	0	60
14	2	20,2	0	15	0	60
15	0	5,06	-2	5	0	60
16	0	5,06	2	25	0	60
17	0	5,06	0	15	-2	20
18	0	5,06	0	15	2	100

V1 = Variável 1

[ATChCl] = Concentração de substrato (mmol.L^{-1})

V2 = Variável 2

Tempo = Tempo de reação substrato + Biossensor (min)

V3= Variável 3

[PM's+Sub] = Alíquota Partícula funcionalizada μL

De acordo com os resultados obtidos, foi calculado um modelo de regressão linear, utilizando o software Octave, na sua versão online, com a rotina computacional “regression2”. Empregando a Equação 3, cujos termos derivam do modelo de regressão, foram então gerados os gráficos de contorno e superfície de resposta utilizando uma codificação implementada no software PyCharm Community Edition 2023.1.2 (Anexo 1), de modo a verificar a região de máxima resposta.

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3$$

Equação 3

Sendo a resposta y , β_0 o coeficiente constante na qual estima o valor médio de todas as respostas. β_1 , β_2 e β_3 os coeficientes lineares dos efeitos principais. β_{11} , β_{22} e β_{33} os coeficientes quadráticos, que apresenta a curvatura da resposta em relação as variáveis, e β_{12} , β_{13} e β_{23} às variáveis e suas interações, obtidos a partir do modelo de regressão. Ademais, foram calculados os efeitos de cada uma das variáveis e suas interações.

3.10 Avaliação da resposta eletroquímica frente a variação de pH da acetiltiocolina:

As seguintes condições foram determinadas pelo planejamento composto central de imobilização, sendo: a concentração de partícula magnética ($1,4 \text{ mg.mL}^{-1}$), a concentração de AChE ($7 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) e um tempo de imobilização de 30 min, em adição as seguintes condições foram determinadas pelo planejamento composto central do substrato, sendo: $5,06 \text{ mmol.L}^{-1}$ de acetiltiocolina, 10 min de reação e uma alíquota de $60 \text{ }\mu\text{L}$. Estabelecidas tais condições, realizou-se um estudo de efeito da variação de pH, referente ao PBS (solução do substrato) nas leituras eletroquímicas, com as faixas de pH variando entre 6; 6,5; 7; 7,4; 8 e 8,5.

3.11 Estudo de inibição das enzimas pelo Malation:

Neste estudo, foi otimizado o tempo da ação do inseticida malation sobre a acetilcolinesterase utilizando o biossensor desenvolvido. Os tempos de reação variaram entre 5, 10, 15, 20 e 25 min. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e foram utilizados $260 \text{ }\mu\text{L}$ de uma concentração de 7 mg L^{-1} do inibidor. A reação ocorreu em um tubo de microcentrífuga contendo as PM/AChE sob agitação lenta em um Cral Plast Agitador Manual Vortex 0-300 rpm. Após o tempo de incubação, as PM/AChE são separadas com um auxílio de uma estante magnética, o sobrenadante é descartado e é adicionado $260 \text{ }\mu\text{L}$ de substrato

acetiltiocolina $10,1 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 7. Após 10 min de reação, que ocorre sob a mesma forma de agitação, as PM/AChE são separadas novamente e o sobrenadante é coletado. O sobrenadante então é aplicado na superfície do eletrodo e analisado no μStat Multi Potentiostat Metrohm. A metodologia está descrita nas Figuras 3.11-1 e 3.11-2.

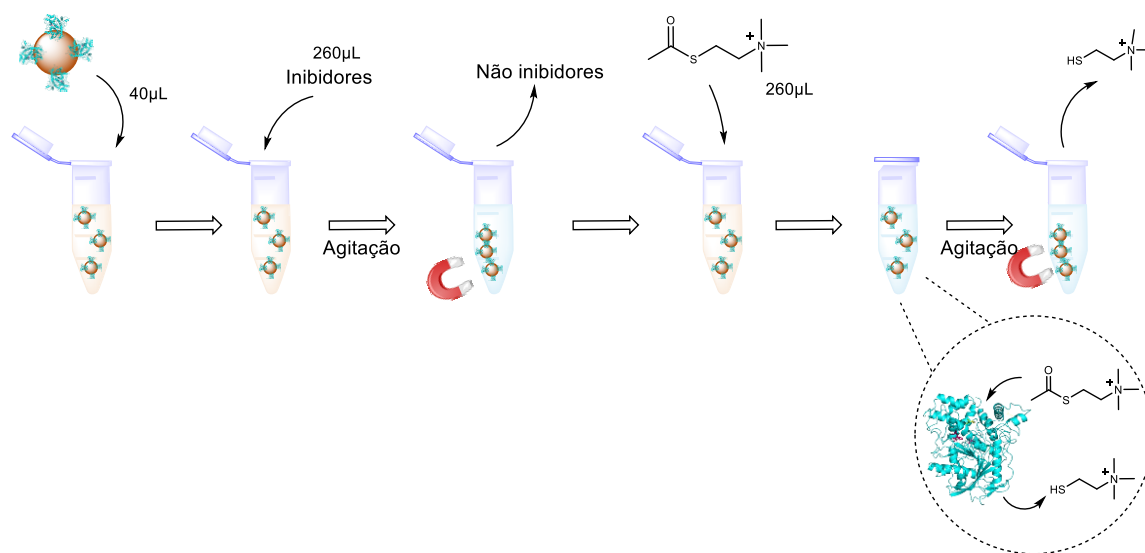


FIGURA 3.11-1: Metodologia de inibição da acetilcolinesterase analisadas pela reação eletroquímica da acetiltiocolina. Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

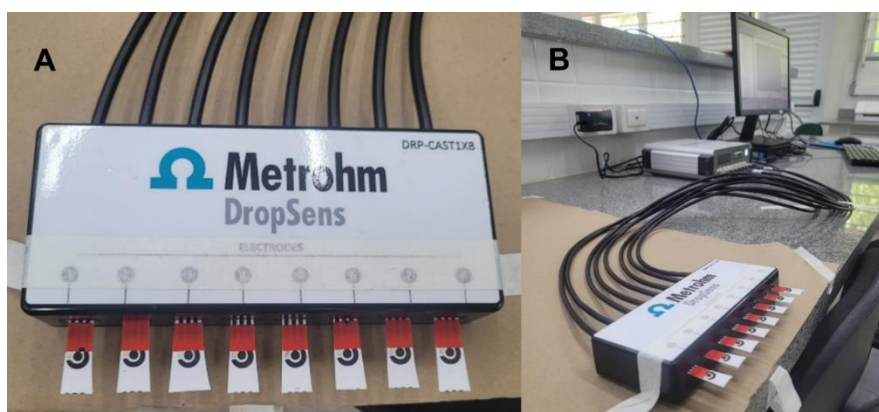


FIGURA 3.11-2: Eletrodos descartáveis conectados ao potenciostato(A); Potenciostato de bancada (B).

3.12 Avaliação da atividade inibitória através da concentração:

Com o tempo definido através da metodologia anterior, os bioensaios de inibição foram conduzidos testando as seguintes concentrações de inibidores

sobre os eletrodos: 1 mg.L⁻¹; 5 mg.L⁻¹; 9 mg.L⁻¹; 13 mg.L⁻¹ e 15.mg L⁻¹. Após o tempo demarcado de ação dos inibidores, o procedimento seguiu a metodologia da sessão anterior e as curvas analíticas foram construídas através do processo de inibição enzimática. Foram calculadas as porcentagens de inibição (% I) em razão da variação das soluções de malation apenas para *AsAChE-A* e *AsAChE-B*, enquanto os cálculos da galantamina e extratos brutos foram realizados para as três enzimas.

Os cálculos de inibição ocorreram aplicando a Equação 4.

$$\% I = \frac{I_0 - I_1}{I_0} \times 100$$

Equação 4

Sendo I_0 as correntes medidas sem a presença de inibidor (Branco) e I_1 as correntes obtidas através da incubação dos biossensores com o inibidor.

Os cálculos de limite de detecção e de quantificação são expressos na Equação 5 e 6 respectivamente.

$$LD = \frac{3 \times SD}{b}$$

Equação 5

$$LQ = \frac{10 \times SD}{b}$$

Equação 6

Sendo b o coeficiente angular da reta e SD o desvio padrão de amostras sem inibição.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Planejamento composto central para imobilização da acetilcolinesterase em partículas magnéticas:

Para identificar a melhor condição de imobilização da acetilcolinesterase nas partículas magnéticas, foi utilizado um planejamento fatorial composto central, em que as regiões axiais variaram entre -2 a 2, devido ao planejamento apresentar três variáveis. Para obter uma maior precisão nos experimentos, os pontos axiais não foram obtidos em -1,68 e 1,68, em razão de que neste planejamento utiliza-se elementos biológicos que podem apresentar desvio padrão significativo nas repostas obtidas. Desta forma, a fim de minimizar possíveis erros utilizou-se parâmetros de valores inteiros. Tarapara (2021), afirma que não é necessário que o ponto axial esteja com valores exatos, sendo que para três variáveis pode-se utilizar o valor equivalente a 1,5 (Tarapara; Divecha, 2023). Entretanto, não há valores inteiros para pontos axiais 1,5, sendo necessário extrapolar para valores de -2 e 2, como realizado em por Ali (2016) (Ali; Noor, 2016).

Os valores das respostas são referentes a corrente anódica gerada pela reação de oxidação da tiocolina, que é um dos produtos formados na reação enzimática AChE-acetilcolina. Quando a ligação do grupo tiol presente no substrato é rompida pela enzima acetilcolinesterase, forma-se a tiocolina, que por sua vez é oxidada pela corrente aplicada e o produto desta oxidação é o dímero ditio-bis-colina (Vide no item 4.2; figura 4.2-2 p. 43).

Com este modelo de planejamento foi possível identificar os efeitos mais importantes para a metodologia de imobilização, assim como se há ou não interação entre os efeitos. Os resultados obtidos constam na Tabela 4.1-1. Sendo variável 1 (v1) a concentração de partículas magnéticas, variável 2 (v2) a concentração da enzima acetilcolinesterase de *E. electricus* e variável 3 (v3) o tempo de imobilização entre a enzima e a partícula magnética.

TABELA 4.1-1: Planejamento composto central codificado com a média das respostas obtidas em quintuplicata.

Experimentos	v1	v2	v3	$\bar{x}$ (I / μA)
1	-1	-1	-1	5,510
2	1	-1	-1	5,141
3	-1	1	-1	6,306
4	1	1	-1	9,684
5	-1	-1	1	3,703
6	1	-1	1	4,136
7	-1	1	1	7,056
8	1	1	1	7,904
9	0	0	0	5,580
10	0	0	0	4,473
11	0	0	0	4,214
12	0	0	0	5,392
13	-2	0	0	5,418
14	2	0	0	6,973
15	0	-2	0	2,574
16	0	2	0	9,577
17	0	0	-2	5,734
18	0	0	2	5,177

V1 = Variável 1 (Concentração de partícula magnética)

V2 = Variável 2 (Concentração de acetilcolinesterase)

V3= Variável 3 (Tempo de imobilização entre a acetilcolinesterase e a partícula magnética)

$\bar{x}$ (I / μ A) = Média das correntes obtidas como resposta. Correntes obtidas por VOQ em 260 μ L de uma solução ATChCl 5,06 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol L⁻¹ pH 7,4, em um volume de 50 uL de Enzima/Partícula magnética. a = 50 mV; f = 50 Hz; s = 0,002 V (parâmetros otimizados para este trabalho). Tempo de reação= 10 min.

A partir de uma quadruplicata do ponto central (experimentos 9-12), foi calculada uma soma quadrática do erro puro (SQEP) utilizando a Equação 7, obtendo um valor de 1,3560 com grau de liberdade igual à 3.

$$SQEP = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \text{ Equação 7}$$

Sendo x_i o valor de resposta de cada réplica, “ $\bar{x}$ ” a média entre elas e “ n ” o número de réplicas do ponto central. A avaliação da significância estatística do modelo foi realizada comparando as médias quadráticas de regressão (MSreg) e dos resíduos (MSres). O valor de MSreg deve ser maior que MSres, pois com esta diferença entre as variâncias pode-se interpretar que MSreg não se confunde com MSres, como consta em Pereira e Pereira-Filho, 2018 (Pereira; Pereira-Filho, 2018), condizente ao apresentado no modelo aqui proposto, MSreg (55,5094) e MSres (4,5981). Além disso, a razão entre os valores de $F_{\text{calculado}}$ (10,73) preferencialmente deve ser algumas vezes maior que o F_{tabelado} (3,29), cerca de 10 vezes maior para que o modelo seja apresentado como confiável, podendo ser utilizado para previsões. No caso deste modelo, o $F_{\text{calculado}}$ não apresentou uma razão 10 vezes maior que o tabelado. Entretanto, a média quadrática de falta de ajuste ($MS_{\text{falta de ajuste}}$, 3,2421) foi maior que a média quadrática do erro puro (MSEP, 1,356), sendo a razão do $F_{\text{calculado(falta de ajuste)}}$ (1,4346) e $F_{\text{tabelado(falta de ajuste)}}$ (5,41) de falta de ajuste menor do que 1, indicando que o modelo não apresenta falta de ajuste.

Ademais, o modelo apresentou um R^2 de 92,35%, indicando a porcentagem dos dados que o modelo foi capaz de explicar, com uma variação explicável máxima igual à 97,74% ($R^2_{\text{max}} = 0,9774$).

A significância estatística dos coeficientes foi examinada, considerando significativos em um nível de confiança de 95%. Com isso, foi obtida a equação de regressão Equação 8 em que y é a resposta, v_1 a concentração de partículas magnéticas, v_2 a concentração de acetilcolinesterase (*EelAChE*):

$$y = 5,05 + 0,46v_1 + 1,65v_2 \quad \text{Equação 8}$$

Além disso, a influência das variáveis avaliadas na resposta final foi calculada através da Equação 9. Sendo β_i o coeficiente de regressão associado a um termo X_i . A influência relativa de cada termo pode ser estimada pela soma dos quadrados dos efeitos.

$$\text{Porcentagem de influência}_i = \frac{\beta_i^2}{\sum_{j=1}^n \beta_j^2} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

A concentração de partículas magnéticas apresentou uma influência de 5,8% aos resultados das correntes obtidas, enquanto a concentração de enzima (*EelAChE*) possui a maior influência com 74,5%, e o tempo de reação de imobilização da enzima nas partículas magnéticas não possui influência significativa, alcançando 2,61%. Em relação a interação das variáveis, a interação de maior porcentagem foi entre a concentração de partículas magnéticas com a concentração de enzima (*EelAChE*) com 7,37% de influência. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 4.1-2.

TABELA 4.1-2: Porcentagem de influência das variáveis e interações a partir do planejamento composto central para *EelAChE*.

Variáveis e interações	Influência dos efeitos (%)
1	6,2
2	80,1
3	2,8
12	7,9
13	1,4
23	1,4

Porcentagens de influência dos efeitos calculadas através da Equação 9.

Com base nisso, construiu-se gráfico de superfície (Figura 4.1-1, A) e de contorno (Figura 4.1-1, B) para as variáveis significativas. Observou-se o maior valor de corrente que se pode obter com esta metodologia, nas condições de 5,06 mmol.L⁻¹ de acetiltiocolina e 10 min de reação do substrato com a *EelAChE* imobilizada é de $I_{pa} = 15,0 \mu A$. Porém, nestas condições utiliza-se uma

concentração de $2,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ de partícula magnética e $9 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de enzima. A fim de diminuir a quantidade de reagentes utilizados, foi escolhida a concentração de $1,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ de partículas magnéticas e $7 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de acetilcolinesterase ($I_{\text{pa}} = 7,0 \text{ uA}$) em um tempo de imobilização de 30 min, devido a variável 3 não ser significativa para a imobilização da AChE nas PMs.

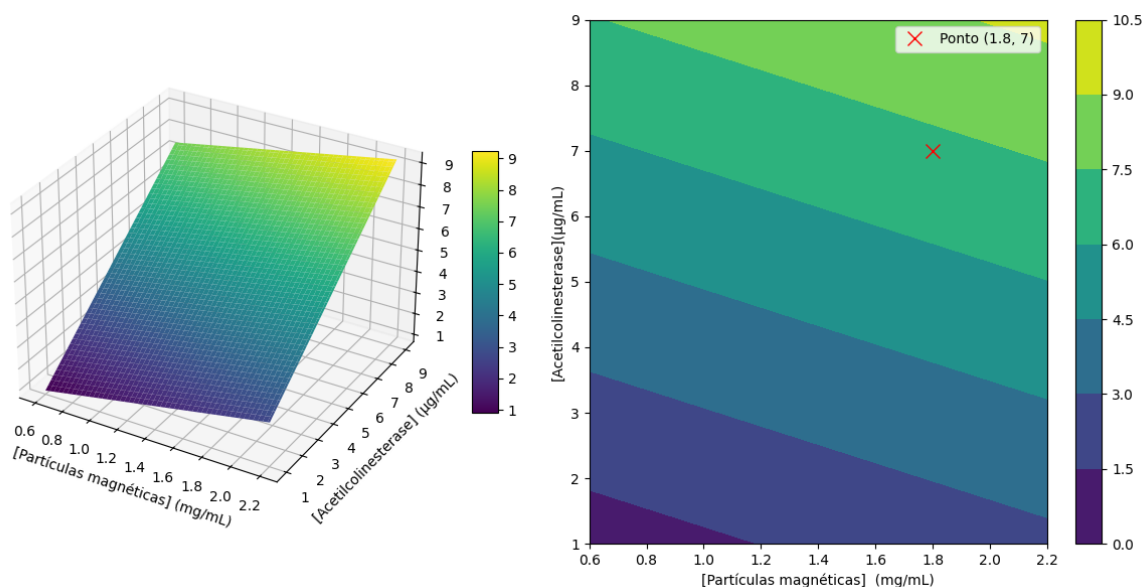


FIGURA 4.1-1 Gráficos de superfície (A) e de contorno (B) do planejamento composto central para a imobilização PM's/*EelAChE*. Realizados no software PyCharm Community Edition 2023.1.2 através Equação 8. A codificação se encontra em Anexo 1.

Devido ao planejamento experimental demandar material para ser executado optou-se por não realizar o planejamento para a imobilização da *AsAChE*-A e *AsAChE*-B. Contudo, a modo de confirmar que ocorre o mesmo comportamento para a imobilização das três acetilcolinesterases (Figura 3.7-3) 6 testes para a comparação das enzimas *AsAChE*-A, *AsAChE*-B e *EelAChE* foram realizados. Os pontos escolhidos para os testes foram os pontos axiais, que obtiveram as respostas mostradas na Tabela 4.1-3, confirmando que se pode utilizar os mesmos parâmetros para a imobilização da *AsAChE* A e *AsAChE* B.

Os valores de corrente da reação do substrato com as AChEs da formiga cortadeira apresentam um valor bem inferior que a *EelAChE*, o que pode ser

explicado devido ao processo de extração das enzimas da formiga, que causa a desnaturação de alguns sítios catalíticos no decorrer da extração. Outro fator que corrobora com esta diferença de valores é a quantidade de sítios ativos presentes nas enzimas, enquanto a *EelAChE* é um tetrâmero, a *AsAChE*-A é um dímero e a *AsAChE*-B um monômero (Santos, 2017; Salazar *et al.*, 2024).

TABELA 4.1-3: Confirmação do planejamento composto central com pontos axiais para *AsAChE*-A e *AsAChE*-B.

Experimentos	v1	v2	v3	<i>EelAChE</i>	<i>AsAChE</i> - A	<i>AsAChE</i> - B
13	-2	0	0	5,418	1,166	0,539
14	2	0	0	6,973	1,266	0,621
15	0	-2	0	2,574	0,637	0,380
16	0	2	0	9,577	1,358	0,894
17	0	0	-2	5,734	1,087	0,575
18	0	0	2	5,177	0,908	0,529

V1 = Variável 1 (Concentração de partícula magnética)

V2 = Variável 2 (Concentração de acetilcolinesterase)

V3= Variável 3 (Tempo de imobilização entre a acetilcolinesterase e a partícula magnética)

EelAChE, *AsAChE*-A e *AsAChE*-B = Média das correntes obtidas como resposta. Correntes obtidas por VOQ em 260 μ L de uma solução ATChCl 5,06 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol.L⁻¹ pH 7,4, em um volume de 50 μ L de Enzima/Partícula magnética. a = 50 mV; f = 50 Hz; s = 0,002 V. Tempo de reação= 10 min.

