

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

**BIOSENSORES CONTENDO ACETILCOLINESTERASES DE FORMIGAS  
CORTADEIRAS PARA SCREENING DE POTENCIAIS INSETICIDAS  
NATURAIS**

**Sean dos Santos Araújo\***

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes

\*bolsista CAPES

São Carlos - SP

2024



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

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Sean dos Santos Araújo, realizada em 12/12/2024.

#### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. João Batista Fernandes (UFSCar)

Prof. Dr. Oldair Donizeti Leite (UTFPR)

Profa. Dra. Camila dos Anjos Proença (ISI-EQ)

Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho (UFSCar)

Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto (UNESP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

À Deus, que é meu auxílio.

À minha família que me incentivou até este momento.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente ao Santo Deus, que me sustentou desde o ano de 2016 quando cheguei a cidade de São Carlos. À Ele, minha eterna gratidão.

Aos meus pais, Eladil e Meire, pelo sustento financeiro e emocional em todo este período e por não medirem esforços para que eu alcançasse todos os objetivos nestes 8 anos de UFSCar.

À minha querida avó, Antônia, que sempre me desejou o melhor e sempre lembra de mim em suas orações. Às minhas irmãs e tio, Yasmim, Tuãne e Felipe, que completam a família que tanto amo.

Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes por toda sua orientação desde o início, ainda no Mestrado, compreensão e todo o investimento neste projeto e ensino na Química.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria pela co-orientação da tese durante todo o desenvolvimento da mesma e pela cessão de seu laboratório para que as pesquisas fossem desenvolvidas e também por estar sempre à disposição.

Aos amigos paraenses, André e Artur.

À Marcela Sita Longhin, minha companheira para vida. Minha imensa gratidão. Também minha mais sincera gratidão à dona Rita Malerba.

A todos os colegas do laboratório LABIE e PN. Ao Departamento de Química, corpo docente e administrativo. Aos órgãos de fomento: CNPq; FAPESP e CAPES; O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## LISTA DE ABREVIações

**A** Ampere

**AChE** Acetilcolinesterase

**ACh** Acetilcolina

**ATChI** Acetiltiocolina

**AuNPs-GSH** Nanopartículas de ouro decoradas com glutathione

**BuChE** Butirilcolinesterase

**BuCh** Butirilcolina

**CB** Carbamato

**CLAE** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**DPR** Desvio Padrão Relativo

**E** Potencial

**EDC** 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida

**g** gramas

**Glu** Glutamato

**His** Histidina

**HOBt** Hidroxibenzotriazol

**HPLC-MS** High Performance Liquid Chromatography- Mass Spectroscopy

**Hz** Hertz

**I** Corrente

**IBAMA** Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis

***I*<sub>p</sub>** Corrente de pico

***I*<sub>pa</sub>** Corrente de pico anódica

**I%** Porcentagem de inibição

**kDa** kiloDalton

**LD** Limite de Detecção

**LQ** Limite de Quantificação

**MES** Tampão ácido 2-etanossulfônico

**MET** Microscopia Eletrônica de Transmissão

**MEV** Microscopia Eletrônica de Varredura

**mg** miligramas

**mm<sup>2</sup>** milímetro ao quadrado

**mL** mililitros

**mmol** milimol

**mV** milivolts

**n** nano ( $10^{-9}$ )

**OF** Organofosforado

**PBS** Tampão Fosfato salínico (do inglês *Phosphate Buffer Saline*)

**PDDA** Cloreto de polidialildimetilamônio

**pH** Pontencial Hidrogeniônico

**Ser** Serina

**SWCNT** Single Walled Carbon Nanotube

**SPCE** Eletrodo de Carbono Serigrafado (do inglês *Screen-Printed Electrode*)

**SWV** Voltametria de onda quadrada (do inglês *Square Wave Voltametry*)

**Trp** Triptofano

**TW-20** Tween- 20

**V** volts

**VC** Voltametria Cíclica

**VOQ** Voltametria de Onda Quadrada

μ micro ( $10^{-6}$ )

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1. Os agroquímicos mais utilizados em 2022 no Brasil.....	4
TABELA 4.1- Desvio Padrão Relativo para intra e inter-dia de biossensores nas condições escolhidas para os testes de inibição.....	39
TABELA 4.2- Comparação do desempenho analítico de biossensores para detecção de malation. ....	46
TABELA 4.3- Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de <i>Atta sexdens</i> submetidas ao bioensaio com extratos vegetais diluídos em acetona. ....	53

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1- Estruturas químicas dos inseticidas mais utilizados no Brasil. 1- Acefato. 2- Clorpirifós. 3- Malation. 4- Metomil.....	5
FIGURA 1.2- Estrutura química geral de classes de pesticidas. 5- Estrutural geral dos OFs. 6- Estrutura geral dos Carbamatos.....	6
FIGURA 1.3- Distribuição geográfica de formigas cortadeiras do gênero <i>Atta</i> . Adaptado de (Barrera et al., 2022).....	8
FIGURA 1.4- Mecanismo de reação do sítio catalítico de AchE e o substrato ACh. Adaptado de (Araújo et al., 2016).....	14
FIGURA 3.1- Etapas de construção dos SPCEs.....	21
FIGURA 3.2- Etapas da reação de ativação dos grupos carboxilas das AuNPs-GSH através dos reagentes EDC e HOBT.....	24
FIGURA 4.1- A) Imagem de MEV de SPCE sem modificação. B) Imagem de MEV de PDDA/SPCE. C) Imagem de MEV de AuNP/PDDA/SPCE.....	29
FIGURA 4.2- A) Imagem de MET das AuNPs. B) Histograma de distribuição de tamanho das AuNPs. C) Gráfico de EDS das AuNPs. ....	30
FIGURA 4.3- Voltamogramas cíclicos de a) SPCE (linha preta), b) PDDA/SPCE (linha mostarda), c) AuNP/PDDA/SPCE (linha rosa), d) AChE B/AuNP/PDDA/SPCE (linha vermelha), e e) AChE A/AuNP/PDDA/SPCE (linha azul) em $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ C}_{11}\text{H}_{10}\text{FeO}_2$ . Velocidade de varredura: $0,1 \text{ V s}^{-1}$ . Intervalo de potencial: $-0,2 \text{ a } +0,8 \text{ V}$ . $[\text{AChE A and B}] = 1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . ....	31
FIGURA 4.5- Voltamogramas registrados do Bio-AChE A e B em diferentes concentrações de ATChI em PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4. $A= 50\text{mV}$ ; $f= 50\text{Hz}$ ; Tempo de reação: 10 minutos; $[\text{AChE A e B}] = 1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . ....	34

- FIGURA 4.6- Médias de correntes registradas do Bio-AChE A e B em diferentes concentrações de ATChI em PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4. A= 50mV; f= 50Hz; Tempo de reação: 10 minutos; [AChE A e B]= 1,5 µg mL<sup>-1</sup>. ..... 35
- FIGURA 4.7- Médias de correntes registradas do Bio-AChE A e B em diferentes concentrações das enzimas AChE A e AChE B imobilizadas nos biossensores. Correntes obtidas por VOQ em ATChI 3,8 mmol L<sup>-1</sup>, PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz. Tempo de reação= 10 min. .... 36
- FIGURA 4.8- Efeito na corrente de oxidação da tiocolina em função do valor de pH da solução de ATChI. Correntes obtidas por VOQ em ATChI 3,8 mmol L<sup>-1</sup>, PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup>. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz. Tempo de reação= 10 min. [AChE A e B]= 1,5 µg mL<sup>-1</sup>. ..... 38
- FIGURA 4.9- Efeito nas correntes de pico em relação ao tempo de estocagem dos biossensores de AChE A e AChE B. Correntes obtidas por VOQ em ATChI 3,8 mmol L<sup>-1</sup>, PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz. Tempo de reação= 10 min. [AChE A e B]= 1,5 µg mL<sup>-1</sup>. ..... 40
- FIGURA 4.10- A) Efeito nas correntes de pico em relação ao tempo de inibição do malation sobre os biossensores de AChE A e AChE B. B) Porcentagem de inibição enzimática através das médias de correntes obtidas. Correntes obtidas por VOQ em ATChI 3,8 mmol L<sup>-1</sup> em PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz. Tempo de reação= 10 min. [AChE A e B]= 1,5 µg mL<sup>-1</sup>. ..... 42
- FIGURA 4.11- A) Gráfico linear da concentração de malation versus a porcentagem de inibição da atividade da enzima AChE A. B) Gráfico linear da concentração de malation versus a porcentagem de inibição da atividade da enzima AChE B. Correntes obtidas por VOQ em ATChI 3,8 mmol L<sup>-1</sup> em PBS