Neste trabalho é a primeira vez que é relatado a imobilização das enzimas acetilcolinesterase provindas da formiga cortadeira em partículas magnéticas. Além de ser a primeira vez que um planejamento de composto central é aplicado para a otimização da imobilização da acetilcolinesterase. Através deste trabalho, observa-se que os cálculos estatísticos indicam que em tempos de imobilizações maiores que 30 min, para esta metodologia, não há alteração significativa na corrente obtida.

Uma vez selecionada as condições de imobilização, sendo a concentração de partícula magnética (1,8 mg.mL⁻¹), a concentração de AChE (7 μ g.mL⁻¹) e um

tempo de imobilização de 30 min; avaliou-se a repetibilidade calculando o DPR intra-dia e inter-dia (n=4). Os valores obtidos estão na Tabela 4.1-4.

TABELA 4.1-4: Repetibilidade intra-dia e inter-dia para as três enzimas.

Biossensores	Repetibilidade	DPR / %
<i>Eel</i> AChE	Intra-dia	5,45
	Inter-dia	5,78
<i>As</i> AChE A	Intra-dia	4,04
	Inter-dia	12,72
<i>As</i> AChE B	Intra-dia	11,43
	Inter-dia	10,27

Intra-dia = Realizadas 4 imobilizações diferentes no mesmo dia.

Inter-dia = Realizadas 4 imobilizações diferentes em dias diferentes.

DPR / % = Porcentagem referente ao desvio padrão das 4 imobilizações realizadas em quadruplicata.

Para os biossensores de *As*AChE-A e *As*AChE-B os valores de DPR se apresentaram altos devido aos valores da corrente, uma vez que quando a média de um conjunto de dados é próxima a zero, pequenas variações nos dados podem levar a um DPR elevado, indicando alta variabilidade relativa. Entretanto, mesmo com valores de DPR acima de 10%, os biossensores eles confirmaram um desempenho para a imobilização da enzima a fim de determinar potenciais agentes inibidores enzimáticos (BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003).

4.2 Avaliação da resposta eletroquímica frente a acetiltiocolina:

4.2.1 Escolha do substrato:

A acetiltiocolina pode ser encontrada em duas formas, Iodeto de acetiltiocolina ou Cloreto de acetiltiocolina, sendo a diferença entre os dois substratos o contra íon (Figura 4.2-1). Mesmo o contra íon não participando da reação de oxidação (Figura 4.2-2), o íon iodeto possui oxidação próxima ao

potencial da dimerização do tiol, podendo ser um empecilho na análise eletroquímica (Bucur; Bucur; Radu, 2013).



FIGURA 4.2-1: Fórmulas estruturais do Iodeto de acetiltiocolina (A) e Cloreto de acetiltiocolina (B).

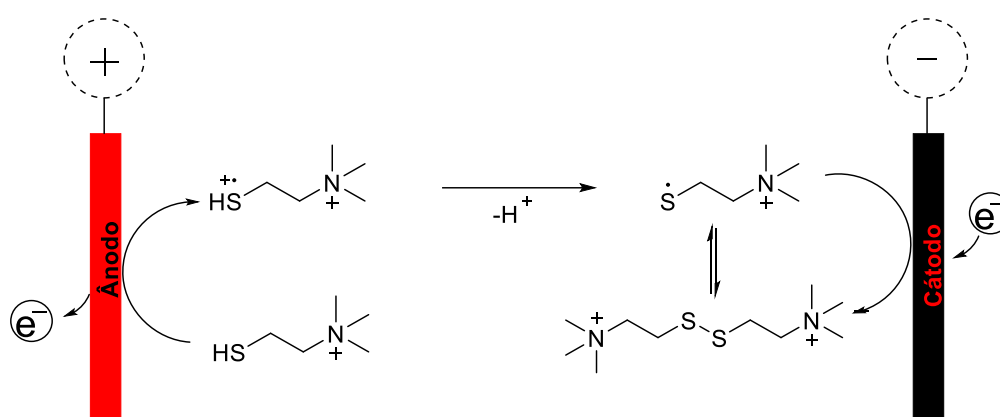


FIGURA 4.2-2: Esquema da reação eletroquímica de oxidação da tiocolina ocasionada pela corrente aplicada formando o dímero ditio-bis-colina (Souza *et al.*, 2022).

Assim, foram realizados alguns estudos para identificar qual o melhor substrato para elaboração dos próximos experimentos. Primeiramente, analisou-se uma molécula que possui um grupo tiol (1-propanethiol) e que não apresenta nenhum contra-íon comparada com o I^- gerado da dissolução aquosa do KI. Os testes foram realizados em eletrodos serigrafados de carbono aplicando a técnica de voltametria cíclica.

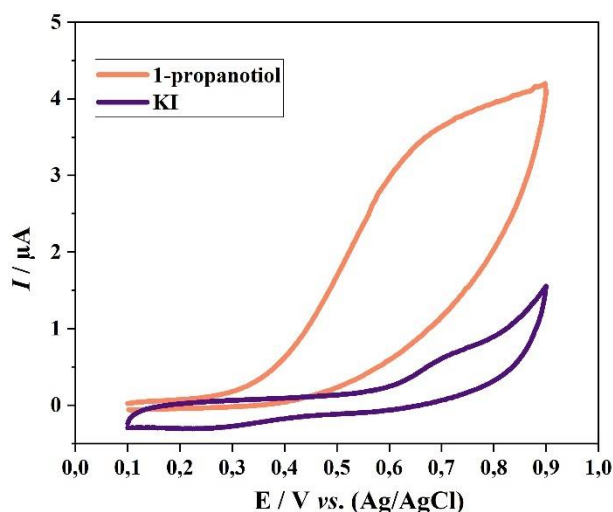


FIGURA 4.2-3: Voltamograma cíclico dos compostos 1-propanethiol e iodeto de potássio. Correntes obtidas por VC em $[KI] = 5,5 \mu\text{mol}$ e $[C_3H_8S] = 13 \mu\text{mol}$, Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} . Intervalo de potencial: $+0,1$ a $+0,9 \text{ V}$.

Nota-se que ambos os compostos demonstraram correntes de oxidação próximas a mesma região de potencial quando aplicada a voltametria cíclica. Com isso, para o prosseguimento do estudo referente aos substratos analisou-se o I_2 e o substrato ATChI (iodeto de acetiltiocolina) quando clivado pela enzima acetilcolinesterase, conforme apresentado na Figura 4.2-4.

Com base nas análises realizadas com ATChI percebe-se que o sinal referente ao iodo pode atrapalhar na identificação da corrente do tiol, levando a falsos positivos ou negativos nos estudos referentes a inibição da acetilcolinesterase (Bucur; Bucur; Radu, 2013).

Dessa forma, realizou-se um estudo com o cloreto de acetiltiocolina para identificar a viabilidade do uso deste substrato para análises de inibição desta enzima (Figura 4.2-5).

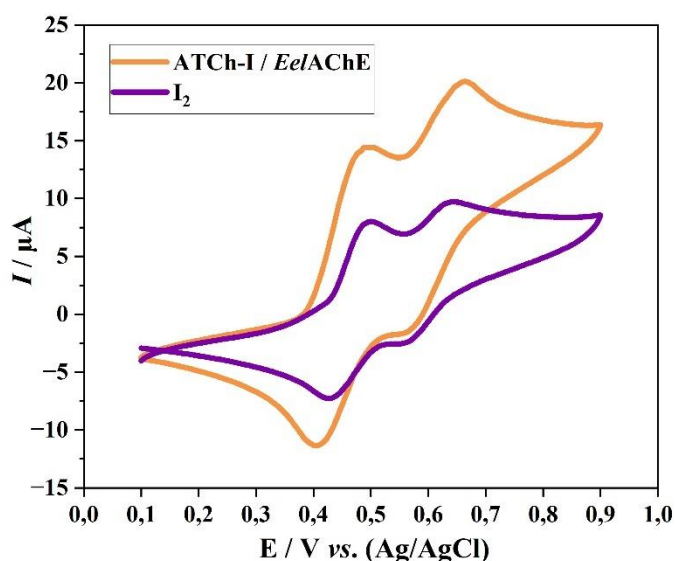


FIGURA 4.2-4: Voltamograma cíclico dos compostos ATCh-I e I_2 . Correntes obtidas por VC em $[ATCh-I] = 5,06 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $[I_2] = 7 \text{ μmol}$, $f = 50 \text{ Hz}$. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} . Intervalo de potencial: $+0,1$ a $+0,9 \text{ V}$.

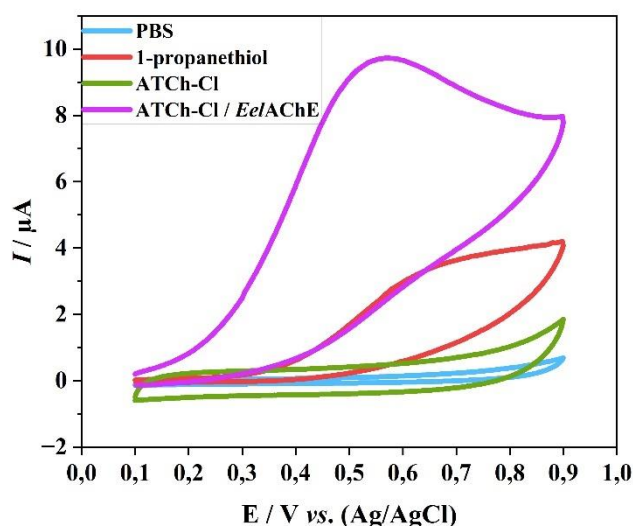


FIGURA 4.2-5: Voltamograma cíclico dos compostos PBS, C_3H_8S , ATChCl e ATChCl clivado pela acetilcolinesterase. Correntes obtidas por VC em $[ATCh-Cl] = 5,06 \text{ mmol.L}^{-1}$, $[C_3H_8S] = 13 \text{ μmol.L}^{-1}$ e $[PBS] = 10 \text{ mmol.L}^{-1}$, $f = 50 \text{ Hz}$. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} . Intervalo de potencial: $+0,1$ a $+0,9 \text{ V}$.

Referente ao ATChCl (cloreto de acetiltiocolina), observa-se que quando o substrato não entra em contato com a acetilcolinesterase não ocorre nenhum

processo eletroquímico, comprovando que a reação só ocorre a partir da clivagem do substrato ocasionada pela enzima. Observa-se também que o contra-íon de cloro não influencia na corrente, uma vez que não há presença de qualquer processo eletroquímico referente ao mesmo. Ademais, quando há a formação do dímero ditio-bis-colina apenas uma corrente de oxidação é identificada, sendo similar ao 1-propanotiol, constatando que a corrente anódica é relativa ao grupo tiol do composto. Por fim, salienta-se que o tampão PBS não causa alteração na corrente registrada, sendo possível utilizá-lo nos experimentos subsequentes.

Com isso, decidiu-se utilizar o ATChCl como substrato para os demais estudos, permitindo resultados mais confiáveis e possibilitando o prosseguimento do trabalho de forma mais efetiva.

4.2.2 Avaliação da resposta eletroquímica para EelAChE, AsAChE-A e AsAChE-B utilizando planejamento composto central:

Para avaliar o comportamento do substrato frente as três acetilcolinesterases, foi utilizado um planejamento fatorial composto central, em que as regiões axiais variaram entre -2 a 2, devido ao planejamento apresentar três variáveis. Os pontos axiais não foram obtidos em -1,68 e 1,68 para obter uma maior precisão nos experimentos, em razão de que neste planejamento utiliza-se pequenas massas de substrato e valores com números fracionários encontram-se na imprecisão da balança. É importante reescrever que Tarapara (2021) afirma que não é necessário que o ponto axial esteja com valores exatos, sendo que para três variáveis pode-se utilizar o valor equivalente a 1,5 (Tarapara; Divecha, 2023). Entretanto, não há valores inteiros para pontos axiais em 1,5, sendo necessário extrapolar para valores de -2 e 2, como realizado em (Ali; Noor, 2016).

Os valores de resposta são referentes a corrente gerada pela reação de oxidação da dimerização do tiol da acetiltiocolina quando a ligação é rompida pela enzima acetilcolinesterase (Figura 4.2-2, p. 43), além disso, as amostras foram realizadas em quadruplicata.

Com este modelo de planejamento foi possível identificar os efeitos mais importantes referente a reação do substrato com a enzima acetilcolineterase, assim como se há ou não interação entre os efeitos. Os resultados obtidos constam nas Tabelas 4.2-1, 4.2-2 e 4.2-3. Sendo variável 1 (v1) a concentração de acetiltiocolina (mmol), variável 2 (v2) tempo de reação substrato/AChE (min) e variável 3 (v3) a alíquota da enzima imobilizada em partícula magnética (μL). Assim, foram obtidas as médias de respostas para as três enzimas, ressaltando que os planejamentos foram realizados separadamente.

TABELA 4.2-1: Planejamento composto central para avaliação da resposta eletroquímica frente a *EelAChE* codificado com a média das respostas obtidas em quadruplicata.

Experimentos	v1	v2	v3	$\bar{x}$ (<i>EelAChE</i>)
1	-1	-1	-1	7,011
2	1	-1	-1	8,411
3	-1	1	-1	11,643
4	1	1	-1	15,573
5	-1	-1	1	11,044
6	1	-1	1	14,470
7	-1	1	1	16,476
8	1	1	1	20,001
9	0	0	0	14,259
10	0	0	0	13,445
11	0	0	0	12,427
12	0	0	0	12,274
13	-2	0	0	9,067
14	2	0	0	13,622
15	0	-2	0	5,950
16	0	2	0	18,117
17	0	0	-2	8,159
18	0	0	2	15,390

V1 = Variável 1 (Concentração de ATChCl)

V2 = Variável 2 (Tempo de reação ATChCl/AChE)

V3= Variável 3 (Alíquota AChE/PM)

$\bar{x}$ (I / μ A) = Média das correntes obtidas como resposta. Correntes obtidas por VOQ em 260 μ L de uma solução ATChCl em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7.4, [AChE] = 7 μ g.mL⁻¹, [PM] = 1,4 mg.mL⁻¹, tempo de imobilização de 30 min. a = 50 mV; f = 50 Hz; s = 0,002 V. Tempo de reação = 10 min.

TABELA 4.2-2: Planejamento composto central para avaliação da resposta eletroquímica frente a *AsAChE-A* codificado com a média das respostas obtidas em quadruplicata.

Experimentos	v1	v2	v3	$\bar{x}$ (<i>AsAChE-A</i>)
1	-1	-1	-1	0,47
2	1	-1	-1	1,28
3	-1	1	-1	0,42
4	1	1	-1	0,83
5	-1	-1	1	0,70
6	1	-1	1	1,46
7	-1	1	1	0,49
8	1	1	1	1,07
9	0	0	0	0,98
10	0	0	0	0,95
11	0	0	0	0,99
12	0	0	0	1,05
13	-2	0	0	0,74
14	2	0	0	2,96
15	0	-2	0	1,14
16	0	2	0	0,60
17	0	0	-2	0,82
18	0	0	2	1,12

V1 = Variável 1 (Concentração de ATChCl)

V2 = Variável 2 (Tempo de reação ATChCl/AChE)

V3= Variável 3 (Alíquota AChE/PM)

$\bar{x}$ (I / μ A) = Média das correntes obtidas como resposta. Correntes obtidas por VOQ em 260 μ L de uma solução ATChCl em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7.4, [AChE] = 7 μ g.mL⁻¹, [PM] = 1,4 mg.mL⁻¹, tempo de imobilização de 30 min. a = 50 mV; f = 50 Hz; s = 0,002 V. Tempo de reação = 10 min.

TABELA 4.2-3: Planejamento composto central para avaliação da resposta eletroquímica frente a *AsAChE*-B codificado com a média das respostas obtidas em quadruplicata.

Experimentos	v1	v2	v3	$\bar{x}$ (<i>AsAChE</i> -B)
1	-1	-1	-1	0,56
2	1	-1	-1	1,35
3	-1	1	-1	0,53
4	1	1	-1	1,15
5	-1	-1	1	0,60
6	1	-1	1	1,51
7	-1	1	1	0,58
8	1	1	1	1,02
9	0	0	0	0,78
10	0	0	0	0,79
11	0	0	0	0,92
12	0	0	0	1,05
13	-2	0	0	0,58
14	2	0	0	3,15
15	0	-2	0	1,39
16	0	2	0	0,67
17	0	0	-2	1,08
18	0	0	2	1,23

V1 = Variável 1 (Concentração de ATChCl)

V2 = Variável 2 (Tempo de reação ATChCl/AChE)

V3= Variável 3 (Alíquota AChE/PM)

$\bar{x}$ (I / μ A) = Média das correntes obtidas como resposta. Correntes obtidas por VOQ em 260 μ L de uma solução ATChCl em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7.4, [AChE] = 7 μ g.mL⁻¹, [PM] = 1,4 mg.mL⁻¹, tempo de imobilização de 30 min. a = 50 mV; f = 50 Hz; s = 0,002 V. Tempo de reação = 10 min.

A partir de uma quadruplicata do ponto central (experimento 9-12), foi calculada uma soma quadrática do erro puro (SQEP) utilizando a Equação 7 (p. 38 onde x_i é o valor de resposta de cada réplica, $\bar{x}$ a média entre elas e n o número de réplicas do ponto central), obtendo um valor de 1,3560 para *EelAChE*, 0,0048

para *AsAChE*-A e 0,0476 para *AsAChE*-B, com grau de liberdade igual a 3 para as três enzimas (Tabela 4.2-4). Analizados no software PyCharm Community.

A avaliação da significância estatística do modelo foi realizada e o valor de MS_{reg} deve ser maior que MS_{res} , pois com essa diferença entre os valores de variâncias podemos interpretar que MS_{reg} não se confunde com MS_{res} , como consta em Pereira e Pereira-Filho (2018). Além disso, a razão entre os valores de $F_{calculado}$ preferencialmente deve ser algumas vezes maior que o $F_{tabelado}$, cerca de 10 vezes maior para que o modelo seja apresentado como confiável, podendo ser utilizado para previsões. A média quadrática de falta de ajuste deve ser maior que a média quadrática do erro puro, sendo a razão entre o $F_{calculado(falta\ de\ ajuste)}$ e $F_{tabelado(falta\ de\ ajuste)}$ menor do que 1.

Para *EelAChE* nesse modelo o $F_{calculado}$ não apresentou uma razão de 10 vezes maior que o $F_{tabelado}$, entretanto, a média quadrática de falta de ajuste foi maior que a média quadrática do erro puro, sendo a razão entre o $F_{calculado}$ e $F_{tabelado}$ da falta de ajuste menor que 1, indicando que o modelo não apresenta falta de ajuste podendo utilizar o MQ dos resíduos, sendo $MS_{res} = 0,57477$ e $t = 2,3646$.

Para as *AsAChE*-A e *AsAChE*-B, em ambos os modelos os $F_{calculados}$ não apresentaram uma razão de 10 vezes maior que os $F_{tabelados}$. As médias quadráticas de falta de ajuste foram maiores que as médias quadráticas dos erros puros, sendo as razões dos $F_{calculados}$ e $F_{tabelados}$ maiores que 1, indicando que os modelos apresentaram falta de ajuste. Assim, utilizou-se o MQ da Falta de Ajuste 0,14862, com t igual a 2,776 para *AsAChE*-A e MQ da Falta de Ajuste 0,098839, com t igual a 2,3646 para *AsAChE*-B.

TABELA 4.2-4: Análise estatística do ajuste e validação do modelo para *EelAChE*, *AsAChE-A* e *AsAChE-B*.

	<i>EelAChE</i>	<i>AsAChE-A</i>	<i>AsAChE-B</i>
MS_(reg)	243,52	4,73	5,68
MS_(res)	10,01	0,70	0,79
F_{cal.}	21,62	6,01	6,39
F_{tab.}	3,69	3,29	2,49
F_{cal.}/F_{tab.}	5,86	1,83	2,56
MS_{falta de ajuste}	7,41	0,69	0,74
MSEP	2,60	0,00	0,05
F_{cal.fda}	1,71	86,84	9,37
F_{tab.fda}	6,59	5,05	3,20
F_{cal.fda}/F_{tab.fda}	0,26	17,20	2,93
R²	0,96	0,87	0,88
R²max	0,99	1,00	0,99

MS_(reg) = Média quadrática de regressão

MS_(res) = Média quadrática dos resíduos

F_{cal.} = F_{calculado}

F_{tab.} = F_{tabelado}

F_{cal.}/F_{tab.} = Razão entre F_{calculado} e F_{tabelado}

MS_{falta de ajuste} = Média quadrática de falta de ajuste

MSEP = Média quadrática do erro puro

F_{cal.fda.} = F_{calculado} da falta de ajuste.

F_{tab.fda.} = F_{tabelado} da falta de ajuste.