0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0. Amplitude= 50 mV; $f$ = 50 Hz. Tempo de reação= 10 min. [AChE A e B]= 1,5 µg mL <sup>-1</sup> . .....	44
Figura 4.12- Porcentagem de inibição enzimática do extrato <i>S. lycocarpum</i> . Inibição calculada através das médias de correntes obtidas. Correntes obtidas por VOQ em ATChI 3,8 mmol L <sup>-1</sup> em PBS 0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0. Amplitude= 50 mV; $f$ = 50 Hz. Tempo de reação= 10 min. [AChE A e B]= 1,5 µg mL <sup>-1</sup> . .....	48
Figura 4.13- Porcentagem de inibição enzimática do extrato <i>Ocotea</i> sp. Inibição calculada através das médias de correntes obtidas. Correntes obtidas por VOQ em ATChI 3,8 mmol L <sup>-1</sup> , PBS 0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0. Amplitude= 50 mV; $f$ = 50 Hz. Tempo de reação= 10 min. [AChE A e B]= 1,5 µg mL <sup>-1</sup> . .....	50
Figura 4.14- Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens</i> submetidas à dieta controle com acetona e aos extratos diluídos em acetona .....	53

## RESUMO

BIOSSENSORES CONTENDO ACETILCOLINESTERASES DE FORMIGAS CORTADEIRAS PARA SCREENING DE POTENCIAIS INSETICIDAS NATURAIS. Algumas das pragas agrícolas mais significativas em danos e prejuízos são as formigas cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*). Estes insetos causam danos em áreas agrícolas e silviculturais, principalmente em monoculturas, como *Pinus*, *Eucalyptus*, *Gmelina* e *Citrus*. A aplicação de compostos químicos como organofosforados e carbamatos para o controle das formigas podem ter impacto negativo no meio ambiente e na saúde humana. Com base nisto, no presente trabalho foram desenvolvidos dois biossensores eletroquímicos baseados em acetilcolinesterases de formigas cortadeiras para a indicação de potenciais inibidores oriundos de extratos vegetais. Para o desenvolvimento dos biossensores, eletrodos foram serigrafados em folha de poliéster utilizando tintas à base de carbono e Ag/AgCl. A modificação da superfície do eletrodo de trabalho foi necessária para a imobilização das enzimas AChE A e AChE B por ligação covalente. A atividade enzimática foi detectada através da corrente de pico anódico referente ao produto da reação entre as AChEs e o substrato iodeto de acetiltiocolina (ATChI), a tiocolina (TCh). Após os estudos de otimização das condições para ambos os biossensores, os mesmos apresentaram respostas de atividades enzimáticas até o décimo terceiro dia após a imobilização das AChEs nos eletrodos. Os estudos de inibição com o organofosforado malation alcançaram limites de detecção de 9,1 nmol L<sup>-1</sup> para AChE A e 4,7 nmol L<sup>-1</sup> para AChE B. Desta forma, os extratos de *Solanum lycocarpum* e *Ocotea sp* foram aplicados para estudos de inibição e obtiveram perfis diferentes de atividade inibitória entre si e para cada enzima. O extrato de *Solanum lycocarpum* apresentou 80% de inibição frente a AChE A, sendo um extrato promissor para estudos futuros na busca de inseticidas naturais para formigas cortadeiras. Os biossensores desenvolvidos são uma nova ferramenta para a triagem de extratos com potenciais atividades inseticidas.

## ABSTRACT

BIOSENSORS CONTAINING ACETYLCHOLINESTERASES FROM LEAF-CUTTING ANT FOR SCREENING POTENTIAL NATURAL INSECTICIDES. Some of the agricultural pests most responsible for damage and losses are leaf-cutting ants (genus *Atta* and *Acromyrmex*). This insect causes damage in agricultural and forestry areas, mainly in monocultures, such as *Pinus*, *Eucalyptus*, *Gmelina* and *Citrus*. The application of chemical compounds such as organophosphates and carbamates to control ants can have a negative impact on the environment and human health. Based on this, in the present work, two electrochemical biosensors based on acetylcholinesterases from leaf-cutting ants were developed to detect potential inhibitors from plant extracts. For the development of the biosensors, the electrodes were screen-printed on polyester foil using carbon and Ag/AgCl-based inks. The modification of the surface of the working electrode was necessary for the immobilization of the enzymes AChE A and AChE B by covalent bonding. The enzymatic activity was detected through the peak current corresponding to the product of the occurrence between AChEs and the substrate acetylthiocholine iodide (ATChI), thiocholine (TCh). After the studies to optimize the conditions for both biosensors, they presented enzymatic activity responses up to the thirteenth day after the immobilization of AChEs on the electrodes. The inhibition studies with organophosphate malathion reached detection limits of 9.1 nmol L<sup>-1</sup> for AChE A and 4.7 nmol L<sup>-1</sup> for AChE B. Thus, the extracts of *Solanum lycocarpum* and *Ocotea* sp. were applied for inhibition studies and provided different inhibitory activity profiles between themselves and for each enzyme. The extract of *Solanum lycocarpum* obtained 80% inhibition against AChE A, being a promising extract for future studies in the search for natural insecticides for leaf-cutting ants. The developed biosensors are a new tool for screening extracts with potent insecticidal activities.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Controle de pragas na agricultura .....	1
1.2 Inseticidas e suas aplicações .....	4
1.3 Formigas cortadeiras.....	6
1.3.1 Manejo de formigas cortadeiras .....	9
1.4 Acetilcolinesterase.....	12
1.5 Biossensores eletroquímicos de acetilcolinesterase .....	15
2. OBJETIVO GERAL.....	18
2.1 Objetivos específicos.....	18
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	19
3.1 Materiais e reagentes utilizados .....	19
3.2 Equipamentos utilizados.....	19
3.3 Preparo das soluções.....	20
3.4 Construção dos microeletrodos descartáveis .....	20
3.5 Síntese das Nanopartículas de ouro .....	21
3.6 Extração e purificação de AChEs .....	22
3.6.1 Amostras biológicas .....	22
3.6.2 Purificação de enzimas .....	22
3.6.3 Concentração da enzima.....	22
3.6.4 Ensaio enzimáticos.....	23