F_{cal.fda}/F_{tab.fda.} = Razão entre a F_{calculado} da falta de ajuste e F_{tabelado} da falta de ajuste

A significância estatística dos coeficientes foi examinada, considerando significativos em um nível de confiança de 95%. Com isso, foram obtidas as equações de regressão (Equação 10; Equação 11; Equação 12), em que y é a resposta, v1 a concentração de enzima, v2 o tempo de reação e v3 a alíquota de enzima/partícula magnética:

$$y(EelAChE) = 13,4 + 1,34v1 + 2,94v2 + 2,11v3 \quad \text{Equação 10}$$

$$y(AsAChE-A) = 0,90 + 0,44v1 \quad \text{Equação 11}$$

$$y(AsAChE-B) = 0,80 + 0,50v1 + 0,24v1v1 \quad \text{Equação 12}$$

Além disso, a influência das variáveis avaliadas na resposta final foi adquirida, através da Equação 9 (p. 39). Sendo β_i o coeficiente de regressão associado a um termo X_i . A influência relativa de cada termo pode ser estimada pela soma dos quadrados dos efeitos normalizada.

Para *EelAChE* concentração de substrato obtém uma influência de 11,7%, enquanto o tempo possui a maior influência com 56,5% e a alíquota possui uma influência de 29,2% (Tabela 4.2-5). Em relação a interação das variáveis nenhuma possuiu influência significativa.

Para *AsAChE-A* mesmo com percentuais de influências acima de 1, os efeitos 2 (7,06%), 3 (2,58%), 12 (2%), 11 (14,1%) e 22 (1,1%) (Tabela 4.2-5) não apresentaram significância, devido ao grande intervalo de confiança que o modelo apresentou. A concentração de substrato obteve uma influência de 72,8% sendo o único efeito significativo (Tabela 4.2-5).

Para *AsAChE-B* os efeitos significativos foram v_1 (77,6%) e v_1^2 (17,6%). O efeito v_2 (1,72%) apresentou um percentual maior que 1 (Tabela 4.2-5), contudo não é considerado um efeito significativo devido ao intervalo de confiança.

Os modelos para *AsAChE-A* e *AsAChE-B* não apresentaram uma boa confiabilidade, devido ao limite de confiança que impossibilitou uma boa avaliação de todas as variáveis, mas a partir das porcentagens de influência encontradas pode-se identificar um seguimento de quais variáveis são mais importantes para dar ênfase em outros estudos.

TABELA 4.2-5: Porcentagem de influência das variáveis e interações a partir do planejamento composto central para avaliação da resposta eletroquímica frente as enzimas *EelAChE*, *AsAChE-A* e *AsAChE-B*.

Variáveis e interações	Influência dos efeitos (%) <i>EelAChE</i>	Influência dos efeitos (%) <i>AsAChE-A</i>	Influência dos efeitos (%) <i>AsAChE-B</i>
1	11,8	86,1	95,0
2	57,4	8,4	2,1
3	29,6	3,1	0,3
12	0,71	2,4	2,3
13	0,27	0,1	0,2
23	0,07	0,1	0,1

Porcentagens de influência dos efeitos calculadas através da Equação 9

A equação de Michaelis-Menten (Equação 13), descreve como a velocidade de uma reação catalisada por enzimas depende da concentração do substrato. Em que, $V_{\max}$ é a velocidade máxima da reação, v velocidade da reação, $[S]$ concentração de substrato e K_m constante de Michaelis, sendo K_m uma medida relacionada a afinidade da enzima pelo substrato, quanto menor essa medida maior é a afinidade.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Equação 13

A partir do planejamento para a *EelAChE*, percebe-se que a variável mais influente é o tempo de reação entre a enzima e o substrato, isso pode estar ligado a saturação da enzima. Quando a cinética é de primeira ordem, a velocidade aumenta linearmente com a concentração do substrato, sendo o substrato uma variável influente para a cinética. Entretanto, quando a cinética é de ordem zero, temos que não há dependência da concentração do substrato, pois a enzima está saturada. Nisso, a variável do tempo em que ocorre a reação se torna mais

influyente, no caso da *EelAChE*, as concentrações de substratos utilizadas possivelmente tendem mais facilmente para a saturação enzimática (Kram; Schäfer; Rabenstein, 2018).

Para ambas as enzimas *AsAChE-A* e *AsAChE-B*, a variável referente a concentração de substrato é a mais influente, além da interação entre a concentração da acetiltiocolina com a concentração Enzima/PM, mostrando uma dependência do efeito da acetiltiocolina. Com isso, possivelmente a faixa de concentração de substrato utilizada não tende facilmente a uma saturação da enzima, sendo então reações de primeira-ordem (Kram; Schäfer; Rabenstein, 2018).

Comparando os três modelos adquiridos pelo planejamento composto central para as três enzimas, é perceptível que o comportamento entre elas é distinto. O planejamento para *EelAChE* apresentou a variável tempo como mais influente, seguida das variáveis concentração Enzima/PM e concentração de substrato. Vale ressaltar que a concentração Enzima/PM é relacionada diretamente a concentração de enzima, pois quanto maior a quantidade de partículas imobilizadas no meio, maior é a concentração de enzimas.

Em um estudo realizado por Santos, 2017, sobre os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para as enzimas *AsAChE-A* e *AsAChE-B* com o substrato acetiltiocolina, determinou-se que a enzima *AsAChE-A* apresentou uma afinidade superior pelo substrato comparado com a *AsAChE-B* (Santos, 2017). No presente trabalho, a porcentagem de influência do substrato para as respostas eletroquímicas das duas enzimas foi de respectivamente (72,79%) e (77,55%), mostrando que a atividade enzimática da *AsAChE-B* é diretamente influenciada pela concentração de substrato. Isso expõe que a *AsAChE-A* satura mais facilmente que a *AsAChE-B* devido a sua afinidade pelo substrato, diminuindo a porcentagem de influência da variável de concentração da acetiltiocolina e aumentando a porcentagem de influência da variável tempo, quando comparado com a *AsAChE-B*.

Enfim, construiu-se gráficos de contorno (Figura 4.2-6, B) e de superfície (Figura 4.2-6, A) para as variáveis significativas da *EelAChE*, para as demais enzimas não foi possível, devido ao intervalo de confiança.

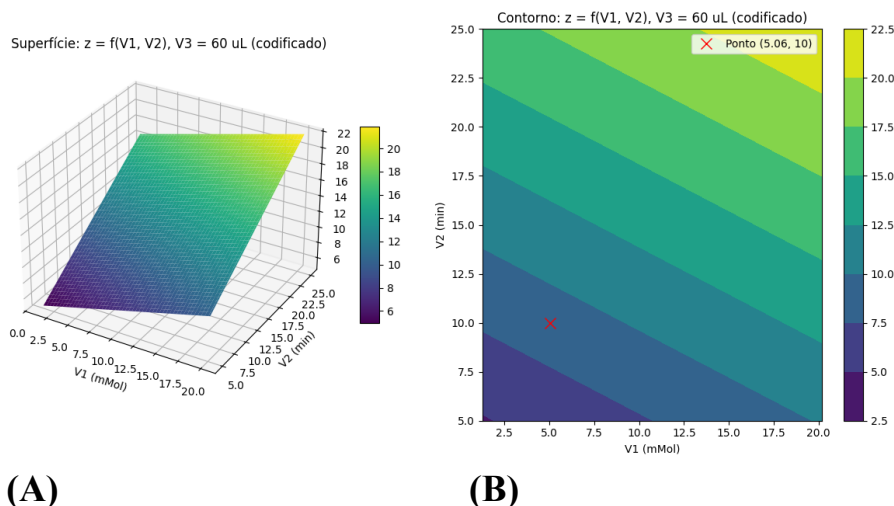


FIGURA 4.2-6: Gráficos de superfície (A) e de contorno (B) do planejamento composto central para a avaliação da resposta eletroquímica frente a *EelAChE*. Realizados no software PyCharm Community Edition 2023.1.2 através Equação 10. A codificação se encontra no Anexo 1.

Observou-se que o maior valor de corrente que se pode obter está nas condições de $20,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ de acetiltiocolina, 25 min e 100 µL de alíquota de Enzima/PM, com uma corrente de $\sim 24,5 \text{ µA}$. Porém optou-se por trabalhar com a corrente de $\sim 10,2 \text{ µA}$, pois para a maior corrente necessita-se utilizar altas concentrações de reagentes e um tempo de reação maior. A fim de diminuir os custos e otimizar o tempo foi escolhida a concentração de $5,06 \text{ mmol.L}^{-1}$ de acetiltiocolina, 10 min de reação e uma alíquota de 60 µL .

Neste trabalho é a primeira vez que o estudo da acetiltiocolina referente a enzima acetilcolinesterase é realizado via planejamento fatorial composto central, avaliando a melhor condição que se pode obter para a realização de trabalhos em biossensores.

4.3 Avaliação da resposta eletroquímica frente a variação de pH da acetiltiocolina:

Após a determinação dos parâmetros escolhidos no planejamento composto central, seis soluções de ATChCl de $5,06 \text{ mmol.L}^{-1}$ foram preparadas em diferentes faixas de pH, sendo os valores: 6,0; 6,5; 7,0; 7,4; 8,0 e 8,5. Este estudo avalia os resultados catalíticos do biossensores, sendo apresentados na Figura 4.3-1 e Tabela 4.3-1.

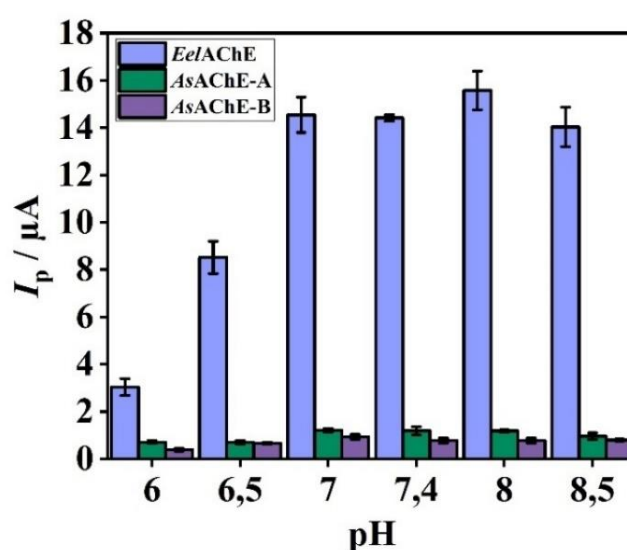


FIGURA 4.3-1: Efeito da resposta eletroquímica de oxidação da tiocolina referente a mudança de pH da solução de ATChCl. As correntes foram obtidas por VOQ em ATChCl $5,06 \text{ mmol.L}^{-1}$, PBS 10 mmol.L^{-1} . $a = 50 \text{ mV}$; $f = 50 \text{ Hz}$; $s = 0,002 \text{ V}$. Tempo de reação = 10 min. $[\text{AChE}] = 7 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

TABELA 4.3-1: Efeito da reposta eletroquímica de oxidação da tiocolina referente a mudança de pH da solução de ATChCl Respostas eletroquímicas em $\mu\text{A}.$

pH	<i>EelAChE</i>	<i>AsAChE-A</i>	<i>AsAChE-B</i>
6	$3,038 \pm 0,358$	$0,709 \pm 0,055$	$0,385 \pm 0,055$
6,5	$8,517 \pm 0,684$	$0,707 \pm 0,072$	$0,662 \pm 0,039$
7	$14,540 \pm 0,743$	$1,212 \pm 0,077$	$0,928 \pm 0,104$
7,4	$14,415 \pm 0,139$	$1,190 \pm 0,165$	$0,775 \pm 0,146$
8	$15,575 \pm 0,819$	$1,182 \pm 0,045$	$0,774 \pm 0,099$
8,5	$14,032 \pm 0,837$	$0,959 \pm 0,142$	$0,796 \pm 0,0422$

Conforme os dados apresentados o valor de I_p para *EelAChE* exibiu uma tendência crescente das respostas eletroquímicas com o aumento do pH, havendo um declínio a partir do pH 8. Para as *AsAChE-A* e *AsAChE-B* os valores de corrente aumentam da faixa de pH 6,0 até pH 7,0, ocorrendo um declínio dos valores a partir desta faixa de pH 7,0. Para *EelAChE*, na faixa de pH 8,0 o $I_p = 15,57 \pm 0,82 \text{ A}$, enquanto em pH 8.5 o $I_p = 14,03 \pm 0,84 \text{ A}$, ou seja, ocorreu um decréscimo na resposta para o Bio-*EelAChE*, uma diferença de $I_p = 1,54 \text{ A}$. Para as *AsAChE-A* e *AsAChE-B* em pH 7 o I_p é igual a $1,21 \pm 0,08$ e $0,93 \pm 0,10$ respectivamente. Para pH 7,4 o I_p é igual a $1,19 \pm 0,16$ e $0,77 \pm 0,10$, havendo um decréscimo em média de corrente nos valores de $I_p = 0,02$ para *AsAChE-A* e $I_p = 0,16$ para *AsACHE-B*. Mesmo decréscimo sendo mínimo para a *AsAChE-A* entre os pHs 7 e 7,4, o desvio padrão se mostrou menor, para *AsAChE-A* 0,16 e para *AsAChE-B* 0,10 tendo um valor mais confiável em relação as respostas.

As condições de pH desempenham um papel importante para a integridade da estrutura tridimensional funcional das proteínas, que está diretamente ligada com a atividade funcional. O pH em condições não favoráveis pode causar a desnaturação irreversível da enzima através de quebras de ligações covalentes, formação de novas ligações, modificação de cadeia lateral, etc (Masson; Lushchekina, 2022).

A maior corrente corresponde com a maior integridade da estrutura enzimática, pois a clivagem da acetiltiocolina ocorre de forma mais efetiva no sítio catalítico. Desta forma, para *EelAChE* a melhor condição foi em pH 8 e para *AsAChE-A* e *AsAChE-B* em pH 7. Como neste trabalho o foco é a acetilcolinesterase da formiga cortadeira o pH escolhido foi o pH 7 para os três biossensores.

Em outros estudos de pH com a *EelAChE* a faixa de pH que possuiu a melhor corrente foi entre o pH 7 e 8 (Araújo *et al.*, 2025; Guler; Turkoglu; Kivrak, 2016; Ivanov *et al.*, 2022; Nunes *et al.*, 2022; Tao *et al.*, 2022; Thet Tun *et al.*, 2023; Wang, Bo *et al.*, 2020; Wen *et al.*, 2023). Entretanto, para as *AsAChE-A* e *AsAChE-B* há uma diferença entre dois trabalhos, no trabalho publicado por Santos, 2019 (Dos Santos *et al.*, 2019) o pH ótimo foi entre 9 e 9,5, enquanto, no estudo realizado por Araújo 2024 (Araújo, 2024), o pH ótimo coincidiu com este estudo, estando em pH 7. Isso pode ter ocorrido devido a metodologia utilizada, que se diferencia entre colorimétrico e eletroquímico, sendo o eletroquímico semelhante ao trabalho apresentado.

4.4 Estudo de inibição das enzimas pelo Malation:

Para este estudo, mantiveram-se as mesmas condições de imobilização do estudo de influência do pH, porém a concentração de acetiltiocolina utilizada foi de 10,1 mmol.L⁻¹ em pH 7, sendo o tempo de reação de 10 min, houve essa alteração nas condições do substrato devido a sua reação com as AChEs da formiga cortadeira apresentar valores de correntes anódicas menores, devido a extração.

Ao longo da extração a enzima é submetida a diversos fatores, como mudanças de temperatura, precipitações, mudanças de pH e agitações extremas (Masson; Lushchekina, 2022). Esses fatores podem causar a desnaturação da enzima, diminuindo sua atividade e influenciando diretamente na corrente. Estas desnaturações não ocorrem de forma uniforme, não podendo ser previstas quantitativamente. Em vista disso, a quatruplicata do branco (sem inibidor) deve

ser realizada a cada teste, para evitar erros ocasionado pela desnaturação. Portanto, primeiramente foi avaliada a influência do tempo de incubação do malation nos biossensores (Figura 4.4-1). Os testes com malation foram realizados apenas para as enzimas da formiga cortadeira.

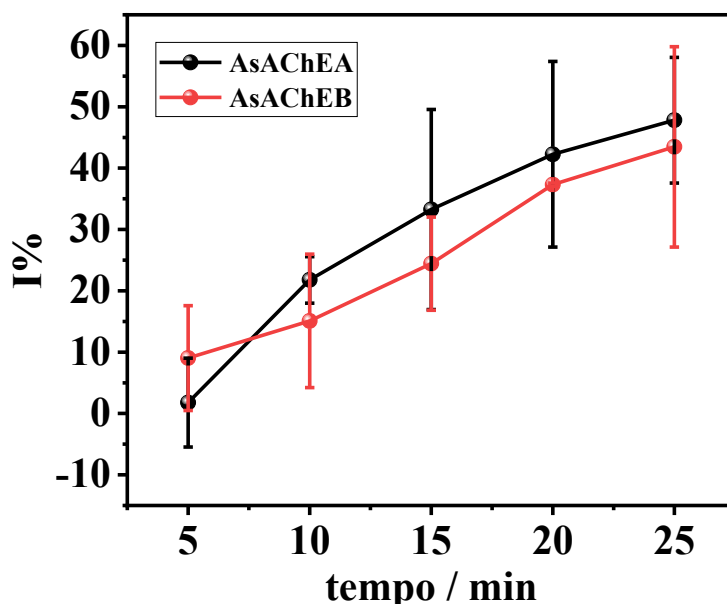


FIGURA 4.4-1: Efeito nas correntes de atividade enzimática em relação ao tempo de ação do malation nos biossensores de *AsAChE-A* e *AsAChE-B*. [Malation] = $21,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, [*AsAChE*] = $7 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Corrente obtidas por VOQ. $a = 50 \text{ mV}$; $f = 50 \text{ Hz}$; $s = 0,002 \text{ V}$. [ATChCl] = $10,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ em PBS 10 mmol.L^{-1} , pH 7. Tempo de reação de 10 min.

Como apresentado na Figura 4.4-1, ambas as enzimas apresentaram alterações em suas atividades conforme o tempo de ação do malation. Este comportamento é consequência da ligação do malation ao sítio catalítico das AChEs (Figura 1.6-2), impedindo a clivagem da acetilticolina (Figura 1.6-1) (Assis *et al.*, 2018; Wang, Bo *et al.*, 2020), desta forma, diminuindo a formação do produto tiocolina, o que influencia diretamente nas correntes registradas pela dimerização da molécula. Assim, ao comparar a corrente da enzima bloqueada com a corrente da enzima com o sítio catalítico ativo (Branco), pode-se obter a porcentagem de inibição da molécula.

As duas enzimas apresentaram perfis distintos de inibição, a *AsChE-A* exibe uma inibição de 1,78% em um tempo de 5 min, progredindo sua inibição até 47,80% em 25 min, enquanto a inibição da *AsAChE-B* em 5 min é de 9,04% estendendo até 43,46% de inibição em 25 min. Mesmo a *AsAChE-B* apresentando maior inibição em 5 min, ao decorrer do tempo a inibição da *AsAChE-A* alcança taxas de inibição maiores. Com base nestes resultados, é perceptivo que há uma interação diferente do malation com os sítios catalíticos das duas enzimas, expondo o dever do estudo individual entre elas.

A maioria dos insetos expressa duas acetilcolinesterases, elas são denominadas como AChE1 e AChE2 (Knorr *et al.*, 2022; Vidal-Albalat *et al.*, 2023). Estudos apontam que a AChE1 está envolvida na neurotransmissão colinérgica, sendo o alvo de inseticidas anticolinesterásicos e apresentando resistência a inseticidas (Teng *et al.*, 2022). Enquanto a AChE2 desempenha o papel de crescimento de insetos, reprodução e desenvolvimento embrionário (Lu *et al.*, 2012). Assim sendo, o controle das formigas cortadeiras podem ocorrer através das duas enzimas, inibindo a AChE1 e afetando na neurotransmissão colinérgica ou AChE2 afetando a reprodutividade da espécie.

Bilal e seus colaboradores (Bilal *et al.*, 2022), desenvolveram biossensores utilizando eletrodos de grafite de lápis compondo $\text{NiCr}_2\text{O}_4/\text{gC}_3\text{N}_4$ para a detecção de malation. O estudo foi realizado com AChEs de três insetos, *Apis mellifera* (abelha), *Tribolium castaneum* (besouro-da-farinha) e *Zootermopsis navadensis* (cupim-de-madeira-úmida). Como resultado obtiveram que as AChEs do besouro navadenis e do cupim-de-madeira-úmida apresentaram maior sensibilidade que a enzima da abelha.