3.7	Modificações e Imobilizações das Acetilcolinesterases nos eletrodos de trabalho .....	23
3.8	Caracterização das AuNPs, dos SPEs e otimização dos parâmetros para os bioensaios e estabilidade dos biossensores.....	25
3.9	Determinação da atividade inibitória.....	26
3.9.1	Tempo de incubação .....	26
3.9.2	Avaliação da atividade inibitória em função da concentração .....	26
3.10	Ensaio de inibição do crescimento <i>Atta sexdens</i> .....	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	29
4.1	Caracterização por MEV do eletrodo de trabalho dos biossensores e caracterização das AuNPs por MET .....	29
4.2	Caracterização por Voltametria Cíclica do SPCEs sem modificação e com modificação .....	31
4.3	Detecção da atividade enzimática pela resposta eletroquímica da tiocolina.....	32
4.4	Efeito da concentração da acetiltiocolina na resposta eletroquímica.....	34
4.5	Efeito da concentração das enzimas na resposta eletroquímica.....	36
4.6	Efeito do valor de pH na solução de ATChI na resposta eletroquímica e repetibilidade dos biossensores .....	37
4.7	Estudo de estabilidades dos biossensores de AChEs.....	40
4.8	Estudo de inibição e detecção do inseticida Malation .....	41
4.9	Estudo de inibição das acetilcolinesterases pelo extrato de <i>Solanum lycocarpum</i> .....	47

4.10	Estudo de inibição das acetilcolinesterases pelo extrato de <i>Ocotea</i> sp.	50
4.11	Toxicidade de extratos vegetais em operárias de <i>Atta sexdens</i> .....	52
5	CONCLUSÕES.....	56
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Controle de pragas na agricultura

As pragas agrícolas representam uma ameaça significativa para o setor do agronegócio, causando uma série de danos que impactam a produção e consequentemente, prejuízo financeiro. Os efeitos adversos das pragas podem ser observados em várias áreas como: redução na produção, qualidade dos produtos, custo financeiro para o uso intensivo de insumos químicos, desencadeamento de epidemias, impactos ambientais e ameaça à segurança alimentar (BARROS et al., 2019).

O Brasil enfrenta vários desafios relacionados a pragas agrícolas e epidemias que afetam diferentes culturas em todo o país. A diversidade climática e geográfica do Brasil contribui para a presença de uma variedade de pragas em diferentes regiões (HAMADA et al., 2015). Algumas das pragas agrícolas mais significativas incluem: Formigas cortadeiras (gênero *Atta* e *Acromyrmex*), Lagarta da Espiga do Milho (*Helicoverpa zea*), pulgão (Hemiptera, Aphididae), mosca branca (*Bemisia tabaci*), larva minadora (*Phyllocnistis citrella*), bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*), cigarrinha verde (*Empoasca kraemeri*) (SENSIX, 2024). Tratando-se das epidemias agrícolas pode-se mencionar: Requeima da batata (*Phytophthora infestans*), ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*), a murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* TR4) e *Xylella fastidiosa* (FAO, 2024).

No Brasil, o controle de pragas agrícolas é geralmente realizado por meio de uma abordagem integrada, conhecida como Manejo Integrado de pragas (MIP). Essa abordagem visa combinar diferentes métodos de controle para obter melhor eficácia, sustentabilidade e redução do impacto ambiental (EMBRAPA, 2024). Alguns dos principais tipos de controle de pragas agrícolas no Brasil são:

1. Controle Biológico: Neste tipo de manejo a premissa básica é controlar as pragas agrícolas e os insetos transmissores de doenças a partir do uso de seus inimigos naturais, que podem ser outros insetos benéficos, predadores, parasitoides, e microrganismos, como fungos, vírus e bactérias.

As vespas do gênero *Trichogramma* são um dos exemplos mais aplicados para o controle biológico de lagartas-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) que causam danos em lavouras de milho e traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*), uma das pragas mais comuns para as plantações de tomate (ALINE et al., 2015; ROBERTO; PARRA, [s.d.]). Nesta aplicação, a vespa parasita os ovos do inseto-praga antes da eclosão, desta forma controla a praga antes que sejam causados danos à cultura (PARRA; ZUCCHI, 2004).

2. Controle Cultural: Refere-se à manipulação do sistema de produção agrícola ou das práticas culturais para reduzir ou eliminar as populações de pragas. As práticas de controle cultural podem variar desde conceitos simples, como o ajuste das datas de plantação para evitar infestações de pragas, até abordagens mais complexas de paisagismo agrícola que podem incluir o ajuste da disposição espacial e temporal de um agroecossistema (WALGENBACH, 2018).

Cure e colaboradores analisaram a colheita de café no estado do Paraná e com base em seus dados, concluíram que a colheita periódica de frutas e a limpeza foram as principais práticas de controle que reduziram os níveis de infestação pelo inseto broca-do-café (*Hypothenamus hampei*) (CURE et al., 2020). Acrescentaram também que a eficácia da prática diminui à medida que o tempo entre as colheitas e a limpeza aumenta de 15 para 60 dias.

3. Controle genético: Esta técnica agrícola de controle populacional de pragas é realizada por meio de manipulação de genomas. Por exemplo, a liberação de insetos geneticamente modificados e estéreis, para afetar e reduzir a capacidade reprodutiva da praga que se deseja controlar (CHBAGRO, 2024).

A Biofábrica Moscamed Brasil trabalha nesta linha de controle de pragas, produzindo machos estéreis da mosca-do-mediterrâneo (*Ceratitis capitata*) que ataca principalmente culturas de goiaba, acerola, manga e pêssego (Moscamed, 2024).

4. Controle Varietal: Também conhecido como método de resistência de plantas, está entre os pilares do MIP e possui alta compatibilidade com os outros métodos de controle de pragas. Essa abordagem é uma forma de controle genético, mas em vez de envolver técnicas de modificação genética, foca na seleção de variedades naturais que exibem resistência a agentes prejudiciais (CHBAGRO, 2024).

Silva e colaboradores avaliaram a resistência de dez espécies do gênero *Eucalyptus* frente a doença da ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii*, onde o híbrido das espécies *urophylla* e *grandis* apresentou menor número médio de pústulas por folíolo, valores menores de área abaixo da curva do progresso da doença, obtendo assim uma maior resistência à ferrugem (SILVA; AZEVEDO; POLTRONIERI, 2014).

5. Controle comportamental: O controle comportamental de pragas envolve o uso de estratégias que exploram os comportamentos naturais das pragas para reduzir seus impactos nas culturas agrícolas. Para se comunicar, os insetos utilizam feromônios, substâncias químicas produzidas e percebidas por indivíduos de uma mesma espécie. A utilização de substâncias sintéticas análogas aos feromônios é útil na detecção, no monitoramento e no controle de insetos-praga (MIRANDA, 2010).

Para o controle do besouro bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*), praga de plantações de algodão, é utilizado um dispositivo que atrai o inseto através de um dispersor de feromônio que apresenta um sistema de liberação lenta de inseticida. Os tubos são instalados nas bordas das áreas com algodão, nas fases pré-plantio e pós-colheita, proporcionando elevada mortalidade aos adultos de bicudo (MIRANDA, 2010).

6. Controle Químico: Este é o controle mais comum e o mais aplicado em áreas agrícolas, sendo uma prática que envolve o uso de produtos químicos, como pesticidas e inseticidas, para controlar ou reduzir as populações de pragas que podem causar danos às culturas (AGRIQ, 2024). Dependendo da praga/organismo a ser controlada, os compostos químicos podem ser: Inseticidas, Fungicidas, Herbicidas, Acaricidas e Nematicidas.

Os inseticidas atuam sobre os insetos nocivos às lavouras, diminuindo a sua população e o seu potencial de dano (WARE, 1989). Os fungicidas são usados para o controle de doenças de plantas causadas por fungos, bactérias ou algas (GARCIA, 1999). Os herbicidas são aplicados para eliminar ou controlar o crescimento de plantas invasoras nos cultivos comerciais (ROMAN et al., 2007). Os menos aplicados em solo brasileiro são os nematicidas, que combatem os nematoides e os acaricidas, que atuam como barreiras contra os ataques de ácaros que afetam as plantações (SOUZA, 2023).