Em estudos realizados para o controle do cupim subterrâneo (*Reticulitermes chinensis*), através do método de Ellman pesquisadores expuseram a acetilcolinesterase do inseto ao malation obtendo um Ic_{50} de $1,10 \times 10^{-3}$ M, além do malation outros inseticidas foram testados, entretanto o malation possuiu o menor Ic_{50} sendo o mais eficiente (Tu; Yang, 2021).

Em 2024, Araújo (Araújo, 2024) apresentou estudos com a *AsAChE-A* e *AsAChE-B* frente ao malation através de biossensores com a superfície modificada, adquirindo inibições de 72% para *AsAChE-A* e 70% para *AsAChE-B* em concordância com o trabalho aqui apresentado, comprovando que a *AsAChE-A* exibe mais sensibilidade ao malation.

O malation apresenta uma inibição excelente para o bloqueio da acetilcolinesterase de insetos. Entretanto, sua eficácia não se limita a pragas agrícolas, mas também atinge espécies não-alvo, como espécies aquáticas (enguia elétrica) (Alex. A; Mukherjee, 2023) e mamíferos (ratos albinos) (Elmorsy *et al.*, 2022). Assim como outros organofosforados, o malation não apresenta especificidade e causa acúmulos em animais por duas rotas, sendo a primeira a absorção direta de pesticidas em sistemas aquáticos, causado por escoamento superficial, e a absorção por alimentos contaminados (Karthick Rajan *et al.*, 2024). Também foi definido o tempo de 25 min para reação entre o malation e a acetilcolinesterase, a fim de se obter a maior inibição possível dentro dos parâmetros analisados. Assim, é indiscutível a importância de novos compostos com ação inseticida que sejam seletivos e que não causem acúmulos no meio ambiente.

Na Figura 4.4-2 é possível notar que a *AsAChE-A* possui uma maior sensibilidade atingindo uma inibição de 77% com 39 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de malation, enquanto a *AsAChE-B* na mesma concentração inibiu 57%. Além disso, em 3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do inseticida da *AsAChE-A* se encontrou em 19%, enquanto para *AsAChE-B* esteve em 29%. Observa-se que em concentrações menores a *AsAChE-B* possuiu maior inibição, porém conforme aumenta-se a concentração do inibidor, os valores de porcentagem de inibição estão mais próximos, indicando que a reação tende a alcançar o valor máximo de inibição. Referente a *AsAChE-A*, o comportamento diante do malation difere da *AsAChE-B*, onde há uma variação maior de inibição conforme há um aumento na concentração do inibidor.

Em relação a resposta linear obtida entre a taxa de inibição e a concentração de malation, os valores de R (Pearson) calculados foram de 0,996 para o biossensor *AsAChE-A* e 0,935 para o biossensor *AsAChE-B*. Através da equação de cada reta obtida, os coeficientes angulares utilizados nas Equação 5 e Equação 6 para determinar o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ). Com isso, obteve-se para a *AsAChE-A* um LD = 2,58 nmol.L⁻¹ e LQ = 8,61 nmol.L⁻¹, enquanto para a *AsAChE-B* um LD = 14,1 nmol.L⁻¹ e LQ = 47,0 nmol.L⁻¹.

Comparando com outros biossensores expressos na Tabela 4.4-1, nota-se que o limite de detecção é maior que os demais. Entretanto, quando comparado com o Bio-AChE A e Bio-AChE B realizado com a enzima do mesmo organismo que neste trabalho, pode-se observar que os limites de detecção para *AsAChE-A* é menor, enquanto para *AsAChE-B* se apresentou maior, essa diferença ocorre devido a forma de imobilização da enzima nos biossensores.

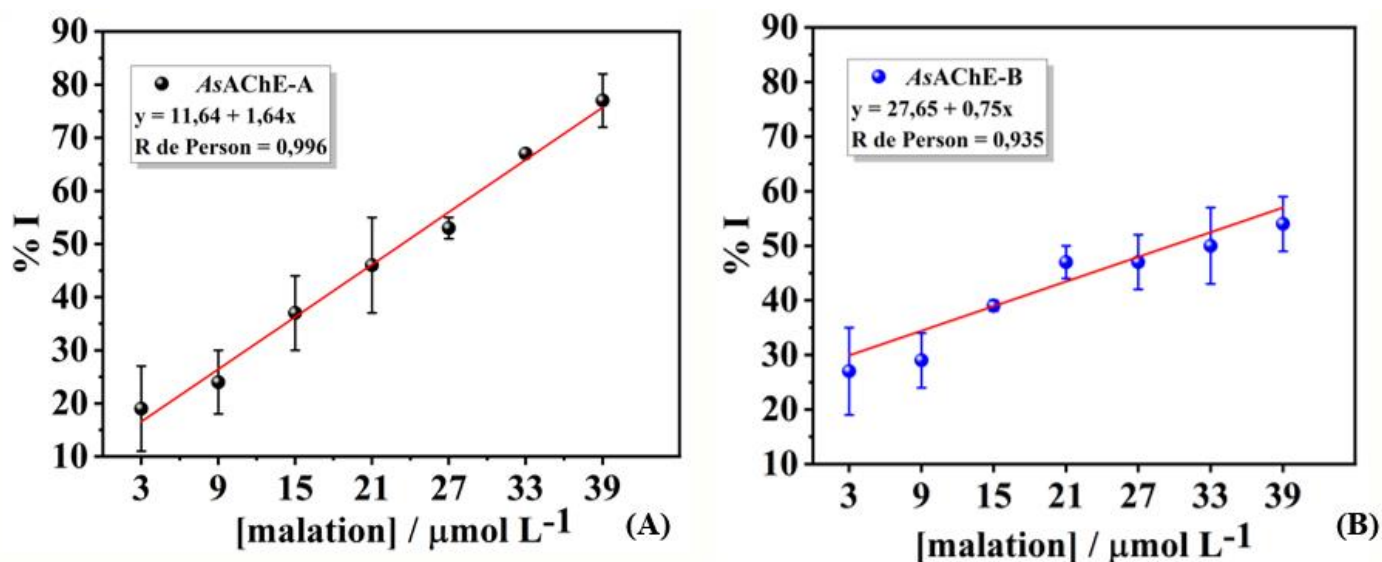


FIGURA 4.4-2: Porcentagem de inibição em função da concentração de malation para a *AsAChE A* em um tempo de 25 min (A). Porcentagem de inibição em função da concentração de malation para a enzima *AsAChE B* em um tempo de 25 min (B). Correntes obtidas por VOQ em [ATChCl] 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7,0. $a = 50 \text{ mV}$; $f = 50 \text{ Hz}$; $s = 0,002 \text{ V}$. Tempo de reação = 10 min. $[AsAChE A \text{ e } B] = 7 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Além disso, ressalta-se que para a metodologia proposta neste trabalho não é necessário um limite de detecção tão baixo, uma vez que essa ferramenta é utilizada como forma de triagem para a descoberta de novos inibidores derivados de produtos naturais e não para a detecção de pesticidas (Bilal *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2018).

TABELA 4.4-1: Desempenhos analítico de biossensores eletroquímicos de acetilcolinesterase para detecção de malation.

Biossensor	AChE	Faixa linear	LD	Referência
Am-				
AChE/Ni/GCN/PGE	<i>Apis mellifera</i>	0,1–1,6 μM	2 nM	Bilal, 2022
Tc-				
<i>Tribolium</i>				
AChE/Ni/GCN/PGE	<i>castaneum</i>	1–40 nM	0,86 nM	Bilal, 2022
Zn-				
<i>Zootermopsis</i>				
AChE/Ni/GCN/PGE	<i>nevadensis</i>	2–100 nM	2,3 nM	Bilal, 2022
AChE/CS/Fe ₃ O ₄	Não informado	0,01 - 20 nM	0,3 nM	Rodrigues, 2018
Bio-AChE A	<i>A. sexdens</i>	0,3 - 12 μM	9 nM	Araujo, 2024
Bio-AChE B	<i>A. sexdens</i>	0,3 - 12 μM	4 nM	Araujo, 2024
AsAChEA/PM	<i>A. sexdens</i>	3 – 39 μM	2,6 nM	Trabalho atual
AsAChEB/PM	<i>A. sexdens</i>	3 – 39 μM	14 nM	Trabalho atual

4.5 Estudo de inibição de acetilcolinesterases frente a galantamina:

Os estudos de inibição das enzimas acetilcolinesterases ocorreram a partir da galantamina, um composto estabelecido por sua propriedade anticolinesterásica. As condições utilizadas para este bioensaio são as mesmas do estudo de inibição realizado com malation e como forma de comparação a concentração foi convertida em mg.L^{-1} , assim as concentrações da galantamina variaram de 1 à 15 mg.L^{-1} . O tempo de ação da galantamina para cada concentração testada foi fixado em 25 min. As porcentagens de inibição se

encontram na Figura 4.5-1, em que é apresentado o perfil de inibição da galantamina frente as enzimas da formiga cortadeira e enguia elétrica.

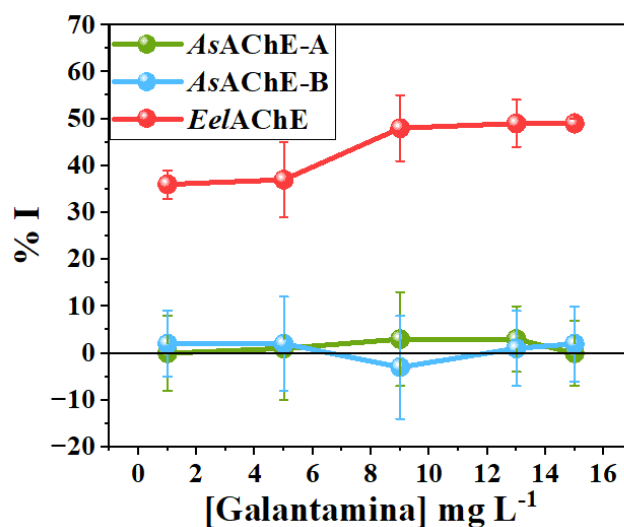


FIGURA 4.5-1: Gráfico da concentração de galantamina versus a porcentagem de inibição da atividade das enzimas *AsAChE-A*, *AsAChE-B* e *EelAChE* em um tempo de 25 min. Correntes obtidas por VOQ em [ATChCl] 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7,0. $a = 50$ mV; $f = 50$ Hz; $s = 0,002$ V. Tempo de reação = 10 min. [*AsAChE A e B*] = 7 μ g.mL⁻¹.

A galantamina é uma molécula conhecida pelo potencial inibitório da acetilcolinesterase humana, sendo utilizada como medicamento colinérgico para doença de Alzheimer (Cheng *et al.*, 2024; Sangaleti *et al.*, 2021; Simeonova *et al.*, 2022). Devido a sua importância, estudos de inibição utilizando a galantamina foram realizados utilizando biossensores eletroquímicos, porém a enzima testada comumente é a da enguia elétrica (Du *et al.*, 2007; Kostelnik *et al.*, 2017; Shamagsumova *et al.*, 2022; Vandeput *et al.*, 2015), devido a sua similaridade com a acetilcolinesterase humana (Rants'o *et al.*, 2022).

É importante contextualizar que a (-) galantamina é um produto natural isolado pela primeira vez em 1950, pertencente a classe dos alcalóides e identificados na família Amaryllidaceae (Cheng *et al.*, 2024), esta molécula

possui grande relevância devido a sua seletividade contra a BChE, reversibilidade e competitividade (Cheng *et al.*, 2024; Ivanov *et al.*, 2024; Miculas *et al.*, 2023).

Neste estudo de inibição com a galantamina, nota-se que as *AsAChE-A* e *AsAChE-B* apresentaram uma baixa porcentagem de inibição, sendo que para *AsAChE-A* a faixa de inibição ocorreu entre 0-3%, com a maior inibição em 9 e 13 mg.L⁻¹. Enquanto para *AsAChE-B* a faixa de inibição ocorreu entre -3-2% com a maior inibição em 1,2 e 15 mg.L⁻¹. Para ambas as acetilcolinesterases não houve variação evidente entre as inibições, demonstrando que a galantamina não possui atividade inibitória para as *AsAChE-A* e *AsAChE-B*. Em contraposto, para *EelAChE* o estudo de inibição com a galantamina apresentou resultados que demonstram o potencial inibitório esperado para a acetilcolinesterase da enguia-elétrica, exibindo porcentagens de inibição de 36-49% com as maiores inibições em 13 e 15 mg.L⁻¹. Diante desses resultados, reconhece-se que a inibição frente a este inibidor ocorreu apenas para *EelAChE* (Figura 4.5-1). Estando de acordo com o trabalho realizado por Santos et al. 2019 (Dos Santos *et al.*, 2019).

Esses resultados reforçam o uso de enzimas específicas para a realização de estudos para o controle de pragas, fornecendo ação individual para o alvo. Além disso, pesquisas a partir de produtos naturais são necessárias, para assim como a (-) galantamina (produto natural), que possui ação específica para a enzima humana não atingindo as *AsAChE-A* e *AsAChE-B*, pode-se encontrar um composto que atinja só as formigas cortadeiras não havendo influência para a espécie humana e outros organismos não-alvos.

4.6 Estudo de inibição de acetilcolinesterases frente ao extrato de microrganismo Escovopsis microspora:

Estudos de inibição das enzimas acetilcolinesterases também foram realizados a partir de extratos de microrganismos encontrados no ninho da formiga cortadeira. As informações se encontram na Figura 4.6-1 em que é apresentado o perfil de inibição do extrato do *Escovopsis microspora* frente as enzimas da formiga cortadeira e enguia elétrica.

Observa-se que, diante das três diferentes enzimas, o perfil de inibição apresentou distinções. Para o biossensor utilizando a *EelAChE* de acordo com o acréscimo da concentração do extrato há também um acréscimo na porcentagem de inibição, diferente do perfil dos biossensores utilizando *AsAChE*-A e *AsAChE*-B em que ocorre um aumento até a concentração 13 mg. L⁻¹ seguido de um decréscimo.

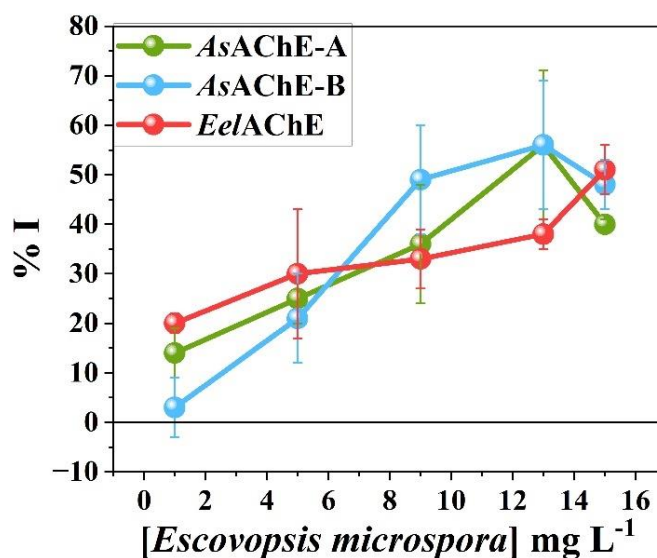


FIGURA 4.6-1: Porcentagem de inibição enzimática do extrato de *E. microspora* em diferentes concentrações. Correntes obtidas por VOQ em [ATChCl] 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7,0. $a = 50$ mV; $f = 50$ Hz; $s = 0,002$ V. Tempo de reação = 10 min. Inibição calculada através das médias das correntes obtidas.

O microrganismo *E. microspora* é um fungo em que seu gênero é conhecido como uma das principais ameaças ao ninho das formigas cortadeiras (Elizondo Wallace; Vargas Asensio; Pinto Tomás, 2014; Silva *et al.*, 2006; Varanda-Haifig *et al.*, 2017), apresentando efeito parasita ao *Leucoagaricus gongylophorus* fungo simbiótico da maioria das espécies da formiga cortadeira (Aguilar-Colorado; Rivera-Chávez, 2023). Estudos com a espécie *E. weberi* do mesmo gênero identificaram dois compostos aromáticos responsáveis pela inibição do crescimento do *L. gongylophorus*, promovendo o controle das formigas cortadeiras através da inibição do fungo simbiote (Dhodary *et al.*, 2018). Além

disso, houve uma estrutura que demonstrou efeito inseticida para a *Acromyrmex octospinosus* e outras que inibiram o crescimento da *Pseudonocardia* sp (Dhodary *et al.*, 2018; Heine *et al.*, 2018). Entretanto há uma espécie de guerra química entre a bactéria *Pseudonocardia* e o fungo *Escovopsis*. Ao mesmo tempo que o *Escovopsis* produz compostos antibacterianos contra a *Pseudonocardia*, ela produz compostos antifúngicos contra o *Escovopsis* (Bae *et al.*, 2021).

Toda via, em relação a espécie *E. microspora* não há muitos estudos realizados. Sua composição química e suas atividades inseticidas e antimicrobianas são desconhecidas, mostrando a importância deste trabalho, que conseguiu explorar esses aspectos, identificando que o extrato deste fungo age como inibidor da acetilcolinesterase da formiga cortadeira e da enguia elétrica.

4.7 Estudo de inibição da acetilcolinesterase frente ao extrato de microrganismo *Exophiala dermatitidis*, *Exophiala spinifera* e seus co-cultivos com *Escovopsis microspora*:

Os ensaios realizados ocorreram com as mesmas condições que o teste com o *E. microspora*. Primeiramente, o perfil de inibição das três AChE's frente aos extratos é apresentado na Figura 4.7-1.

Além do *Escovopsis* há outros fungos parasitas presentes nos ninhos das formigas cortadeiras, como as leveduras negras, os gêneros *Aureobasidium* sp., *Exophiala* sp., *Pyrenochaeta* sp., *Phialophora* sp. são exemplos desses simbioses prejudiciais (Currie; Mueller; Malloch, 1999; Little; Currie, 2007). Em 2014, Duarte e colaboradores relataram pela primeira vez as leveduras negras *Exophiala dermatitidis* e *E. spinifera* através de isolamentos do ninho.

Esses fungos são nocivos para as formigas devido a sua competição com as bactérias filamentosas por nutrientes, causando indiretamente o crescimento do fungo *Escovopsis*, devido a diminuição da capacidade da bactéria em suprimir o fungo parasita (Little; Currie, 2008). Analisando a inibição das AChE's em relação ao extrato de *Exophiala dermatitidis*, nota-se que as AsAChE-A e AsAChE-B possuem um perfil de inibição semelhante. Em relação a AsAChE-A,

sua inibição começa em 5% em 1 mg.L⁻¹ aumentando sua inibição até 57% em 13 mg.L⁻¹ e em seguida ocorre um decréscimo em 15 mg.L⁻¹ para 51% de inibição. Por sua vez para *AsAChE-B* em 1 mg.L⁻¹ sua inibição se encontra em 9% aumentando para 58% em 13 mg.L⁻¹ e em 15 mg.L⁻¹ sua inibição decai para 43%. Diversificando das AChE's da formiga cortadeira, a enzima *EelAChE* demonstrou um comportamento de estímulo frente a reação com a acetiltiocolina, assim, a corrente observada quando comparada com o branco possuiu um valor maior, tendo uma porcentagem negativa. A ativação da acetilcolinesterase facilitando a hidrólise do substrato já foi presenciada (Mu *et al.*, 2023; Piletsky *et al.*, 2022; Radić; Taylor, 2001). Isso pode ocorrer devido a presença de moléculas que se ligam em sítios alostéricos, que diferentemente do sítio ativo alteram a conformação da enzima facilitando sua inibição ou a ativação (Obaha; Novinec, 2023; Yu *et al.*, 2025; Zhu *et al.*, 2025).

Em relação a inibição frente ao extrato de co-cultivo dos fungos *E. microspora* e *E. dermatitidis* nota-se que os comportamentos de bloqueio do sítio ativo são diferentes para as três AChE's. A enzima que apresentou maior inibição foi a *AsAChE-B* com 60% em uma concentração de 15 mg.L⁻¹ do extrato, enquanto para a *AsAChE-A* a maior inibição ocorreu com 52% e para *EelAChE* a maior inibição ocorreu com 22%. Além disso, destaca-se que houve diferença entre as inibições em concentrações menores, na menor concentração testada a *AsAChE-A* apresentou a maior inibição com 22%, enquanto a *AsAChE-B* apresentou uma inibição de 4% e a *EelAChE* uma ativação de -23%.

Nos estudos deste trabalho em relação ao extrato *E. spinifera* as maiores inibição para as AChE's esteve em 67% para *AsAChE-A* em 15 mg L⁻¹, 59% para *AsAChE-B* em 13 mg L⁻¹ com um decréscimo em 15 mg L⁻¹ para 43% e ~29% para *EelAChE* nas concentrações 15 e 13 mg L⁻¹. Ressalta-se que o único extrato

de microrganismo já testado em acetilcolinesterase da formiga-cortadeira e da enguia elétrica foi o *E. spinifera*.

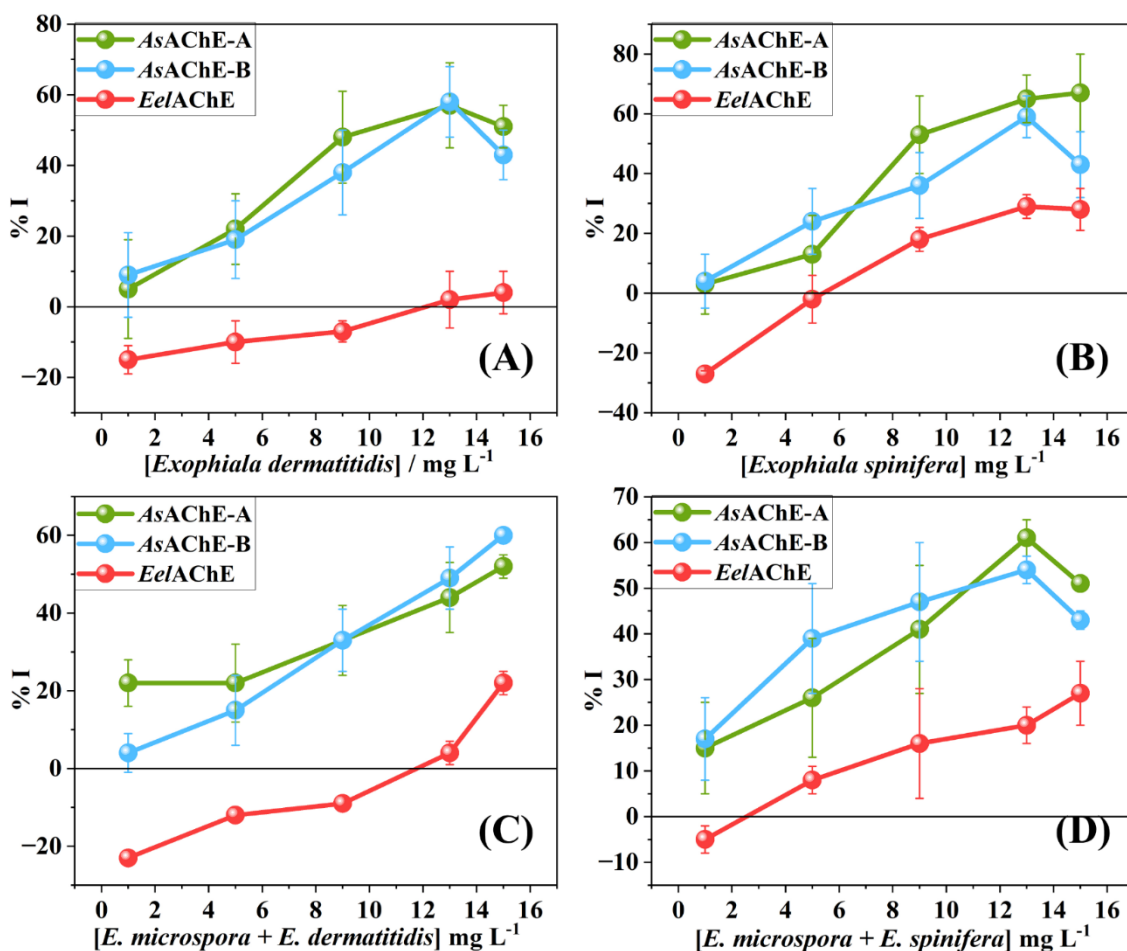


FIGURA 4.7-1: Porcentagem de inibição enzimática dos extratos de *E. dermatitidis* e *E. spinifera* em mono e co-cultivo com *E. microspora* em diferentes concentrações. (A) *E. dermatitidis*; (B) *E. spinifera*; (C) co-cultivo *E. dermatitidis* e *E. microspora*; (D) co-cultivo *E. spinifera* e *E. microspora*. Correntes obtidas por VOQ em [ATChCl] 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7,0. $a = 50$ mV; $f = 50$ Hz; $s = 0,002$ V. Tempo de reação = 10 min. Inibição calculada através das médias das correntes obtidas.

Em relação ao co-cultivo com o *E. microspora* os perfis de inibições entre a AsAChE-A e AsAChE-B foram semelhantes, ocorrendo um acréscimo até 13 mg.L⁻¹ com inibições de 61 e 54% respectivamente e um decréscimo em 15 mg.L⁻¹ com inibições de 51 e 43% respectivamente. Para a EelAChE houve uma resposta

linear em relação a inibição ocorrendo um estímulo em 1 mg.L^{-1} com 5% de ativação seguido de inibições variando entre 8 e 27%.

O efeito causado pela maioria dos extratos frente as AChE's foram de inibição, mesmo que em algumas concentrações houve um estímulo referente a atividade enzimática. Entretanto, a porcentagem de inibição referente a *EelAChE* se apresentou relativamente inferior as demais. Sendo que para o monocultivo do *E. dermatitidis* não houve inibição para a *EelAChE*, apenas para as *AsChE-A* e *AsChE-B*.

A co-cultura é uma metodologia que simula condições naturais, podendo fornecer melhores atividades de biopesticidas e antipatogênicos em extratos brutos, além de aumentar o rendimento de metabolitos secundários conhecidos e produzir análogos de metabolitos. Através dessa estratégia também é possível identificar como os fungos reagem quimicamente à competição (Knowles *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2023).

Diante dessas vantagens, ocorreu o estudo do co-cultivo das leveduras negras com o *E. microspora* expressando os resultados de inibição na Figura 4.7-2.

Ao averiguar as inibições ocasionadas pelo mono e co-cultivo referentes os fungos *Exophiala* nota-se divergências entre os métodos de cultivo e as enzimas analisadas. Para a *AsAChE-A* e *E. dermatitidis* houve uma grande diferença de inibição na concentração de 1 mg.L^{-1} , no monocultivo a inibição se encontrou em 5% enquanto no co-cultivo esteve em 22%, outro fator que se diferenciou foi o perfil de inibição, em que no co-cultivo ocorreu uma linearidade na inibição, enquanto no monocultivo em 15 mg.L^{-1} ocorreu um decréscimo na inibição.

Em relação a *AsAChE-A* e o fungo *E. spinifera*, na menor concentração do monocultivo a inibição esteve em 15%, enquanto no co-cultivo ocorreu uma inibição de 3%. Além disso, semelhante ao *E. dermatitidis* o co-cultivo possuiu uma linearidade no perfil de inibição, enquanto o monocultivo possuiu um decréscimo em 15 mg.L^{-1} .

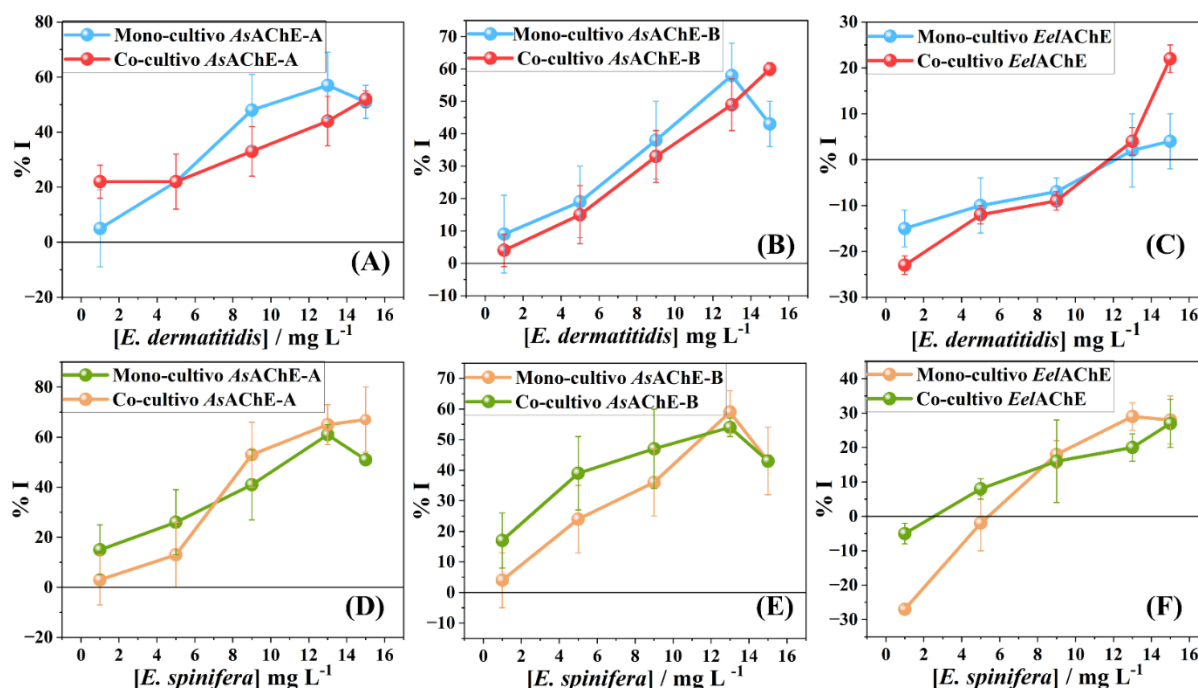


FIGURA 4.7-2: Porcentagem de inibição enzimática dos extratos de *E. dermatitidis*, *E. spinifera* em mono e co-cultivo com *E. microspora* em diferentes concentrações para cada enzima. (A) Inibição AsAChE-A frente ao mono e co-cultivo *E. dermatitidis*; (B) Inibição AsAChE-B frente ao mono e co-cultivo *E. dermatitidis*; (C) Inibição EelAChE frente ao mono e co-cultivo *E. dermatitidis*; (D) Inibição AsAChE-A frente ao mono e co-cultivo *E. spinifera*; (E) Inibição AsAChE-B frente ao mono e co-cultivo *E. spinifera* (F) Inibição EelAChE frente ao mono e co-cultivo *E. spinifera*. Correntes obtidas por VOQ em [ATChCl] 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol L⁻¹, pH 7,0. $a = 50$ mV; $f = 50$ Hz; $s = 0,002$ V. Tempo de reação = 10 min. Inibição calculada através das médias das correntes obtidas.

Em relação a AsAChE-A e o fungo *E. spinifera*, na menor concentração do mono-cultivo a inibição esteve em 15%, enquanto no co-cultivo ocorreu uma inibição de 3%. Além disso, semelhante ao *E. dermatitidis* o co-cultivo possuiu uma linearidade no perfil de inibição, enquanto o monocultivo possuiu um decréscimo em 15 mg.L⁻¹.

Ao analisar a AsAChE-B e o *E. dermatitidis* observa-se que as inibições são parecidas para o mono e co-cultivo, entretanto há novamente uma diferença no

perfil de inibição, em que o co-cultivo se apresenta de forma crescente e linear enquanto o monocultivo tem um decréscimo em 15 mg L^{-1} , o que não é observado no *E. spinifera* que apresenta um perfil de inibição semelhante com um decréscimo em 15 mg L^{-1} .

Para *EelAChE* e o *E. dermatitidis* apenas o co-cultivo apresentou inibição, sendo que essa atividade pode ser oriunda do *E. microspora* ou de algum composto novo produzido pela interação dos dois microrganismos. Enquanto, no que se refere o *E. spinifera* a inibição ocorreu para os dois cultivos com uma inibição máxima de $\sim 28\%$ para ambos, tendo como diferença o estímulo causado na menor concentração testada sendo maior para o monocultivo.

Com isso, o co-cultivo de microrganismos pode auxiliar na busca de novos bioinseticidas, devido a sua produção de novos compostos através da interação de fungo-fungo ou no aumento de metabólitos secundários.

Além de diferentes cultivos de fungos neste trabalho foi estudado se diferentes espécies de um mesmo gênero possuíam diferença em termos de inibição, apresentando os dados no Figura 4.7-3.

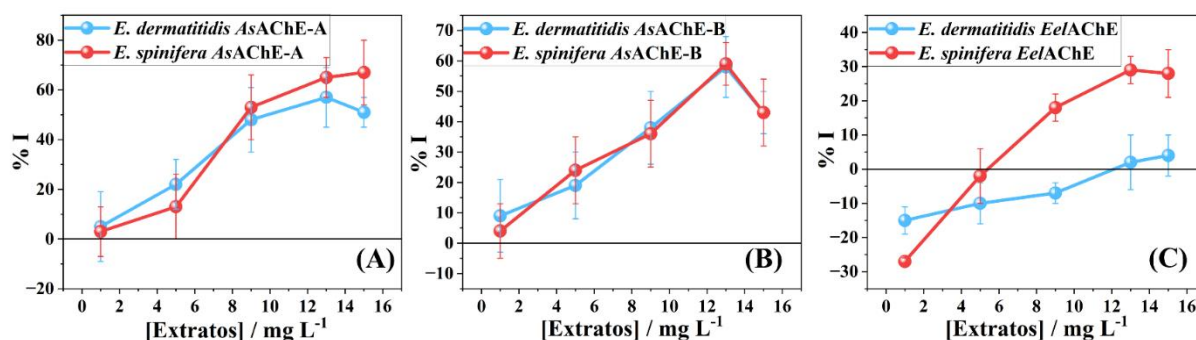


FIGURA 4.7-3: Porcentagem de inibição enzimática dos extratos do gênero *Exophiala* em diferentes concentrações para cada enzima. (A) Inibição *AsAChE-A* frente a duas espécies do gênero de *Exophiala*; (B) Inibição *AsAChE-B* frente a duas espécies do gênero de *Exophiala*; (C) Inibição *EelAChE* frente a duas espécies do gênero de *Exophiala*. Correntes obtidas por VOQ em $[\text{ATChCl}] 10,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ em PBS 10 mmol L^{-1} , pH 7,0. $a = 50 \text{ mV}$; $f = 50 \text{ Hz}$; $s = 0,002 \text{ V}$. Tempo de reação = 10 min. Inibição calculada através das médias das correntes obtidas.

Ao analisar o perfil de inibição das AChE's frente aos microrganismos de mesmo gênero, porém de espécies diferentes, nota-se que o perfil que mais se diferenciou foi da *EelAChE* em que a inibição ocorreu apenas com o *E. spinifera*. Enquanto o perfil que mais se assemelhou foi da *AsAChE*-B, em que além do perfil, as porcentagens de inibição também foram próximas. Para *AsAChE*-A há diferença no perfil de inibição entre as espécies, mesmo a porcentagem de inibição não diferindo muito.

4.8 Estudo de inibição da acetilcolinesterase frente ao extrato de microrganismo *Phialophora attae*, *Phialophora capiguarae* e seus co-cultivos com *Escovopsis microspora*:

Os presentes testes foram realizados de forma equivalente aos demais e estão apresentados na Figura 4.8-1.

Ao analisar os resultados obtidos verifica-se que para o extrato de monocultivo do *Phialophora attae* a *AsAChE*-A apresentou maior sensibilidade ao inibidor adquirindo cerca de 57% de inibição, enquanto a *AsChE*-B obteve sua maior inibição a 13 mg.L⁻¹ com 42%, ocorrendo um decréscimo em 15 mg.L⁻¹ para 21% de inibição. Para *EelAChE* houve um estímulo para a enzima sendo diminuído com o aumento da concentração até adquirir 0% de inibição em 15 mg.L⁻¹. Com isso, apenas as *AsAChE* A e B apresentaram sensibilidade aos extratos como forma de inibição.

Relacionando o monocultivo de *P. capiguarae* com as inibições estudadas temos que para *AsAChE*-A a uma inibição crescente linearizada entre 12% e 61% conforme o aumento da concentração. Para a *AsAChE*-B a inibição não varia de forma drástica mostrando uma resistência ao extrato, adquirindo inibições entre 8 e 18%. Enquanto para a *EelAChE* há apenas o estímulo da atividade enzimática que aumenta conforme o aumento na concentração do extrato, variando de 12 a 26%. Dessa forma, este extrato possuiu uma maior seletividade para *AsAChE*-A, não atingindo com eficiência a *AsAChE* B e *EelAChE*.

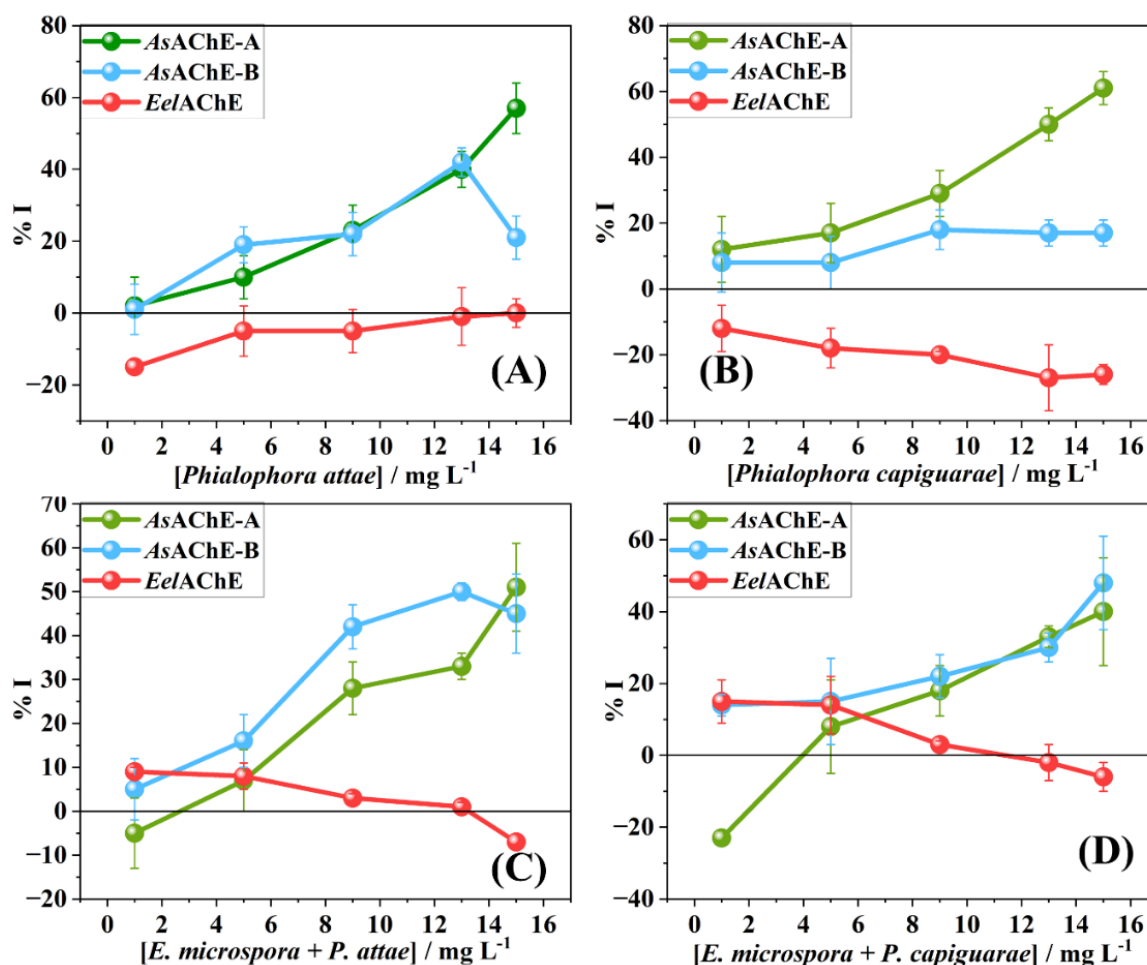


FIGURA 4.8-1: Porcentagem de inibição enzimática dos extratos de *P. attae* e *P. capiguarae* em mono e co-cultivo com *E. microspora* em diferentes concentrações. (A) *P. attae*; (B) *P. capiguarae*; (C) co-cultivo *P. attae* e *E. microspora*; (D) co-cultivo *P. capiguarae* e *E. microspora*. Correntes obtidas por VOQ em [ATChCl] 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7,0. $a = 50$ mV; $f = 50$ Hz; $s = 0,002$ V. Tempo de reação = 10 min. Inibição calculada através das médias das correntes obtidas.