## 1.2 Inseticidas e suas aplicações

O mercado de agrotóxicos continua a crescer no Brasil devido ao aumento da área de plantio nos últimos anos. Um estudo realizado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) revelou que a venda de ingredientes ativos de produtos formulados (pesticidas que chegam aos produtores), incluindo produtos químicos, foi de 800.652 toneladas (IBAMA, 2022).

Dados do ano de 2022 pelo IBAMA mostram que a aplicação de agroquímicos do tipo Inseticida alcançaram o uso de aproximadamente 88.000 toneladas de ingrediente ativo (ton.IA), o que representa pouco mais de 11% do uso total de agroquímicos considerando sua aplicação individual. Conforme a Tabela 1, pode-se verificar a porcentagem de aplicação de cada classe de agrotóxicos em solo brasileiro:

TABELA 1. Os agroquímicos mais utilizados em 2022 no Brasil.

<b>Ranking</b>	<b>Classe de Uso</b>	<b>Quantidade (ton.IA)</b>	<b>Percentual (%)</b>
1	Herbicida	492.350,20	61,49
2	Fungicida	128.511,78	16,05
3	Inseticida	88.827,00	11,09
4	Inseticida, Acaricida	28.266,15	3,53
5	Fungicida, Acaricida	21.375,58	2,67
-	Outros		5,16
	<b>Total</b>		<b>100</b>

Fonte: IBAMA, 2022.

Dos dez ingredientes ativos mais vendidos e usados no Brasil, quatro possuem ação inseticida, sendo (nomes comerciais): acefato, malation, clorpirifós e o metomil (Figura 1.1). Os outros mais vendidos são: glifosato, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-d), mancozeb, clorotanilil, atrazin e dibrometo de diquate (RELATÓRIOS DE COMERCIALIZAÇÃO DE AGROTÓXICOS — IBAMA, [s.d.]).

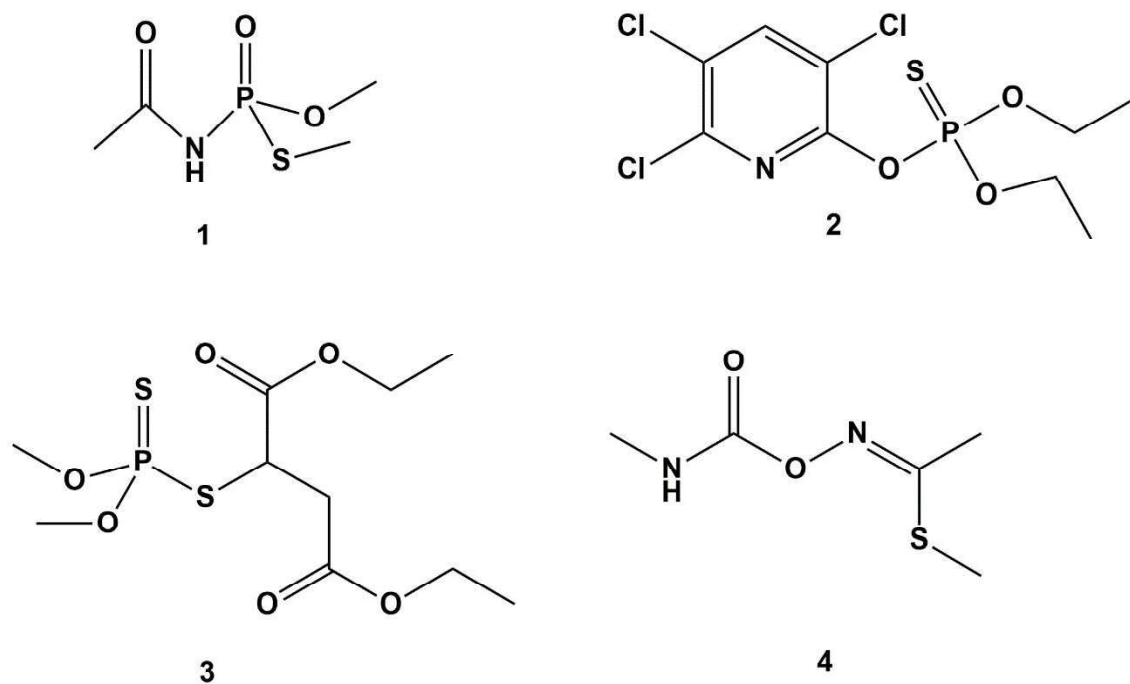


FIGURA 1.1- Estruturas químicas dos inseticidas mais utilizados no Brasil. 1- Acefato. 2- Clorpirifós. 3- Malation. 4- Metomil.

Os compostos acefato, clorpirifós e malation pertencem a classe de pesticidas denominados organofosforados (OF), que são compostos com pelo menos uma ligação P-C, uma ligação relativamente forte, difícil de ser clivada (BARBOZA; NASCIMENTO; OTNIEL, 2018). De forma geral, a estrutura de um OF é composta por um átomo central de fósforo (P) e uma ligação característica que envolve um grupo fosforila (P = O), um grupo tiofosforila (P = S) ou um grupo selenofosforila (P=Se) (Figura 1.2) (STOYTCHIEVA, 2011).

O composto metomil pertence a classe de pesticidas dos carbamatos (CB), que são compostos de sais ou ésteres de ácido carbâmico,  $H_2NC(=O)OH$ , ou de ácidos carbâmicos N-substituídos  $R_2NC(=O)OR'$ , sendo  $R'$  um grupo amida ou um cátion) (Figura 1.2) (MATOŠEVIĆ; BOSAK, 2020).

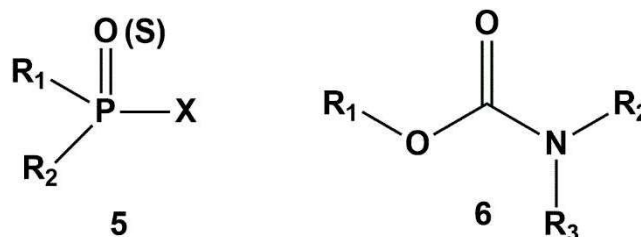


FIGURA 1.2- Estrutura química geral de classes de pesticidas. 5- Estrutural geral dos OFs. 6- Estrutura geral dos Carbamatos.

Os quatro inseticidas citados possuem uma ampla aplicação de controle de pragas, nos quais os alvos mais comuns são: formiga, mosca branca, lagarta da espiga do milho, cigarrinha verde e pulgões (AGROLINK, 2024). Apesar de pertencerem a duas classes diferentes, o mecanismo de ação destes compostos é o mesmo: inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE), uma enzima especificamente responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) no sistema nervoso, como resultado há um acúmulo de acetilcolina (ACh) nas junções sinápticas, o que gera estimulação excessiva, causando assim toxicidade e morte daquele organismo (SILBERMAN; TAYLOR, 2018).

Apesar de serem usados amplamente para fins agrícolas, estes compostos apresentam riscos à saúde humana. Os OFs possuem alto nível de lipossolubilidade, o que favorece a acumulação destes compostos no organismo humano (MOREAU; SIQUEIRA, 2015). Já os carbamatos apresentam lipossolubilidade inferior aos OFs e baixa solubilidade em água, não possuem a capacidade de acumulação nos tecidos gordurosos, e sua concentração tende a ser maior nos órgãos envolvidos na sua biotransformação, como por exemplo, o fígado. Por apresentar maior instabilidade que os OF, são menos persistentes no organismo e no meio ambiente, tendo uma taxa de degradação maior (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

### 1.3 Formigas Cortadeiras

As formigas cortadeiras são insetos eussociais, ou seja, apresentam uma estrutura social altamente desenvolvida, manifestando relações ecológicas (TOLEDO et al., 2016). Sua estrutura complexa é caracterizada por um comportamento social organizado, cultivo de um jardim de fungos e altos níveis

de higiene, o que dificulta o manejo de formigas cortadeiras em comparação com outros insetos (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014).