Em relação ao co-cultivo do *P. attae* e *E. microspora* nota-se que a AsAChE apresenta um pequeno estímulo em 1 mg.L⁻¹ de 5% e nas demais concentrações uma inibição crescente até a inibição máxima de 51% em 15 mg.L⁻¹. Para a AsAChE-B a inibição varia de 5% até 50% entre as concentrações de 1 mg.L⁻¹ e 13 mg.L⁻¹, sendo que na maior concentração a inibição diminui para 45%. Enquanto para EelAChE entre 1 mg.L⁻¹ e 13 mg.L⁻¹ a inibição varia de 9% a 1%, diminuindo conforme a concentração aumenta, tendo um estímulo de 7% na

concentração máxima. Diferente dos casos até aqui apresentados, possivelmente o que ocorre é um aumento na concentração de um composto que age no sítio alostérico conforme a concentração é aumentada (Obaha; Novinec, 2023; Yu *et al.*, 2025; Zhu *et al.*, 2025), se este composto possui uma influência maior que o inibidor, conforme sua concentração aumenta a inibição é disfarçada e o estímulo é enfatizado. Entretanto, mesmo ocorrendo inibição ela é muito baixa comparada com as demais, podendo pressupor que o co-cultivo apresentou maior sensibilidade nas *AsAChE* A e B.

Verificando o co-cultivo de *P. capiguarae* com *E. microspora* observa-se que para *AsAChE*-A na menor concentração há um estímulo na atividade enzimática de 23%, decrescendo conforme o aumento da concentração do extrato até atingir uma inibição de 40%. Para *AsAChE*-B esse fator não é observado, pois ocorre apenas o comportamento de inibição de forma linear até a porcentagem máxima de 48%. Enquanto para *EelAChE* há uma inversão no comportamento de inibição, pois na menor concentração há uma inibição de 15% decrescendo até um estímulo de 6%. Semelhante ao caso anterior, há um declínio na inibição quando a concentração do extrato é aumentada, podendo constatar que dependendo da concentração o extrato pode agir mais especificamente nas enzimas. Em concentrações menores a inibição é evidenciada na *EelAChE* enquanto em concentrações maiores essa evidência ocorre nas *AsAChE*-A, contudo, a forma na qual o microrganismo é cultivado influencia na sua ação contra a acetilcolinesterase. Como apresentado na Figura 4.8-2.

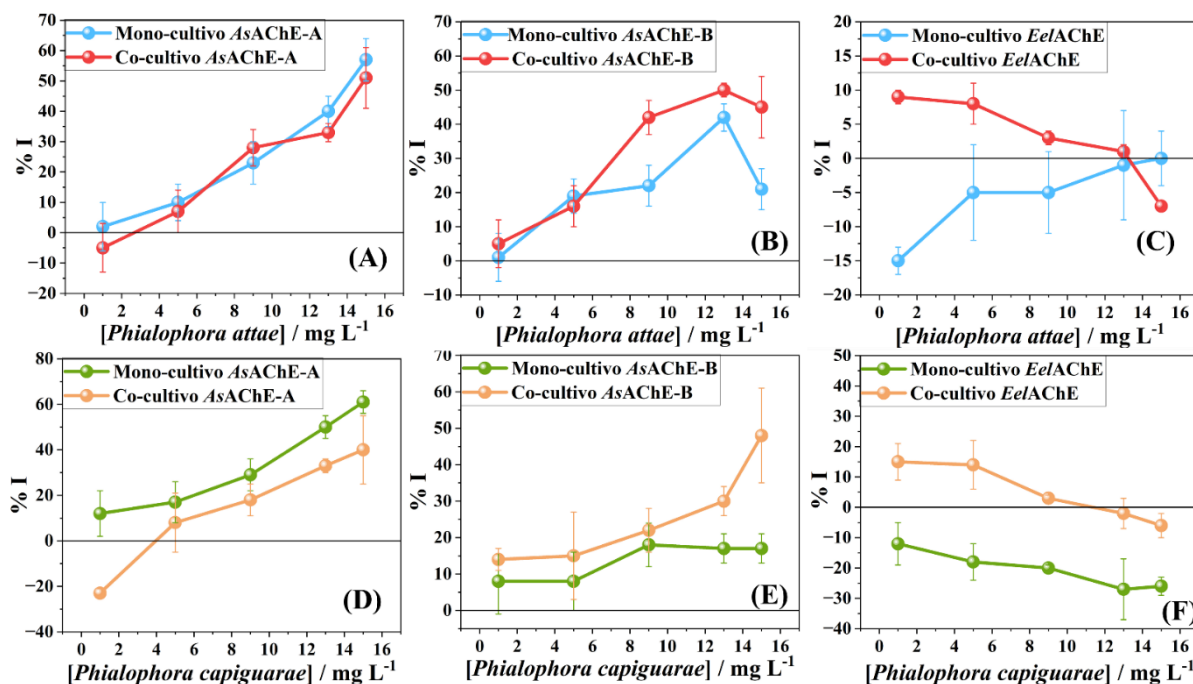


FIGURA 4.8-2: Porcentagem de inibição enzimática dos extratos *P. attae* e *P. capiguarae* em mono e co-cultivo com *E. microspora* em diferentes concentrações. (A) Inibição AsAChE-A frente ao mono e co-cultivo de *P. attae*; (B) Inibição AsAChE-B frente ao mono e co-cultivo de *P. attae*; (C) Inibição EelAChE frente ao mono e co-cultivo de *P. attae*; (D) Inibição AsAChE-A frente ao mono e co-cultivo de *P. capiguarae*; (E) Inibição AsAChE-B frente ao mono e co-cultivo de *P. capiguarae* (F) Inibição EelAChE frente ao mono e co-cultivo de *P. capiguarae*. Correntes obtidas por VOQ em [ATChCl] 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7,0. $a = 50$ mV; $f = 50$ Hz; $s = 0,002$ V. Tempo de reação = 10 min. Inibição calculada através das médias das correntes obtidas.

Quando se verifica os perfis de inibição do *P. attae* cultivados em mono e co-cultivo nota-se que para AsAChE-A (Figura 4.8-3, A) os dois extratos agem de forma semelhante frente a inibição, tendo diferenças sutis entre o mono e co-cultivo. Diferente da AsAChE-B (Figura 4.8-3, B) que apresenta maior sensibilidade ao co-cultivo atingindo uma inibição de 50%, enquanto no monocultivo a maior inibição é de 42%, além disso ambas possuem um decréscimo de inibição em 15 mg.L⁻¹, porém ele é mais evidenciado no monocultivo. Para EelAChE (Figura 4.8-3, C) observa-se que o perfil de inibição

mudou quando o *P. attae* foi cultivado com o *E. microspora*, uma vez que quando cultivado em mono-cultivo a ação do extrato frente a enzima foi de estímulo, diminuindo conforme houve o aumento da concentração, enquanto para o co-cultivo primeiramente ocorreu uma leve inibição para depois ocorrer o estímulo quando a concentração aumentou.

Quando os perfis do mono e co-cultivo do *P. capiguarae* é analisado verifica-se que para *AsAChE A* (Figura 4.8-3, D), os perfis se assemelham devido ao aumento linear da inibição, entretanto para o co-cultivo a inibição ocorreu de forma inferior além de haver um estímulo na menor concentração. Para *AsAChE-B* (Figura 4.8-3, E), no monocultivo houve uma resistência a inibição enquanto para o co-cultivo a inibição obteve um perfil linear influenciado pelo *E. microspora* ou pela relação entre os dois microrganismos. Em relação a *EelAChE* (Figura 4.8-3, F) o declínio da atividade ocorre com o aumento da concentração de ambos os extratos, porém para o co-cultivo na menor concentração há uma inibição de 15% o que não ocorre para o monocultivo que só demonstra estímulos na atividade.

Compreende-se que a influência do *E. microspora* em co-cultivo com o gênero *Phialophora* ocasionou em maiores inibições para as *AsAChE-B* e *EelAChE*, diminuindo sutilmente a inibição para a *AsAChE-A*.

Comparando as duas espécies do gênero *Phialophora* verifica-se que há algumas divergências entre as inibições, mostrado na Figura 4.8-3.

Ao analisar as espécies *P. attae* e *P. capiguarae* frente a *AsAChE-A* percebe-se que as duas espécies possuem o mesmo perfil e porcentagens de inibição parecidas. Para *AsAChE-B* o extrato de *P. attae* possuiu maior inibição que *P. capiguarae* apresentando diferença entre as espécies. Enquanto para *EelAChE* as duas espécies apresentaram estímulo ao invés de inibição, entretanto com o aumento da concentração do extrato de *P. attae* houve uma diminuição do estímulo, porém em relação ao *P. capiguarae* ao aumentar sua concentração aumenta-se o estímulo.

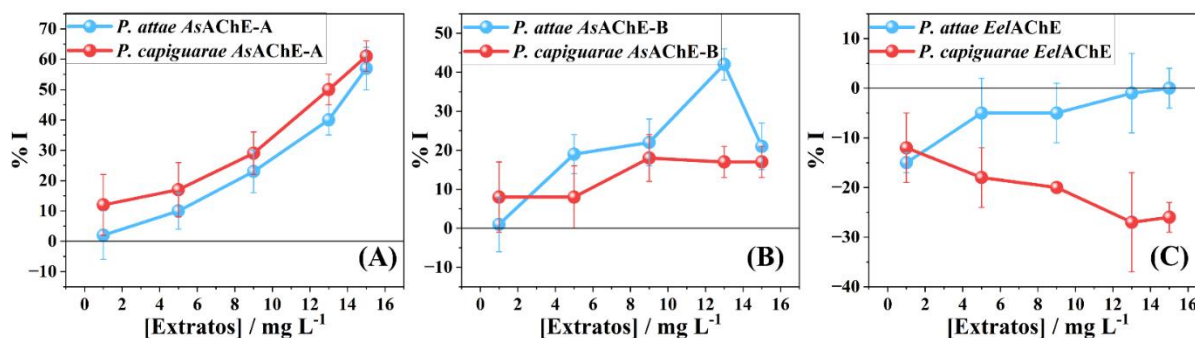


FIGURA 4.8-3: Porcentagem de inibição enzimática dos extratos do gênero *Phialophora* em diferentes concentrações para cada enzima. (A) Inibição AsAChE-A frente a duas espécies do gênero *Phialophora*; (B) Inibição AsAChE-B frente a duas espécies do gênero *Phialophora*; (C) Inibição EelAChE frente a duas espécies do gênero *Phialophora*. Corrente obtidas por VOQ. Amplitude = 50mV; f = 50 Hz, oxidação de [TChCl] = 10,1 mmol.L⁻¹ em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7, tempo de reação de 10 min. Inibição calculada através das médias das correntes obtidas.

Complementando a discussão sobre as inibições dos nove extratos testados nas entre as sessões 4.6 a 4.8 construiu-se um mapa de calor, apresentado na Figura 4.8-4. Codificação, Anexo 2.

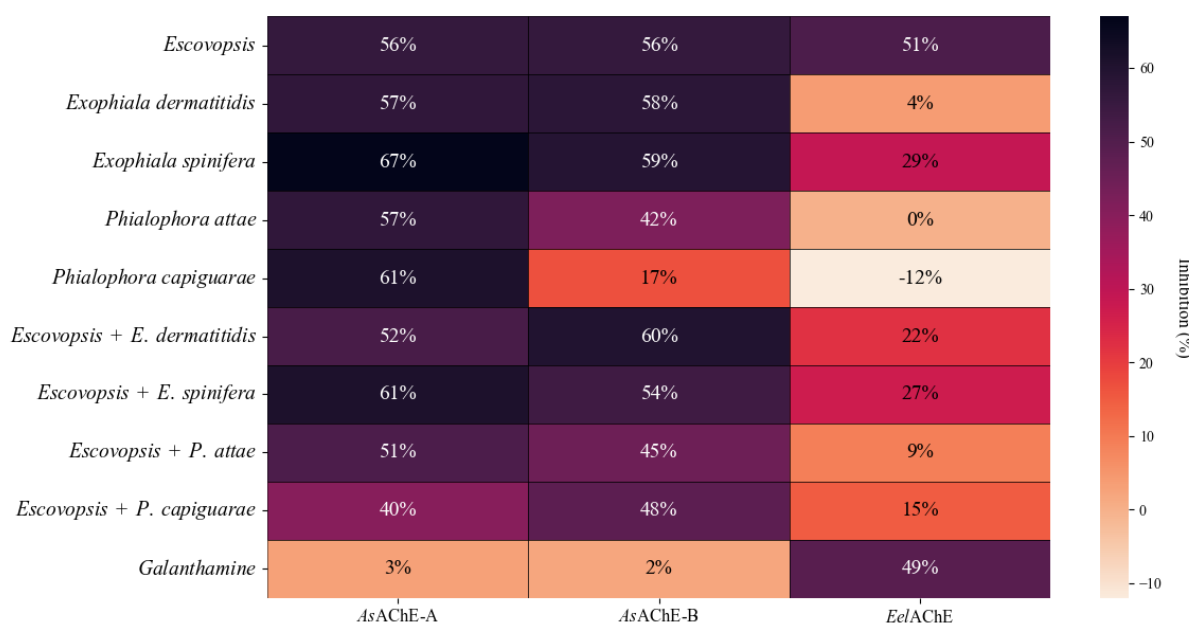


FIGURA 4.8-4: Mapa de calor (heatmap) representando a porcentagem de inibição da atividade enzimática por diferentes extratos fúngicos e pela galantamina sobre três formas de acetilcolinesterase (*AsAChE-A*, *AsAChE-B* e *EelAChE*). Os valores percentuais são apresentados no interior de cada célula, enquanto a intensidade da cor varia de forma inversa à magnitude: tons mais escuros indicam maior inibição, e tons mais claros, menor inibição. Os nomes dos microrganismos estão destacados em itálico conforme a nomenclatura científica.

À medida que a taxa de inibição da enzima aumenta, a coloração no mapa de calor torna-se mais intensa, evidenciando de forma visual o impacto de cada extrato sobre a atividade enzimática e facilitando a comparação entre eles. Pode-se aferir que entre eles houve extratos com um enfoque mais determinado para as enzimas da formiga cortadeira, não atingindo de forma efetiva a *EelAChE*. Entre eles há o *E. dermatitidis*, *P. attae* e *P. capiguarae*. Entretanto, mesmo que os demais extratos possuíam inibição na *EelAChE* a inibição nas enzimas da formiga cortadeira se apresentou superior, sendo alternativas viáveis para seu uso como bioinseticidas.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou o potencial dos biossensores eletroquímicos como ferramentas acessíveis, sensíveis e sustentáveis para a triagem de inibidores enzimáticos com possível ação inseticida. A construção dos sensores utilizando acetilcolinesterases extraídas de formigas cortadeiras (*AsAChE-A* e *AsAChE-B*), além da enzima comercial de enguia elétrica (*EelAChE*), demonstra a viabilidade de utilizar enzimas nativas em dispositivos analíticos, ampliando as possibilidades de aplicação em estudos voltados ao controle de pragas. Além disso, otimização do processo de imobilização das enzimas por meio do planejamento composto central (PCC) possibilitou a definição de condições ideais para o desempenho dos biossensores, que apresentaram limites de detecção de 2,6 nM para a *AsAChE-A* e 14 nM para a *AsAChE-B*, valores que confirmam a sensibilidade frente ao inibidor modelo malation. Ademais, os resultados com a galantamina identificaram a importância de obter sensores com enzimas do organismo alvo e apresentaram potencial inibitório aos extratos de microrganismos antagonistas isolados dos ninhos de formigas cortadeiras. Os extratos de *Phialophora attae*, *Escovopsis microspora*, *Exophiala dermatitidis* e *Exophiala spinifera* apresentaram inibições significativas, revelando um forte potencial bioinseticida. A capacidade de detectar inibidores naturais com seletividade e reprodutibilidade evidencia que os biossensores construídos não apenas oferecem uma alternativa eficaz ao uso de pesticidas sintéticos, como também abrem caminho para novas estratégias no controle de pragas agrícolas. A aplicação dessa tecnologia em triagens preliminares de compostos naturais pode acelerar a descoberta de moléculas mais seguras, seletivas e ecologicamente adequadas. Além de contribuir diretamente para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados em enzimas nativas, este estudo estabelece uma base sólida para futuras investigações voltadas ao isolamento e caracterização dos princípios ativos presentes nos extratos testados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, A. S.; ULIANA, C. V.; MARTUCCI, D. H.; FARIA, R. C. Simple and rapid fabrication of disposable carbon-based electrochemical cells using an electronic craft cutter for sensor and biosensor applications. **Talanta**, vol. 146, p. 381–387, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.002>.

AGÊNCIA FAPESP. Estudo desvenda mecanismo evolutivo que pode levar ao controle de formigas. 2015. **São Paulo: Agência FAPESP.** .

AGUILAR-COLORADO, Á. S.; RIVERA-CHÁVEZ, J. Ants/nest-associated fungi and their specialized metabolites: taxonomy, chemistry, and bioactivity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 33, n° 5, p. 901–923, 2023. <https://doi.org/10.1007/s43450-023-00417-3>.

ALEX. A, V.; MUKHERJEE, A. An ultrasensitive “mix-and-detect” kind of fluorescent biosensor for malaoxon detection using the AChE-ATCh-Ag-GO system. **RSC Advances**, vol. 13, n° 21, p. 14159–14170, 2023. <https://doi.org/10.1039/d3ra02253f>.

ALI, S.; NOOR, S. Central composite design approach for optimization of extraction and dyeing conditions of marigold colorant. **Natural Products Chemistry & Research**, vol. 04, n° 04, p. 1-5, 2016. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000224>.

ALMEIDA, E. R. V.; MELO, A. S.; LIMA, A. S.; LEMOS, V. A.; OLIVEIRA, G. S.; CLETCHÉ, C. F.; SOUZA, A. S.; BEZERRA, M. A. A review of the use of central composite design in the optimization of procedures aiming at food chemical analysis. **Food Chemistry**, vol. 480, p. 1-9, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143849>.

ÁNGEL-SALAZAR, J. S.; ECHEVERRI-RUBIANO, C.; RODRÍGUEZ-CHALARCA, J.; LÓPEZ-GERENA, J.; DOS SANTOS, R. F.; JURAT-FUENTES, J. L.; REVYNTHI, A. M.; VARGAS, G. Development of a bioassay method to test activity of cry insecticidal proteins against *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae) sugarcane stem borers. **PLoS ONE**, vol. 18, n° 10, p. 1-14, 1 out. 2023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292992>.

ARAÚJO, S. dos S. Biossensores contendo acetilcolinesterases de formigas cortadeiras para screening de potenciais inseticidas naturais. 2024. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2024. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/20.500.14289/21205>.

ARAUJO, T. F.; SILVA, L. P. The utilization of central composite design for the production of hydrogel blends for 3d printing. **Coatings**, vol. 14, n° 10, p. 1-12, 2024. <https://doi.org/10.3390/coatings14101324>.

ASSIS, C. R. D.; LINHARES, A. G.; CABRERA, M. P.; OLIVEIRA, V. M.; SILVA, K. C. C.; MARCUSCHI, M.; MACIEL CARVALHO, E. V. M.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO, L. B. Erythrocyte acetylcholinesterase as biomarker of pesticide exposure: new and forgotten insights. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 25, n° 19, p. 18364–18376, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2303-9>.

ATTILI-ANGELIS, D.; DUARTE, A. P. M.; PAGNOCCA, F. C.; NAGAMOTO, N. S.; DE VRIES, M.; STIELOW, J. B.; DE HOOOG, G. S. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini). **Fungal Diversity**, vol. 65, n° 1, p. 65–75, 2014. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0275-0>.

BAE, M.; MEVERS, E.; PISHCHANY, G.; WHALEY, S. G.; ROCK, C. O.; ANDES, D. R.; CURRIE, C. R.; PUPO, M. T.; CLARDY, J. Chemical exchanges between multilateral symbionts. **Organic Letters**, vol. 23, n° 5, p. 1648–1652, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c00068>.

BAGROWSKA, W.; KARASEWICZ, A.; GÓRA, A. Comprehensive analysis of acetylcholinesterase inhibitor and reactivator complexes: implications for drug design and antidote development. **Drug Discovery Today**, vol. 29, n° 12, p. 1-13, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2024.104217>.

BEAUMELLE, L.; TISON, L.; EISENHAUER, N.; HINES, J.; MALLADI, S.; PELOSI, C.; THOUVENOT, L.; PHILLIPS, H. R. P. Pesticide effects on soil fauna communities—A meta-analysis. **Journal of Applied Ecology**, vol. 60, n° 7, p. 1239–1253, 2023. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.14437>.

BENJAMIN, J.; IDOWU, O.; BABALOLA, O. K.; OZIEGBE, E. V.; OYEDOKUN, D. O.; AKINYEMI, A. M.; ADEBAYO, A. Cereal production in Africa: the threat of certain pests and weeds in a changing climate: A review. **Agriculture and Food Security**, vol. 13, n° 1, p. 1-16, 2024. <https://doi.org/10.1186/s40066-024-00470-8>.