A organização social e a complexidade das formigas cortadeiras são em grande parte responsáveis pelo forte colonialismo observado entre esses insetos. A colônia se torna um grande organismo com uma rainha de vida longa. A rainha é a principal responsável pela formação da colônia e pela sua capacidade de sobreviver e se reproduzir. O resto da colônia é formado por descendentes. Machos e fêmeas alados deixam a colônia para formar novas colônias, que também incluem formigas operárias (como unidades individuais) que realizam diversas tarefas dentro da colônia (monitorização, cuidados com as rainhas, alimentação, cuidados com as colônias e eliminação de resíduos) (DELLA LUCIA; SOUZA, 2011).

O cultivo de jardim de fungos como fonte de alimento é particularidade da família Myrmicine, tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae) (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). Enquanto os gêneros inferiores da tribo usam substratos variados para este tipo de cultivo, os gêneros superiores cultivam fungos em vegetação recentemente cortada, o que explica porque são amplamente conhecidas como formigas cortadeiras e pensa-se que atingiram o auge do instinto através da agricultura (DELLA LUCIA; SOUZA, 2011).

O fungo cultivado por essas formigas, *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Agaricales, Agaricaceae), é o parceiro simbiótico de diversas espécies da tribo Attini, cujo desenvolvimento ocorre no consumo de material vegetal fresco no interior dos ninhos para formar os jardins de fungos. O fungo produz enzimas que degradam os polissacarídeos das folhas em nutrientes assimiláveis pelas formigas. Entre esses nutrientes, a glicose produzida a partir de material vegetal no jardim de fungos parece ser a principal fonte de alimento das formigas, juntamente com proteínas e aminoácidos (EHDIABADI; CHULTZ, 2009).

As formigas cortadeiras são nativas da região Neotropical e pertencem a dois gêneros: *Atta* e *Acromyrmex* (BRANDÃO; MAYE-NUNES; SANHUDO, 2011). Estes dois gêneros têm ampla ocorrência no continente americano, desde o sul dos Estados Unidos, Nicarágua na América Central, até a Argentina (Figura 1.3) (BARRERA et al., 2022).



FIGURA 1.3- Distribuição geográfica de formigas cortadeiras do gênero *Atta*. Adaptado de (BARRERA et al., 2022).

As formigas cortadeiras causam danos em áreas agrícolas e silviculturais, principalmente em monoculturas, como *Pinus*, *Eucalyptus*, *Gmelina* e *Citrus* (VASCONCELOS; CHERRETT, 1997). Plantas com idade entre 1 e 3 anos são os principais alvos dessas formigas e assim, desfolhadas, causando danos irreversíveis, já que as mudas são novas e frágeis (VASCONCELOS; CHERRETT, 1997), causando perdas significativas de produtividade (ZANETTI et al., 2003b, 2003a). A desfolha afeta o crescimento das plantas porque o aumento do diâmetro depende do nível atual de fotossíntese, que é reduzido pela perda de folhas (MATRANGOLO et al., 2010). Além disso, observa-se menor efeito na perda de altura, uma vez que o crescimento está relacionado às reservas vegetais.

As formigas do gênero *Acromyrmex* podem chegar ao consumo diário de folhas de *Eucalyptus* de 22,0 e 38,8 g dependendo da colônia, desfolhando entre nove e dezesseis mudas diariamente (DE CASTRO MORAIS; DOS ANJOS; DELLA LUCIA, 2011). Plantas de *Pinus taeda* Linnaeus (Pinaceae) apresentaram perdas de 20% em diâmetro e 13,3% em altura devido à severa desfolha após o primeiro mês de plantio (REIS FILHO et al., 2011). Grandes

perdas causadas por formigas cortadeiras também ocorrem em outras culturas, como cacau, café, cana, dendê e pastagens (MONTROYA-LERMA et al., 2012). Por estes danos, o manejo das formigas cortadeiras é essencial para o agronegócio brasileiro (DE BRITTO et al., 2016).

### 1.3.1 Manejo de formigas cortadeiras

Os métodos de controle de formigas cortadeiras envolvem abordagens físicas, biológicas e químicas (VINHA et al., 2020). Métodos de controle físico são usados principalmente em pequenas áreas com ninhos superficiais de formigas cortadeiras (ZANETTI et al., 2014).

Este método envolve procedimentos como a remoção de rainhas através da escavação de estruturas recém-formadas e a prevenção do crescimento de colônias (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). Assim sendo, é importante levar em conta a profundidade do ninho e a sazonalidade do voo nupcial antes de optar por esse método, quando as rainhas estão a cerca de 20 cm de profundidade no solo (ZANETTI et al., 2014). A remoção das camadas superficiais dos ninhos e a adição de compostos orgânicos e inorgânicos também pode ser feita como parte do manejo integrado. Barreiras físicas, tais como fitas plásticas com graxa, cilindros plásticos e tiras de plástico ou metal fixadas no tronco da árvore, têm alguma eficácia em plantações de pequeno porte, mas requerem manutenção constante (MORESSI et al., 2007). Além da inviabilidade desses métodos em grandes áreas, eles não impedem a recuperação de colônias de formigas cortadeiras (BOULOGNE; OZIER-LAFONTAINE; LORANGER-MERCIRIS, 2014).

O controle biológico de formigas cortadeiras é uma abordagem que utiliza organismos vivos para reduzir ou controlar a população dessas formigas consideradas pragas. A aplicação deste tipo de controle é geralmente incentivado devido à sua racionalidade, sustentabilidade e respeito ao meio ambiente (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). O fungo patogênico *Beauveria bassiana* para infectar operárias das colônias, e o *Trichoderma* spp. como antagonista do fungo simbiótico, mostraram resultados promissores em condições de laboratório (FOLGARAIT et al., 2011; VERZA et al., 2006).

No entanto, os resultados laboratoriais geralmente obtidos com estes patógenos não são comprovadamente altamente eficientes em nível de campo

(DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014), pois em muitas condições naturais, as formigas associadas ao seu fungo simbiótico são capazes de detectar e se recuperar da infecção por agentes patogênicos (DE BRITTO et al., 2016; MONTOYA-LERMA et al., 2012). Um dos principais mecanismos de defesa das formigas é a liberação de secreções glandulares antifúngicas (MOTA FILHO et al., 2021). Essas secreções são produzidas e liberadas pelas glândulas metapleurais das formigas, que contêm compostos que impedem a germinação do patógeno e atuam como antibiótico, protegendo o organismo contra patógenos (MORGAN, 2008).

As moscas da família Phoridae compõem o principal grupo de agentes parasitoides de controle biológico para as formigas cortadeiras (DELLA LUCIA, 2011). Esses parasitoides põem seus ovos em operárias forrageiras que transportam folhas ao longo da trilha ou enquanto essas operárias cortam fragmentos de folhas (BRAGANÇA; TONHASCA JR; DELLA LUCIA, 2009; ELIZALDE; FOLGARAIT, 2012). No entanto, as formigas não são hospedeiras passivas e exibem uma resposta generalizada a ataques de forídeos (ELIZALDE; FOLGARAIT, 2012). Além disso, é pouco provável que o ataque de tais inimigos naturais suprima a colônia, o que é a mesma deficiência partilhada por outros agentes de biocontrole de formigas cortadeiras.

Os métodos químicos para controle de formigas cortadeiras são os mais comumente empregados, com o produto químico tóxico sendo utilizado diretamente nos ninhos, nas formulações de pó, fumigação, termonebulização e/ou iscas granuladas, aplicadas nas proximidades das colônias (MOTA FILHO et al., 2021).

A aplicação de formulações em pó seco é realizada bombeando o inseticida para dentro do ninho através de sua abertura principal e orifícios ativos. Compostos da classe dos organofosforados, carbamatos e particularmente piretróides têm sido usados como pó seco para fornecer controle eficiente sob condições ambientais secas e contra ninhos pequenos e rasos (DELLA LUCIA; ARAÚJO, 2000). Estruturas de ninhos profundas e complexas, como geralmente observadas em ninhos maduros do gênero *Atta*, não são completamente atingidos por esta prática, uma vez que o pó não alcança câmaras mais protegidas que abrigam a rainha, sua ninhada e as operárias menores que

cuidam desses insetos, não conseguindo assim suprimir a colônia (BOARETTO; FORTI, 1997).

O uso de fumigantes (inseticida em estado gasoso), principalmente brometo de metila, era frequentemente empregado contra formigas cortadeiras (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). O composto era aplicado diretamente no ninho (novamente por meio de orifícios abertos e ativos), passando de líquido para gás após a liberação de pressão. Na forma de gás, o composto é capaz de se espalhar por todo o ninho, causando assim sua supressão. Tratava-se de um produto eficaz no controle de formigas cortadeiras, contudo de elevado custo, exigia mão-de-obra especializada para aplicação, sendo de alta periculosidade ao aplicador e por isso seu uso foi descontinuado (BOARETTO; FORTI, 1997; MARSARO et al., 2004).

A termonebulização é a produção de uma fumaça tóxica aplicada diretamente nos orifícios do ninho por meio da queima de querosene ou óleo diesel, a qual libera também o formicida (DONATO et al., 2021). Para suprimir colônias grandes (com mais de 10 m<sup>2</sup> de diâmetro superficial), tal técnica requer a aplicação de névoa nas aberturas ativas do ninho até que o ninho esteja saturado (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). Este método interrompe imediatamente as atividades da colônia, sendo indicado, principalmente para as de grande porte e em áreas com grande número de colônias (BARBOSA et al., 2023).

As iscas são mais práticas, econômicas e operacionais para o controle dessa praga. As iscas usam um ingrediente ativo atraente, como pellets de polpa cítrica desidratada e outros materiais orgânicos que atuam como transportadores (CATALANI et al., 2019). As iscas são distribuídas perto das trilhas das formigas e aberturas dos ninhos; a quantidade de isca é baseada no tamanho do ninho, e as formigas pegam os grânulos e os introduzem no ninho (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). As iscas colhidas são levadas para o ninho, contaminando assim o jardim de fungos e supostamente também as operárias menores quando elas manuseiam o fungo, o que causa sua eventual morte dentro de poucos dias (ZANETTI et al., 2004). A sulfluramida e o fipronil são os principais compostos atualmente utilizados em larga escala como iscas para o controle de formigas cortadeiras (CATALANI et al., 2019).

## 1.4 Acetilcolinesterase

Pertencente à família das colinesterases (ChEs), a AChE é uma hidrolase de ésteres carboxílicos, ou seja, enzimas que decompõem ésteres de colina (LIONETTO et al., 2013). A classe das colinesterases inclui a AChE que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina (ACh) e a enzima pseudocolinesterase, ou butirilcolinesterase (BChE), que decompõem o substrato butirilcolina (BCh) (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).

A AChE é encontrada principalmente nas junções neuromusculares e nas sinapses colinérgicas do sistema nervoso central (TRANG; KHANDHAR, 2019). Nestes locais, após a ativação dos receptores de acetilcolina na membrana pós-sináptica, a AChE hidrolisa a acetilcolina em colina e acetato (MCHARDY et al., 2017). A atividade da AChE serve para encerrar a transmissão sináptica, evitando disparos nervosos contínuos nas terminações nervosas. Portanto, é essencial para o funcionamento normal do sistema nervoso central e periférico.

Além de suas funções neuronais clássicas, numerosos estudos estabeleceram que a AChE pode desempenhar outras funções não clássicas em vertebrados, incluindo neuritogênese, adesão celular, sinaptogênese, ativação de neurônios dopaminérgicos, montagem de fibras amilóides, hematopoiese e trombopoiese (BALLARD et al., 2005; OLIVERA; RODRIGUEZ-ITHURRALDE; HENLEY, 2003; SOREQ; SEIDMAN, 2001).

Em insetos, a AChE tem sido extensivamente estudada por sua principal função na neurotransmissão, uma vez que é o principal alvo para inseticidas anticolinesterásicos (organofosforados e carbamatos) (TOUTANT, 1989). A inibição da AChE por inseticidas das classes organofosforados e carbamatos acumula ACh na lacuna sináptica e causa dessensibilização do receptor de ACh, levando ao bloqueio da transmissão do sinal e a morte do inseto (KONO; TOMITA, 2006).

A AChE de inseto é geralmente uma proteína globular homodimérica, na qual estas subunidades diméricas estão ligadas covalentemente por uma ligação dissulfeto (KIM et al., 2010; KONO; TOMITA, 2006). A primeira estrutura tridimensional de AChE elucidada foi a do peixe elétrico *Torpedo californica*, para a AChE de inseto, a primeira estrutura caracterizada foi a de mosca-da-fruta

*Drosophila melanogaster*, ambas obtidas por difração de raios-X (SUSSMAN et al., 1991).

Segundo Dos Santos (DOS SANTOS et al., 2019), apesar da identidade sequencial entre a AChE do *Torpedo californica* e de *Drosophila melanogaster* ser somente de 36%, ambas as estruturas enzimáticas se enovelam de maneira semelhante e o sítio catalítico se sobrepõem de maneira efetiva. O sítio ativo fica perto do fundo de um desfiladeiro profundo e estreito (também chamado de bolso catalítico) que alcança a metade da proteína. O desfiladeiro é revestido com 14 resíduos aromáticos altamente conservados que têm um papel na facilitação da difusão do substrato para o sítio ativo. Há uma tríade catalítica: Glutamato (Glu), Histidina (His) e Serina (Ser), com distâncias de ligação de hidrogênio apropriadas e alinhamento no sítio ativo.

Após entrada do substrato no centro catalítico e devida orientação de resíduos de aminoácidos como Glu e Triptofano (Trp) do subsítio aniônico, a ACh será hidrolisada pelos resíduos de Ser e His. A His funciona como um catalisador ácido-base, e a Ser, age como um nucleófilo.

Quando a ACh chega ao sítio ativo da AChE, a carbonila do neurotransmissor é atacada pelo par de elétrons hidroxila do resíduo Ser. A His então atua como base e remove o próton do íon hidroxônio formado. A His protonada atua como um ácido e protona o grupo colina da ACh, que é então liberada. Devido à perda do grupo colina, a AChE fica acetilada e então é hidrolisada com uma molécula de água (H<sub>2</sub>O), que atua como um nucleófilo para então produzir ácido acético e deixar livre o resíduo de Ser para que a enzima recupere sua atividade (Figura 1.4).