BHATT, P.; ZHOU, X.; HUANG, Y.; ZHANG, W.; CHEN, S. Characterization of the role of esterases in the biodegradation of organophosphate, carbamate, and pyrethroid pesticides. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 411, p. 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.125026>.

BHATTU, M.; VERMA, M.; KATHURIA, D. Recent advancements in the detection of organophosphate pesticides: A review. **Analytical Methods**, vol. 13, n° 38, p. 4390–4428, 2021. <https://doi.org/10.1039/d1ay01186c>.

BILAL, S.; NASIR, M.; HASSAN, M. M.; REHMAN, M. F. ur; SAMI, A. J.; HAYAT, A. A novel construct of an electrochemical acetylcholinesterase biosensor for the investigation of malathion sensitivity to three different insect species using a NiCr₂O₄/g-C₃N₄ composite integrated pencil graphite electrode. **RSC Advances**, vol. 12, n° 26, p. 16860–16874, 2022. <https://doi.org/10.1039/d2ra01307j>.

BLOUQUY, L.; MOTTET, C.; OLIVARES, J.; PLANTAMP, C.; SIEGWART, M.; BARRÈS, B. How varying parameters impact insecticide resistance bioassay: An example on the worldwide invasive pest *Drosophila suzukii*. **PLoS ONE**, vol. 16, n° 3, p. 1-19, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247756>.

BOLDORINI, G. X.; MCCARY, M. A.; ROMERO, G. Q.; MILLS, K. L.; SANDERS, N. J.; REICH, P. B.; MICHALKO, R.; GONÇALVES-SOUZA, T. Predators control pests and increase yield across crop types and climates: a meta-analysis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, vol. 291, n° 2018, p. 1-11, 2024. <https://doi.org/10.1098/rspb.2023.2522>.

BOURNE, Y.; GRASSI, J.; BOUGIS, P. E.; MARCHOT, P. Conformational flexibility of the acetylcholinesterase tetramer suggested by x-ray crystallography. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 274, no 43, p. 30370–30376, 1999. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.43.30370>.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, DF: Diário Oficial da União: seção 1, 2 jun. 2003.

BUCUR, M. P.; BUCUR, B.; RADU, G. L. Critical evaluation of acetylthiocholine iodide and acetylthiocholine chloride as substrates for amperometric biosensors based on acetylcholinesterase. **Sensors (Switzerland)**, vol. 13, n° 2, p. 1603–1613, 2013. <https://doi.org/10.3390/s130201603>.

CATALANI, G. C.; SOUSA, K. K. A.; CAMARGO, R. S. da; CALDATO, N.; MATOS, C. A. O.; FORTI, L. C. Chemical control of leaf-cutting ants: how do workers disperse toxic bait fragments onto fungus garden? **Revista Brasileira de Entomologia**, vol. 63, n° 4, p. 290–295, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2019.09.004>.

CHENG, B.; WANG, Q.; AN, Y.; CHEN, F. Recent advances in the total synthesis of galantamine, a natural medicine for Alzheimer's disease. **Natural Product Reports**, vol. 41, n° 7, p. 1060–1090, 2024. <https://doi.org/10.1039/d4np00001c>.

CHIKTE, T.; KOPTA, T.; PSOTA, V.; ARIZMENDI, J.; CHWIL, M. A Comprehensive review of low- and zero-residue pesticide methods in vegetable production. **Agronomy**, vol. 14, n° 11, p. 1-34, 2024. <https://doi.org/10.3390/agronomy14112745>.

CNA - CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL; CEPEA - CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. Sustentado por safra recorde no campo, PIB do agronegócio tem alta modesta no primeiro trimestre. 2023.

COLOMBARI, K. F. S.; FUJIHARA, R. T.; SOUZA-CAMPANA, D. R.; WAZEMA, C. T.; SOUZA, E. S. Survey of leaf-cutting ant species in the central region of the state of Tocantins, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 83, p. 1-6, 2023. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.248727>.

CRAPNELL, R. D.; BANKS, C. E. Electroanalytical overview: screen-printed electrochemical sensing platforms. **ChemElectroChem**, vol. 11, n° 19, p. 1-22, 2024. <https://doi.org/10.1002/celec.202400370>.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 96, n° 14, p. 7998–8002, 1999. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.7998>

DANA, L. M.; RAMOS-GARCÍA, C.; KERR, D. A.; FRY, J. M.; TEMPLE, J.; POLLARD, C. M. Social vulnerability and child food insecurity in developed countries: A systematic review. **Advances in Nutrition**, vol. 16, n° 2, p. 1-20, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2025.100365>.

DE LIMA, B. R.; LIMA, J. M.; MACIEL, J. B.; VALENTIM, C. Q.; NUNOMURA, R. de C. S.; LIMA, E. S.; KOOLEN, H. H. F.; DE SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B.; CASS, Q. B.; DA SILVA, F. M. A. Synthesis and inhibition evaluation of new benzyltetrahydroprotoberberine alkaloids designed as acetylcholinesterase inhibitors. **Frontiers in Chemistry**, vol. 7, p. 1-12, 2019. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00629>.

DE SOUZA, A. A. N.; BARTOLOMEU, A. A.; BROCKSOM, T. J.; NOËL, T.; DE OLIVEIRA, K. T. Direct synthesis of α -sulfenylated ketones under electrochemical conditions. **The Journal of Organic Chemistry**, vol. 87, no 9, p. 5856–5865, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c00147>.

DHODARY, B.; SCHILG, M.; WIRTH, R.; SPITELLER, D. Secondary metabolites from *Escovopsis weberi* and their role in attacking the garden fungus of leaf-cutting ants. **Chemistry - A European Journal**, vol. 24, n° 17, p. 4445–4452, 2018. <https://doi.org/10.1002/chem.201706071>.

DIARRA, U.; OSBORNE-NAIKATINI, T.; SUBRAMANI, R. Actinomycetes associated with hymenopteran insects: a promising source of bioactive natural products. **Frontiers in Microbiology**, vol. 15, p. 1-20, 2024. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1303010>.

DOS SANTOS, A. M.; MOREIRA, A. C.; LOPES, B. R.; FRACOLA, M. F.; DE ALMEIDA, F. G.; BUENO, O. C.; CASS, Q. B.; SOUZA, D. H. F. Acetylcholinesterases from leaf-cutting ant *Atta sexdens*: Purification, characterization, and capillary reactors for on-flow assays. **Enzyme Research**, vol. 2019, p. 1-10, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6139863>.

DOS SANTOS ARAÚJO, S.; FONSECA, W. T.; DAS GRAÇAS FERNANDES DA SILVA, M. F.; FORIM, M. R.; FERNANDES, J. B.; CENSI FARIA, R. Disposable electrochemical biosensor based on acetylcholinesterase for inhibition assays using a natural substance and plant extracts. **Analytical Methods**, vol. 17, n° 11, p. 2417–2426, 2025. <https://doi.org/10.1039/d4ay02084g>.

DU, D.; CHEN, S.; CAI, J.; SONG, D. Comparison of drug sensitivity using acetylcholinesterase biosensor based on nanoparticles-chitosan sol-gel composite. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, vol. 611, n° 1–2, p. 60–66, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2007.08.007>.

DUAN, H.; PENG, S.; HE, S.; TANG, S. Y.; GODA, K.; WANG, C. H.; LI, M. Wearable electrochemical biosensors for advanced healthcare monitoring. **Advanced Science**, vol. 12, n° 2, p. 1-28, 2025. <https://doi.org/10.1002/advs.202411433>.

DUARTE, A. P. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; BARON, N. C.; FORTI, L. C.; PAGNOCCA, F. C. Leaf-cutting ants: An unexpected microenvironment holding human opportunistic black fungi. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, vol. 106, n° 3, p. 465–473, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0215-3>.

ELIZONDO WALLACE, D. E.; VARGAS ASENSIO, J. G.; PINTO TOMÁS, A. A. Correlation between virulence and genetic structure of *Escovopsis* strains from leaf-cutting ant colonies in Costa Rica. **Microbiology (United Kingdom)**, vol. 160, n° PART 8, p. 1727–1736, 2014. <https://doi.org/10.1099/mic.0.073593-0>.

ELLIOT, S. L.; MONTTOYA, Q. V.; CAIXETA, M. C. S.; RODRIGUES, A. The fungus *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales): a critical review of its biology and parasitism of Attine ant colonies. **Frontiers in Fungal Biology**, vol. 5, p. 1-19, 2024. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2024.1486601>.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, vol. 7, p. 88-95 1961. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

ELMORSY, E.; AL-GHAFARI, A.; AL DOGHAITHER, H.; SALAMA, M.; CARTER, W. G. An investigation of the neurotoxic effects of malathion, chlorpyrifos, and paraquat to different brain regions. **Brain Sciences**, vol. 12, p. 1-23, nº 8, 2022. <https://doi.org/10.3390/brainsci12080975>.

FAO. 2023. World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2023. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc8166en>

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. D. C.; CARVALHO, P. C.; GOZZO, F. C. Xplex: an effective, multiplex cross-linking chemistry for acidic residues. **Analytical Chemistry**, vol. 90, nº 10, p. 6043–6050, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05135>.

FRANCOEUR, C. B.; MAY, D. S.; THAIRU, M. W.; HOANG, D. Q.; PANTHOFFER, O.; BUGNI, T. S.; PUPO, M. T.; CLARDY, J.; PINTO-TOMÁS, A. A.; CURRIE, C. R. Burkholderia from fungus gardens of fungus-growing ants produces antifungals that inhibit the specialized parasite *Escovopsis*. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 87, nº 14, p. 1–13, 2021. <https://doi.org/10.1128/AEM.00178-21>.

GIRALDO, C.; CHAVES-LÓPEZ, C.; TOFALO, R.; ANGRISANI, R.; RODRIGUES, A.; MONTTOYA-LERMA, J. Yeasts associated with the worker caste of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* under experimental conditions in Colombia. **Archives of Microbiology**, vol. 204, p. 1-10, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02811-2>.

GOKULAKRISHNAA, R. K.; THIRUNAVUKKARASU, S. Bioassay techniques in entomological research. **International Journal of Plant & Soil Science**, vol. 35, nº 16, p. 363–373, 2023. <https://doi.org/10.9734/ijpss/2023/v35i163163>.

GOLDSTEIN, S. L.; KLASSEN, J. L. *Pseudonocardia* symbionts of fungus-growing ants and the evolution of defensive secondary metabolism. **Frontiers in Microbiology**, vol. 11, p. 1-8, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.621041>.

GÓMEZ-DÍAZ, J. S.; NIÑO-CASTRO, A.; VALENCIA-GIRALDO, S. M.; COTAZO-CALAMBAS, K. M. Hygienic behavior and antimicrobial peptide expression of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (Hymenoptera, Formicidae) to *Metharhizium anisopliae*. **Journal of Hymenoptera Research**, vol. 91, p. 335–356, 2022. <https://doi.org/10.3897/JHR.91.82381>.

GULER, M.; TURKOGLU, V.; KIVRAK, A. Electrochemical detection of malathion pesticide using acetylcholinesterase biosensor based on glassy carbon electrode modified with conducting polymer film. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 23, n° 12, p. 12343–12351, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6385-y>.

HAO, M.; DING, H.; LI, L.; LV, M.; XU, H. Discovery of pesticide candidates from natural plant products: semisynthesis and characterization of andrographolide-based esters and study of their pesticidal properties and toxicology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 72, n° 11, p. 5574–5584, 2024. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c06681>.

HEINE, D.; HOLMES, N. A.; WORSLEY, S. F.; SANTOS, A. C. A.; INNOCENT, T. M.; SCHERLACH, K.; PATRICK, E. H.; YU, D. W.; MURRELL, J. C.; VIERIA, P. C.; BOOMSMA, J. J.; HERTWECK, C.; HUTCHINGS, M. I.; WILKINSON, B. Chemical warfare between leafcutter ant symbionts and a co-evolved pathogen. **Nature Communications**, vol. 9, p. 1-11 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04520-1>.

HOU, Y.; BAI, Y.; LU, C.; WANG, Q.; WANG, Z.; GAO, J.; XU, H. Applying molecular docking to pesticides. **Pest Management Science**, vol. 79, n° 11, p. 4140–4152, 2023. DOI <https://doi.org/10.1002/ps.7700>. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.7700>.

HOWSE, M. W. F.; HAYWOOD, J.; LESTER, P. J. Sociality reduces the probability of eradication success of arthropod pests. **Insectes Sociaux**, vol. 70, n° 3, p. 285–294, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00040-023-00921-8>.

IRO, U. I.; ALANEME, G. U.; ATTAH, I. C.; GANASEN, N.; DURU, S. C.; OLAIYA, B. C. Optimization of cassava peel ash concrete using central composite design method. **Scientific Reports**, vol. 14, p. 1-23, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58555-0>.

IVANOV, A.; SHAMAGSUMOVA, R.; LARINA, M.; EVTUGYN, G. Electrochemical acetylcholinesterase sensor for anti-Alzheimer's disease drug determination. **Biosensors**, vol. 14, n° 2, p. 1-20, 2024. <https://doi.org/10.3390/bios14020093>.

IVANOV, A.; STOIKOV, D.; SHAFIGULLINA, I.; SHURPIK, D.; STOIKOV, I.; EVTUGYN, G. Flow-through acetylcholinesterase sensor with replaceable enzyme reactor. **Biosensors**, vol. 12, n° 9, p. 1-15, 2022. <https://doi.org/10.3390/bios12090676>.

JIMÉNEZ, N. L.; FOSCO, I. R.; NASSAR, G. C.; SÁNCHEZ-RESTREPO, A. F.; DANNA, M. S.; CALCATERRA, L. A. Economic injury level and economic threshold as required by forest stewardship council for management of leaf-cutting ants in forest plantations. **Agricultural and Forest Entomology**, vol. 23, n° 1, p. 87–96, 2021. <https://doi.org/10.1111/afe.12409>.

KARTHICK RAJAN, D.; MOHAN, K.; RAJARAJESWARAN, J.; DIVYA, D.; THANIGAIVEL, S.; ZHANG, S. Toxic effects of organophosphate pesticide monocrotophos in aquatic organisms: A review of challenges, regulations and future perspectives. **Environmental Research**, vol. 244, 1-16, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117947>.

KHALEQUE, M. A.; HOSSAIN, S. I.; ALI, M. R.; ALY SAAD ALY, M.; ABUELMAKAREM, H. S.; AL MAMUN, M. S.; HOSSAIN KHAN, M. Z. Bioreceptor modified electrochemical biosensors for the detection of life threatening pathogenic bacteria: a review. **RSC Advances**, vol. 14, n° 39, p. 28487–28515, 2024. <https://doi.org/10.1039/d4ra04038d>.

KHAYAT, R. O. The interplay between leaf-cutter ants behaviour and social organization. **Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences**, vol. 10, n° 1, p. 225–231, 2024. <https://doi.org/10.1007/s43994-023-00074-1>.

KIM, T.; SEO, W. Pesti-gen: unleashing a generative molecule approach for toxicity aware pesticide design. 2025. Disponível em: <http://arxiv.org/abs/2501.14469>.

KNORR, D. Y.; SCHNEIDER, K.; BÜSCHGENS, L.; FÖRSTER, J.; GEORGES, N. S.; GEURTEN, B. R. H.; HEINRICH, R. Protection of insect neurons by erythropoietin/CRLF3-mediated regulation of pro-apoptotic acetylcholinesterase. **Scientific Reports**, vol. 12, p. 1-14, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22035-0>.

KNOWLES, S. L.; RAJA, H. A.; ROBERTS, C. D.; OBERLIES, N. H. Fungal-fungal co-culture: a primer for generating chemical diversity. **Natural Product Reports**, vol. 39, n° 8, p. 1557–1573, 2022. <https://doi.org/10.1039/d1np00070e>.

KOSTELNIK, A.; KOPEL, P.; CEGAN, A.; POHANKA, M. Construction of an acetylcholinesterase sensor based on synthesized paramagnetic nanoparticles, a simple tool for neurotoxic compounds assay. **Sensors (Switzerland)**, vol. 17, n° 4, 1-12, 2017. <https://doi.org/10.3390/s17040676>.

KRAM, S.; SCHÄFER, M.; RABENSTEIN, R. Approximation of enzyme kinetics for high enzyme concentration by a first order perturbation approach. **Journal of Mathematical Chemistry**, vol. 56, n° 4, p. 1153–1183, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10910-017-0848-3>.

LEE, T. Z. E.; KRONGCHAI, C.; MOHD IRWN LU, N. A. L.; KITTIWACHANA, S.; SIM, S. F. Application of central composite design for optimization of the removal of humic substances using coconut copra. **International Journal of Industrial Chemistry**, vol. 6, n° 3, p. 185–191, 2015. <https://doi.org/10.1007/s40090-015-0041-0>.

LITTLE A. E, CURRIE C. R. Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. **Ecology**. vol. 89 n°5, 1216-1222. 2008. doi: 10.1890/07-0815.1.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: Discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. **Biology Letters**, vol. 3, n° 5, p. 501–504, 2007. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0253>.

LU, Y.; PARK, Y.; GAO, X.; ZHANG, X.; YAO, J.; PANG, Y. P.; JIANG, H.; ZHU, K. Y. Cholinergic and non-cholinergic functions of two acetylcholinesterase genes revealed by gene-silencing in *Tribolium castaneum*. **Scientific Reports**, vol. 2, p. 1-7, 2012. <https://doi.org/10.1038/srep00288>.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. Abastecimento. Agropecuária brasileira em números. 2022.

MARTIN-ROMERA, J. D.; BORREGO-MARIN, E.; JABALERA-ORTIZ, P. J.; CARRARO, F.; FALCARO, P.; BAREA, E.; CARMONA, F. J.; NAVARRO, J. A. R. Organophosphate detoxification and acetylcholinesterase reactivation triggered by zeolitic imidazolate framework structural degradation. **ACS Applied Materials and Interfaces**, vol. 16, n° 8, p. 9900–9907, 2024. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c18855>.

MASIULIONIS, V. E.; SAMUELS, R. I. Investigating the biology of leaf-cutting ants to support the development of alternative methods for the control and management of these agricultural pests. **Agriculture (Switzerland)**, vol. 15, n° 6, p. 1-31, 2025. <https://doi.org/10.3390/agriculture15060642>.

MASSON, P.; LUSHCHEKINA, S. Conformational stability and denaturation processes of proteins investigated by electrophoresis under extreme conditions. **Molecules**, vol. 27, n° 20, p. 1-31, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27206861>.

MAURICE-LIRA, J. V.; ROMERO-NÁPOLES, J.; PÉREZ-CÁRCAMO, J.; MARTÍNEZ-CERÓN, D. M.; FLORES-MALDONADO, K. Y.; MORALES-RODRÍGUEZ, S.; PÉREZ-MORENO, J. Antimicrobial-producing microorganisms in fungus-farming ants: a critical review on insights into a natural biological defense with biotechnological potential. **Annals of the Entomological Society of America**, vol. 118, n° 1, p. 1–15, 2025. <https://doi.org/10.1093/aesa/saae035>.

MELO, T. S.; ANDRADE, B. S. Advancing rational pesticide development against *Drosophila suzukii*: bioinformatics tools and applications—a systematic review. **Journal of Molecular Modeling**, vol. 30, n° 9, p. 1-15, 2024. <https://doi.org/10.1007/s00894-024-06113-w>.

MENDONÇA, D. M. F. de; CAIXETA, M. C. S.; MARTINS, G. L.; MOREIRA, C. C.; KLOSS, T. G.; ELLIOT, S. L. Low virulence of the fungi *Escovopsis* and *escovopsioides* to a leaf-cutting ant-fungus symbiosis. **Frontiers in Microbiology**, vol. 12, p. 1-17, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673445>.

MICULAS, D. C.; NEGRU, P. A.; BUNGAU, S. G.; BEHL, T.; HASSAN, S. S. ul; TIT, D. M. Pharmacotherapy evolution in Alzheimer's disease: current framework and relevant directions. **Cells**, vol. 12, n° 1, p. 1-25, 2023. <https://doi.org/10.3390/cells12010131>.

MU, X.; YUAN, S.; ZHANG, D.; LAI, R.; LIAO, C.; LI, G. Selective modulation of alkali metal ions on acetylcholinesterase. **Physical Chemistry Chemical Physics**, vol. 25, n° 44, p. 30308–30318, 2023. <https://doi.org/10.1039/d3cp02887a>.

NAÇÕES UNIDAS. Objetivos de desenvolvimento sustentável. **Nações Unidas no Brasil**. .

NEHRU, R.; CHEN, C. W.; DONG, C. Di. A review of smart electrochemical devices for pesticide detection in agricultural food and runoff contaminants.