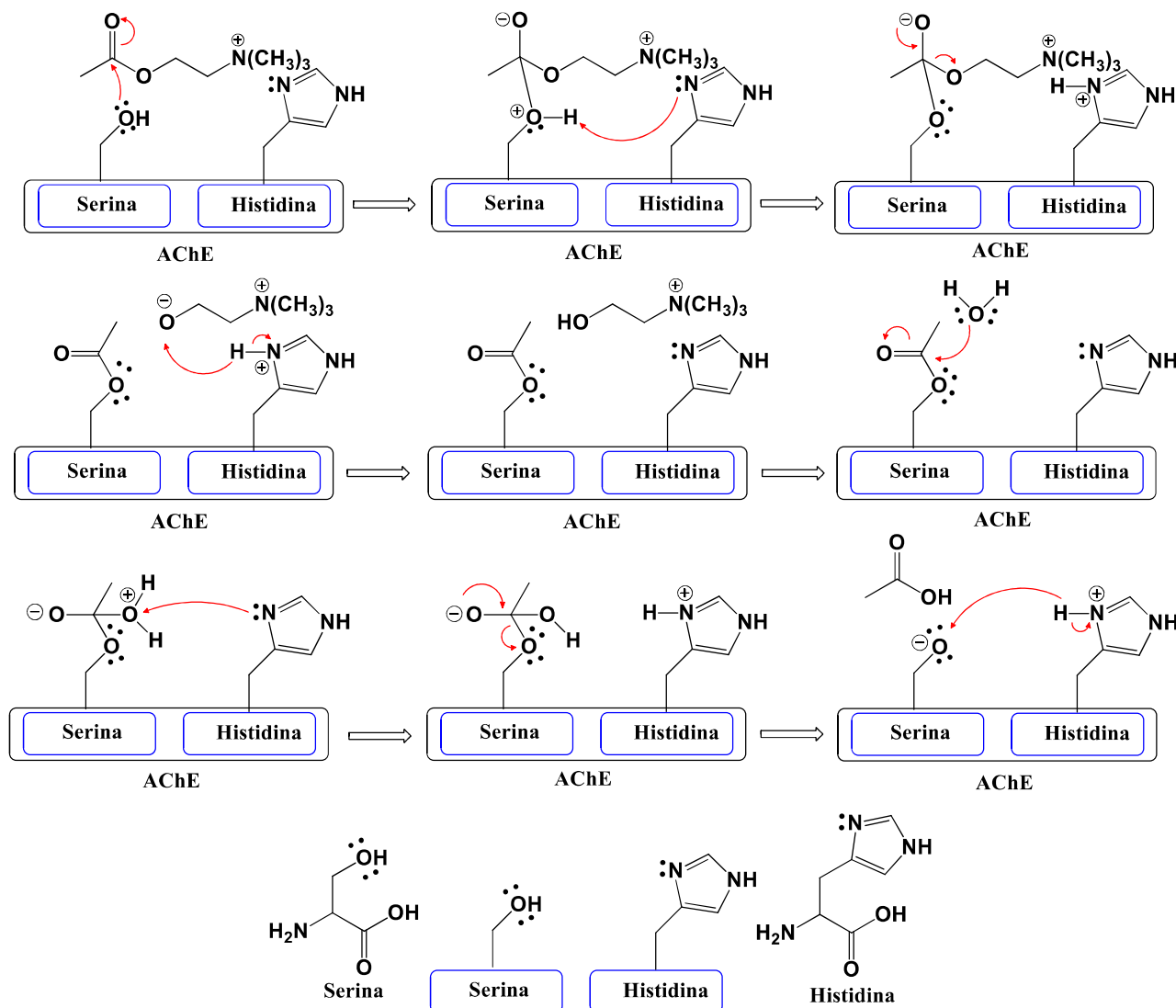


FIGURA 1.4- Mecanismo de reação do sítio catalítico de AChE e o substrato ACh. Adaptado de Araújo *et al.* (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016)

AChE é codificada pelo gene *ace*. Muitas espécies de insetos tem dois tipos de genes *ace* (*ace1* e *ace2*, codificando AChE1 e AChE2, respectivamente) (KIM; LEE, 2013), enquanto as espécies na subordem Cyclorrhapha de Diptera, como *Drosophila melanogaster* e *Musca domestica*, possuem apenas um único gene *ace2* (HUCHARD *et al.*, 2006).

Em muitas espécies de insetos com os dois genes *ace*, a AChE1 é a principal enzima sináptica e desempenha um papel predominante na transmissão do sinal colinérgico (JIANG *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2012a; KIM; LEE, 2013). Em contraste, é proposto que as AChE2 nessas espécies possuem uma função colinérgica mais limitada, mas outras funções não colinérgicas, como

regular o desenvolvimento do embrião, o crescimento larval e a capacidade motora; influenciar a postura e a eclosão dos ovos; e até mesmo afetar o fenótipo (HE; SUN; LI, 2012; KUMAR; GUPTA; RAJAM, 2009; LU et al., 2012; REVUELTA et al., 2009).

Dos Santos e colaboradores isolaram, purificaram e caracterizaram duas AChE nativas de formiga cortadeira *Atta sexdens* (AsAChE-A e AsAChE-B), sendo a AsAChE-A a principal enzima envolvida na hidrólise de acetilcolina nas sinapses (DOS SANTOS et al., 2019). Observou-se ainda que a AsAChE-B é um monômero de aproximadamente 66 kDa e a AsAChE-A um dímero de 132 kDa.

A existência destes dois genes ace em insetos e a diferença de funções no organismo entre AChE1 e AChE2 têm atraído cada vez mais atenção para o estudo de seus papéis na resistência a inseticidas e como alvos para o desenvolvimento de inseticidas seguros para humanos e ecologicamente mais seguros (LANG; YAN ZHU; ZHANG, 2012; PANG et al., 2012).

## **1.5 Biossensores eletroquímicos de acetilcolinesterase**

Para bioensaios de acetilcolinesterase, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), ensaios colorimétricos e biossensores baseados em fluorescência são métodos comumente empregados (BHATTU; VERMA; KATHURIA, 2021). A CLAE, embora adequada, enfrenta desafios como altos custos, tempo longo de análise e a necessidade de treinamento especializado (SONGA et al., 2009).

Os métodos colorimétricos baseados no reagente de Ellman são aplicados na medição indireta da atividade da AChE, podendo levar a resultados falso-positivos e negativos (DE LIMA et al., 2019). Os biossensores baseados em fluorescência têm limitações, exigindo altas concentrações de fluoróforos, possivelmente levando à extinção devido à agregação (BHATT et al., 2021).

Conseqüentemente, os sensores eletroquímicos são amplamente utilizados para detectar organofosforados e carbamatos devido ao seu custo, seletividade e sensibilidade. O desenvolvimento de eletrodos descartáveis é a principal alternativa diante do maior viés de eletrodos sólidos, a regeneração da superfície (NASCIMENTO; ANGNES, 1998). As vantagens destes também são a fácil construção, baixo custo, boa reprodutibilidade, aplicação de microvolumes de reagentes e ainda podem ser produzidos em larga escala.

As principais técnicas para a construção de eletrodos descartáveis são: impressão por jato de tinta, placas de circuito impresso recobertas com cobre, transferência por estampagem (*stamped transfer electrodes* - STEs) e a técnica de silkscreen ou serigrafia (*screen-printing*) (PEVERARI, 2016).

Para o desenvolvimento de um biossensor enzimático aplicável, a imobilização da enzima na superfície do eletrodo de trabalho é a etapa mais importante. Este processo é direcionado através de várias interações entre a enzima e o material do eletrodo e afeta fortemente o desempenho do biossensor em termos de sensibilidade, estabilidade, tempo de resposta e reprodutibilidade (PUNDIR; CHAUHAN, 2012).

Das vantagens citadas dos eletrodos descartáveis, talvez a mais importante seja seu grande número de possíveis modificações. A composição das tintas usadas no processo de impressão pode ser modificada pela adição de substâncias de natureza muito diferente, como metais, enzimas, polímeros e agentes complexantes.

Wen e colaboradores modificaram a superfície de *screen-printed carbon electrodes* (SPCE, do inglês, eletrodos de carbonos impressos em tela) ao introduzir grafeno, nanopartículas de ouro (AuNPs), solução de AChE (não informado o organismo) e para encapsular a superfície do eletrodo, o polímero Nafion (WEN et al., 2023). Este biossensor foi capaz de detectar em amostras de vegetais o inseticida Isocarbofo.