Science of the Total Environment, vol. 935, p. 1-16, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173360>.

NEISHABOORI, F. M.; SOHRABI, M. R.; MOTIEE, F.; DAVALLO, M. Optimization and modeling of simultaneous removal of reactive violet 5 and acid red 98 using bimetallic copper-zero-valent iron nanoparticles supported on biopolymer chitosan based on a central composite design and artificial neural network. **Journal of Polymers and the Environment**, vol. 33, n° 5, p. 2402–2424, 2025. <https://doi.org/10.1007/s10924-025-03538-z>.

NUNES, E. W.; SILVA, M. K. L.; RASCÓN, J.; LEIVA-TAFUR, D.; LAPA, R. M. L.; CESARINO, I. Acetylcholinesterase biosensor based on functionalized renewable carbon platform for detection of carbaryl in food. **Biosensors**, vol. 12, n° 7, p. 1-14, 2022. <https://doi.org/10.3390/bios12070486>.

OBAHA, A.; NOVINEC, M. Regulation of peptidase activity beyond the active site in human health and disease. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 24, n° 23, p. 1-24, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms242317120>.

OKAGU, I. U.; OKEKE, E. S.; EZEORBA, W. C. F.; NDEFO, J. C.; EZEORBA, T. P. C. Overhauling the ecotoxicological impact of synthetic pesticides using plants' natural products: a focus on *Zanthoxylum* metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 30, n° 26, p. 67997–68021, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27258-w>.

OUAAROUS, M.; EL FAKHOURI, K.; TAARJI, N.; BAOUCHI, A.; AMRI, M.; RAMDANI, C.; SOBEH, M.; MESFIOUI, A.; EL BOUHSSINI, M. Impact of field insect pests on seed and nutritional quality of some important crops: A comprehensive review. **ACS Omega**, vol. 10, n° 9, p. 8779–8792, 2025. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c08982>.

PANOZZO, A.; BOLLA, P. K.; BARION, G.; BOTTON, A.; VAMERALI, T. Phytohormonal regulation of abiotic stress tolerance, leaf senescence and yield response in field crops: A comprehensive review. **BioTech**, vol. 14, n° 1, p. 1-28, 2025. <https://doi.org/10.3390/biotech14010014>.

PEREIRA, F. M. V.; PEREIRA-FILHO, E. R. Application of free computational program in experimental design: A tutorial. **Quimica Nova**, vol. 41, n° 9, p. 1061–1071, 2018. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170254>.

PILETSKY, S. A.; BEDWELL, T. S.; PAOLETTI, R.; KARIM, K.; CANFAROTTA, F.; NORMAN, R.; JONES, D. J. L.; TURNER, N. W.; PILETSKA, E. V. Modulation of acetylcholinesterase activity using molecularly

imprinted polymer nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry B**, vol. 10, n° 35, p. 6732–6741, 2022. <https://doi.org/10.1039/d2tb00278g>.

PRIYA, A. K.; ALAGUMALAI, A.; BALAJI, D.; SONG, H. Bio-based agricultural products: a sustainable alternative to agrochemicals for promoting a circular economy. **RSC Sustainability**, vol. 1, n° 4, p. 746–762, 2023. <https://doi.org/10.1039/d3su00075c>.

RADIĆ, Z.; TAYLOR, P. Interaction kinetics of reversible inhibitors and substrates with acetylcholinesterase and its fasciculin 2 complex. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 276, n° 7, p. 4622–4633, 2001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006855200>.

RANTS'O, T. A.; VAN GREUNEN, D. G.; VAN DER WESTHUIZEN, C. J.; RILEY, D. L.; PANAYIDES, J. L.; KOEKEMOER, L. L.; VAN ZYL, R. L. The in silico and in vitro analysis of donepezil derivatives for *Anopheles* acetylcholinesterase inhibition. **PLoS ONE**, vol. 17, n° 11, p. 1-21, 2022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277363>.

REYNOSO-GARCÍA, M. F.; NICOLÁS-ÁLVAREZ, D. E.; TENORIO-BARAJAS, A. Y.; REYES-CHAPARRO, A. Structural bioinformatics applied to acetylcholinesterase enzyme inhibition. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 26, n° 8, p. 1-20, 2025. <https://doi.org/10.3390/ijms26083781>.

RODRIGUES, N. F. M.; NETO, S. Y.; LUZ, R. de C. S.; DAMOS, F. S.; YAMANAKA, H. Ultrasensitive determination of malathion using acetylcholinesterase immobilized on chitosan-functionalized magnetic iron nanoparticles. **Biosensors**, vol. 8, n° 1, p. 1-12, 2018. <https://doi.org/10.3390/bios8010016>.

SALAZAR, P. B.; DUPUY, F. G.; FIORI, M. C.; STANFIELD, S. M.; MCCORD, J.; ALTENBERG, G. A.; MINAHK, C. J. Nanodisc-associated acetylcholinesterase as a novel model system of physiological relevant membrane-bound cholinesterases. Inhibition by phenolic compounds. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, vol. 1866, n° 8, p. 1-10, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2024.184389>.

SANGALETI, C. T.; KATAYAMA, K. Y.; DE ANGELIS, K.; LEMOS DE MORAES, T.; ARAÚJO, A. A.; LOPES, H. F.; CAMACHO, C.; BORTOLOTO, L. A.; MICHELINI, L. C.; IRIGOYEN, M. C.; OLOFSSON, P. S.; BARNABY, D. P.; TRACEY, K. J.; PAVLOV, V. A.; CONSOLIM COLOMBO, F. M. The cholinergic drug galantamine alleviates oxidative stress alongside anti-inflammatory and cardio-metabolic effects in subjects with the metabolic

syndrome in a randomized trial. **Frontiers in Immunology**, vol. 12, p. 1-12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.613979>.

SANTOS, A. M. dos. Estudos bioquímicos e cinéticos de acetilcolinesterases de formigas cortadeiras (*Atta sexdens*). 2017. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/20.500.14289/13364>

SARAILOO, M.; AFSHARI, S.; ASGHARIAZAR, V.; SAFARZADEH, E.; DADKHAH, M. Cognitive impairment and neurodegenerative diseases development associated with organophosphate pesticides exposure: A review study. **Neurotoxicity Research**, vol. 40, nº 5, p. 1624–1643, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12640-022-00552-0>.

SARIĆ, M. M.; LJUBIČIĆ, M.; LAPČIĆ, I.; GUINÉ, R. P. F. Contribution of fruit, vegetables, whole cereals, and legumes to total fibre intake in adult *Croatian dalmatian* population. **Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, vol. 71, nº 2, p. 138–145, 2020. <https://doi.org/10.2478/aiht-2020-71-3305>.

SCHULZE-SYLVESTER, M.; SYLVESTER, F.; TORRES, V. M.; PARIS, C. I.; CORRONCA, J. A. Alien vs. herbivore: ant-mediated plant defense as an option for biological control of leafcutter ants. **Agronomy for Sustainable Development**, vol. 42, nº 5, p. 1-12, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13593-022-00826-z>.

SHAMAGSUMOVA, R. V.; VASYK, A. V.; SHURPIK, D. N.; EVTUGIN, V. G.; STOIKOV, I. I.; EVTUGIN, G. A. An Acetylcholinesterase sensor based on a pillar[6]arene–silver nanoparticle composite for the determination of drugs for the treatment of Alzheimer’s disease. **Journal of Analytical Chemistry**, vol. 77, nº 4, p. 429–438, 2022. <https://doi.org/10.1134/S1061934822040128>.

SHANG, H.; HE, D.; LI, B.; CHEN, X.; LUO, K.; LI, G. Environmentally friendly and effective alternative approaches to pest management: recent advances and challenges. **Agronomy**, vol. 14, nº 8, p. 1-18, 2024. <https://doi.org/10.3390/agronomy14081807>.

SHEKHAR, C.; KHOSYA, R.; THAKUR, K.; MAHAJAN, D.; KUMAR, R.; KUMAR, S.; SHARMA, A. K. A systematic review of pesticide exposure, associated risks, and long-term human health impacts. **Toxicology Reports**, vol. 13, p. 1-23, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2024.101840>.

SHI, W.; HAN, W.; LIAO, Y.; WEN, J.; ZHANG, G. Inhibition mechanism of fisetin on acetylcholinesterase and its synergistic effect with galantamine.

Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, vol. 305, p. 1-11, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.123452>.

SILVA, A.; RODRIGUES, A.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, vol. 162, n° 2, p. 115–119, 2006. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0037-6>.

SIMEONOVA, R.; ATANASOVA, M.; STAVRAKOV, G.; PHILIPOVA, I.; DOYTCHINOVA, I. Ex vivo antioxidant and cholinesterase inhibiting effects of a novel galantamine–curcumin hybrid on scopolamine-induced neurotoxicity in mice. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 23, n° 23, p. 1-11, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms232314843>.

SONGA, E. A.; AROTIBA, O. A.; OWINO, J. H. O.; JAHED, N.; BAKER, P. G. L.; IWUOHA, E. I. Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. **Bioelectrochemistry**, vol. 75, n° 2, p. 117–123, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.02.007>.

SUN, Y.; LIU, W. C.; SHI, X.; ZHENG, H. Z.; ZHENG, Z. H.; LU, X. H.; XING, Y.; JI, K.; LIU, M.; DONG, Y. S. Inducing secondary metabolite production of *Aspergillus sydowii* through microbial co-culture with *Bacillus subtilis*. **Microbial Cell Factories**, vol. 20, n° 1, p. 1-16, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01527-0>.

TAO, S.; GUO, Y.; WANG, S.; XU, F.; ZHOU, X.; GUO, Q. A sensitive and stable acetylcholinesterase biosensor with TiO₂ nanoparticles anchored on graphitic carbon nanofibers for determination of organophosphate pesticides. **Analytical Methods**, vol. 14, n° 24, p. 2396–2404, 2022. <https://doi.org/10.1039/d2ay00351a>.

TARAPARA, B.; DIVECHA, J. Practical efficient alpha: Encompassing all alphas of central composite design. **Communications in Statistics: Simulation and Computation**, vol. 52, n° 4, p. 1621–1629, 2023. <https://doi.org/10.1080/03610918.2021.1887234>.

TENG, H.; ZUO, Y.; JIN, Z.; WU, Y.; YANG, Y. Associations between acetylcholinesterase-1 mutations and chlorpyrifos resistance in beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 184, p. 1-7, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105105>.

THET TUN, W. S.; SAENCHOOPA, A.; DADUANG, S.; DADUANG, J.; KULCHAT, S.; PATRAMANON, R. Electrochemical biosensor based on

cellulose nanofibers/graphene oxide and acetylcholinesterase for the detection of chlorpyrifos pesticide in water and fruit juice. **RSC Advances**, vol. 13, n° 14, p. 9603–9614, 2023. <https://doi.org/10.1039/d3ra00512g>.

TU, H.; TANG, F.; YANG, H. Response of acetylcholinesterase to insecticides in *Reticulitermes chinensis* Snyder (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Entomological Science**, v. 56, n. 3, p. 343–348, 2021. <https://doi.org/10.18474/JES20-63>.

VANDEPUT, M.; PARSAJOO, C.; VANHEUVERZWIJN, J.; PATRIS, S.; YARDIM, Y.; LE JEUNE, A.; SARA KBI, A.; MERTENS, D.; KAUFFMANN, J. M. Flow-through enzyme immobilized amperometric detector for the rapid screening of acetylcholinesterase inhibitors by flow injection analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 102, p. 267–275, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.012>.

VARANDA-HAIFIG, S. S.; ALBARICI, T. R.; NUNES, P. H.; HAIFIG, I.; VIEIRA, P. C.; RODRIGUES, A. Nature of the interactions between hypocrealean fungi and the mutualistic fungus of leaf-cutter ants. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, vol. 110, n° 4, p. 593–605, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0826-y>.

VIDAL-ALBALAT, A.; KINDAHL, T.; RAJESHWARI, R.; LINDGREN, C.; FORSGREN, N.; KITUR, S.; TENGO, L. S.; EKSTRÖM, F.; KAMAU, L.; LINUSSON, A. Structure-activity relationships reveal beneficial selectivity profiles of inhibitors targeting acetylcholinesterase of disease-transmitting mosquitoes. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 66, n° 9, p. 6333–6353, 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00234>.

WANG, B.; LI, Y.; HU, H.; SHU, W.; YANG, L.; ZHANG, J. Acetylcholinesterase electrochemical biosensors with graphene-transition metal carbides nanocomposites modified for detection of organophosphate pesticides. **PLoS ONE**, vol. 15, n° 4, p. 1-16, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231981>.

WANG, Y.; DUAN, H.; YALIKUN, Y.; CHENG, S.; LI, M. A pendulum-type electrochemical aptamer-based sensor for continuous, real-time and stable detection of proteins. **Talanta**, vol. 266, p. 1-8, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125026>.

WEN, L.; WANG, J.; LIU, Z.; TAO, C. A.; RAO, J.; HANG, J.; LI, Y. A portable acetylcholinesterase-based electrochemical sensor for field detection of organophosphorus. **RSC Advances**, vol. 13, n° 10, p. 6389–6395, 2023. <https://doi.org/10.1039/d2ra05383g>.

XU, S.; LI, M.; HU, Z.; SHAO, Y.; YING, J.; ZHANG, H. The potential use of fungal co-culture strategy for discovery of new secondary metabolites. **Microorganisms**, vol. 11, n° 2, p. 1-16, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020464>.

YU, C.; LIU, Y.; FU, L.; SHU, Z.; DUAN, M.; ZHENG, Y. The effect of the allosteric regulation on the catalytic activity of fructosyltransferase studied via molecular dynamics simulations. **Physical Chemistry Chemical Physics**, vol. 27, n° 8, p. 4253–4262, 2025. <https://doi.org/10.1039/d4cp04131c>.

ZANZANA, K.; DANNON, E. A.; SINZOGAN, A. A.; TOFFA, J. M. Fall armyworm management in a changing climate: an overview of climate-responsive integrated pest management (IPM) strategies for long-term control. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, vol. 34, n° 1, p. 1-11, 2024. <https://doi.org/10.1186/s41938-024-00814-3>.

ZHU, R.; WU, C.; ZHA, J.; LU, S.; ZHANG, J. Decoding allosteric landscapes: computational methodologies for enzyme modulation and drug discovery. **RSC Chemical Biology**, vol. 6, n° 4, p. 539–554, 2025. <https://doi.org/10.1039/d4cb00282b>.

ANEXOS

Anexo 1

Gráficos contorno e superfície

Pythoon cod

```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

# Coeficientes do modelo (codificado)
b0 = X
b1 = Xv1
b2 = Xv2

# Intervalos reais das variáveis
V1_min, V1_max = 0.6, 2.2
V2_min, V2_max = 1, 9

# Função para codificar os valores reais para escala -2 a +2
def codify(x_real, x_min, x_max):
    return ((x_real - x_min) / (x_max - x_min)) * 4 - 2

# Geração da malha de valores reais para V1 e V2
V1_real = np.linspace(V1_min, V1_max, 100)
V2_real = np.linspace(V2_min, V2_max, 100)
V1_grid, V2_grid = np.meshgrid(V1_real, V2_real)

# Codificação dos valores
V1_cod = codify(V1_grid, V1_min, V1_max)
V2_cod = codify(V2_grid, V2_min, V2_max)

# Cálculo de z com os valores codificados
z = b0 + b1 * V1_cod + b2 * V2_cod

# Criando os gráficos
fig = plt.figure(figsize=(12, 6))
```

```

# Gráfico de superfície
ax1 = fig.add_subplot(1, 2, 1, projection='3d')
surf = ax1.plot_surface(V1_grid, V2_grid, z, cmap='viridis')
ax1.set_xlabel('V1 (mg/mL)')
ax1.set_ylabel('V2 (µg/mL)')
fig.colorbar(surf, ax=ax1, shrink=0.5, aspect=10)

# Gráfico de contorno
ax2 = fig.add_subplot(1, 2, 2)
contour = ax2.contourf(V1_grid, V2_grid, z, cmap='viridis')
# Adiciona o ponto (5.06, 20) com X
ax2.plot(1.8, 7, 'rx', markersize=10, label='Ponto (1.8, 7)')
ax2.set_xlabel('V1 (mg/mL)')
ax2.set_ylabel('V2 (µg/mL)')
ax2.legend()
fig.colorbar(contour, ax=ax2)

plt.tight_layout()
plt.show()

```

Observação: coeficientes do modelo (codificados) são os valores obtidos das equações 8, 11, 12, 13. Apartir da Equação 2.

*Anexo 2****Mapa de calor****Pynthon cod*

```
import numpy as np
import seaborn as sns
import matplotlib.pyplot as plt
from matplotlib.patches import Rectangle
import matplotlib.colors as mcolors
```

```
# =====
# CONFIGURAÇÕES GERAIS
# =====

plt.rcParams.update({
    'font.family': 'serif',
    'font.serif': 'Times New Roman',
    'mathtext.fontset': 'custom',
    'mathtext.rm': 'Times New Roman',
    'mathtext.it': 'Times New Roman:italic',
    'mathtext.bf': 'Times New Roman:bold',
    'axes.titlesize': 14,
    'axes.labelsizsize': 12
})

# =====
# DADOS E RÓTULOS
# =====

data = np.array([
    [56, 56, 51],
    [57, 58, 4],
    [67, 59, 29],
    [57, 42, 0],
    [61, 17, -12],
    [52, 60, 22],
    [61, 54, 27],
    [51, 45, 9],
    [40, 48, 15],
    [3, 2, 49]
], dtype=float)
```

```

labels = np.char.add(data.astype(int).astype(str), '%')

x_nomes = [r"$\it{As}$AChE-A", r"$\it{As}$AChE-B", r"$\it{Eel}$AChE"]
y_nomes = [
    r"$\it{Escovopsis}$",
    r"$\it{Exophiala\ dermatitidis}$",
    r"$\it{Exophiala\ spinifera}$",
    r"$\it{Phialophora\ attae}$",
    r"$\it{Phialophora\ capiguarae}$",
    r"$\it{Escovopsis\ +\ E.\ dermatitidis}$",
    r"$\it{Escovopsis\ +\ E.\ spinifera}$",
    r"$\it{Escovopsis\ +\ P.\ attae}$",
    r"$\it{Escovopsis\ +\ P.\ capiguarae}$",
    r"$\it{Galanthamine}$"
]

# =====
# CORES E NORMALIZAÇÃO
# =====

vmin = np.min(data)
vmax = np.max(data)
cmap = sns.color_palette("rocket_r", as_cmap=True) # <- Invertido
norm = mcolors.Normalize(vmin=vmin, vmax=vmax)

# =====
# FIGURA E HEATMAP
# =====

plt.figure(figsize=(12, 9)) # <- Mais largo agora, sem square
ax = sns.heatmap(
    data,
    annot=False,
    cmap=cmap,
    fmt="",
    linewidths=0,
    linecolor="black",
    xticklabels=x_nomes,
    yticklabels=True,
    cbar=True,
    norm=norm
)

```



```

# Aplicar rótulos Y com fonte menor
ax.set_yticklabels(
    y_nomes,
    fontsize=14,
    va='center',
    rotation=0
)

# =====
# ANOTAÇÕES DINÂMICAS
# =====
for i in range(data.shape[0]):
    for j in range(data.shape[1]):
        color_value = norm(data[i, j])
        text_color = "white" if color_value > 0.6 else "black"
        ax.text(
            j + 0.5,
            i + 0.5,
            labels[i, j],
            ha='center',
            va='center',
            fontsize=14,
            fontname='Times New Roman',
            color=text_color
        )

# =====
# BORDAS
# =====
for i in range(data.shape[0]):
    for j in range(data.shape[1]):
        ax.add_patch(
            Rectangle(
                (j, i), 1, 1,
                fill=False,
                edgecolor='black',
                linewidth=0.5,
                linestyle='-',
                joinstyle='round',
                alpha=0.7
            )
        )

```

```

    )
)

# =====
# FORMATAÇÃO FINAL
# =====

plt.xticks(
    rotation=0,
    ha='center',
    fontname='Times New Roman',
    fontsize=12
)

plt.title("Enzymatic Activity Inhibition", pad=20)
plt.xlabel("Enzymes", labelpad=10)
plt.ylabel("")

# Barra de cores
cbar = ax.collections[0].colorbar
cbar.ax.set_ylabel(
    'Inhibition (%)',
    rotation=270,
    labelpad=20,
    fontname='Times New Roman',
    fontsize=12
)

# Layout final
plt.tight_layout(pad=2.0)
plt.subplots_adjust(left=0.3)

# Exportar
plt.savefig("heatmap_final_legivel.png", dpi=600, bbox_inches='tight')
plt.show()

```