Fu e colaboradores adicionaram na superfície de SPCE, óxido de cério revestido com quitosana (CeO<sub>2</sub>-CS), carbono mesoporoso com quitosana (MC-CS) e por último solução de AChE (não informado o organismo), para detectar o inseticida Clorpirifós (FU et al., 2018).

Tun e colaboradores com o objetivo de quantificar e detectar o inseticida Clorpirifós, construíram um biossensor adicionando à superfície de SPCE, nanofibras de celulose (CNFs), óxido de grafeno (GO), óxido de grafeno com quitosana (CS-GO) e AChE de *Electrophorus electricus* (peixe-elétrico) (TUN et al., 2023).

Biossensores também já foram desenvolvidos com apenas uma etapa de modificação. Ivanov e colaboradores desenvolveram um biossensor depositando sobre o eletrodo de trabalho uma solução contendo microtubos de carbono (SWCNTs) e ftalocianina de cobalto (II) (CoPC), com a imobilização da AChE de

*E. electricus* por ligação covalente através da reação EDC-NHS (IVANOV et al., 2011). Os testes de inibição determinaram a atividade dos organofosforados paraoxon e malaoxon.

Os biossensores de AChE para determinação de pesticidas carbamatos e organofosforados usam principalmente AChEs de *Drosophila melanogaster* e de *E. electricus* (ISTAMBOULIE et al., 2009; OUJJI et al., 2013; TSOUNIDI et al., 2023; VALDÉS-RAMÍREZ et al., 2008; WAN et al., 2022; WANG et al., 2020a) e seus objetivos sempre focam em detectar os inseticidas em amostras alimentícias.

Este trabalho, no entanto, apresenta o primeiro desenvolvimento de biossensores eletroquímicos de acetilcolinesterases extraídas de formigas cortadeiras e sob a perspectiva de busca de potenciais inseticidas de extratos vegetais.

## 2. OBJETIVO GERAL

Desenvolver biossensores eletroquímicos empregando enzimas acetilcolinesterases de formiga cortadeira e eletrodos de carbono impressos (do inglês *screen printed carbon electrode*, SPCEs) descartáveis; e aplicação na triagem de extratos vegetais com atividade de inibição enzimática e indicação de potenciais inibidores proveniente de extratos vegetais.

### 2.1 Objetivos específicos

- Construir os SPCEs descartáveis e avaliar sua funcionalidade e aplicabilidade;
- Caracterizar os SPCEs sem modificação e com modificação por MEV e VC;
- Desenvolver os biossensores para a AChE A e AChE B e detectar as atividades enzimáticas pela resposta eletroquímica;
- Análise e otimização das figuras de mérito empregando o biossensor;
- Aplicação dos biossensores na análise de prospecção de extratos vegetais e na detecção de malation.

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Materiais e reagentes utilizados

Ácido ferroceno monocarboxílico ( $C_{11}H_{10}FeO_2$ ), ácido cloroáurico 99,9% ( $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ ), borohidreto de sódio, HEPES ((N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico), Cloreto de polidialildimetilamônio (PDDA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), Hidroxibenzotriazol (HOBt), Tampão ácido 2-etanosulfônico (MES), Monolaurato de polietilenoglicol sorbitano (TWEEN 20), Malation, Iodeto de acetiltiocolina (ATChI) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). As Enzimas acetilcolinesterase de formigas cortadeiras (AChE) foram cedidas pelo Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural. 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 fabricar os microeletrodos foram utilizados: Pasta de carbono Electrodeag da Henkel (Itapevi, Brasil), Tinta de Ag/AgCl da SunChemical (Guarulhos, Brasil), Folha de poliéster e Folha de Vinil obtida em loja local.

#### 3.2 Equipamentos utilizados

Para as medidas de pH, utilizou-se um pHmetro Digimed DM20 (da Digimed, Brasil). Todas soluções relacionadas aos testes eletroquímicos foram preparadas com água purificada obtida em um sistema de purificação Milli-Q da Millipore (Millipore, Bedford, EUA). Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram obtidas dos equipamentos MEV Tescan Mira (Kohoutovice, República Tcheca) e MET FEI modelo Tecnai G2F20 (Oregon, EUA), respectivamente.

Para a fabricação dos eletrodos descartáveis, utilizou-se uma impressora de recorte Silhouette Cameo (Silhouette, Brasil) e uma *plotter* de recorte (F1 Suprimentos, Brasil). Os demais experimentos eletroquímicos foram realizados utilizando um multipotenciostato portátil  $\mu$ STAT8000 da Dropsens (Metrohm, Espanha) conectado a um computador utilizando o *software* DropView 8400.

### 3.3 Preparo das soluções

Para a solução de Tampão fosfato salino (PBS) 10 mmol L<sup>-1</sup> foram utilizados os sais de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mmol L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mmol L<sup>-1</sup>, KCl 2,7 mmol L<sup>-1</sup> e NaCl 137 mmol L<sup>-1</sup>, sendo que o pH foi ajustado para o valor desejado. A solução de tampão PBS com Tween 20 foi preparada em 0,1% (m/v) (PBS-TW).

A solução de C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>FeO<sub>2</sub> 1,0 mmol L<sup>-1</sup> foi preparada em KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>, com pH ajustado para 8,0 utilizando NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>.

A solução de PDDA foi preparada a partir de 3 mg de NaCl solubilizados em 2 mL de água ultrapura somados a 2 µL de PDDA. A dispersão de AuNPs foi diluída em proporção de 1:10 em tampão HEPES 0,02 mol L<sup>-1</sup> pH 8,0. Foi preparado tampão MES 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,0 para o preparo da solução EDC-HOBt. Para esta solução (EDC-HOBt) primeiro solubilizou-se o HOBt em tampão MES, então ajustou-se o pH desta solução com NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> para obter o valor próximo a 6,0, obtendo-se assim uma concentração final de  $6,9 \times 10^{-5}$  mol mL<sup>-1</sup> e em sequência dissolveu-se o EDC nesta solução para obter o valor de  $3,75 \times 10^{-4}$  mol mL<sup>-1</sup> de concentração. As soluções de AsAChE foram preparadas em tampão fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 8,0 e armazenadas em temperatura de 4°C. A solução de ATChI não é armazenada, preparando a mesma no dia dos testes a serem realizados em tampão PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup> em pH desejado conforme o estudo a ser realizado. A solução do pesticida Malation foi preparada em tampão PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4.

### 3.4 Construção dos eletrodos descartáveis

A técnica *screen-printing* (serigrafia) foi utilizada para a construção dos eletrodos de acordo com Afonso *et al.* (AFONSO *et al.*, 2016). Os desenhos para os eletrodos utilizados neste trabalho foram realizados empregando o software Silhouette Studio V3, neste trabalho cada desenho (arranjo) contém 8 eletrodos independentes (Figura 3.1) para serem utilizados simultaneamente, cada eletrodo contém o eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar. Desta forma, uma folha adesiva de vinil é recortada no formato desenhado para os eletrodos pela impressora de recorte. Após o recorte a folha de vinil é transferida para uma folha de poliéster com o auxílio de um adesivo transferidor, após a colagem do vinil no poliéster, o adesivo transferidor é removido (1º etapa).

Então, com um pequeno rodo, a tinta de carbono é dispersa sobre o vinil recortado (2º etapa). A seguir ocorre o processo de cura térmica, no qual os eletrodos são mantidos em estufa à 90°C por um tempo de 30 minutos. Em seguida, sobre a área do eletrodo de referência a tinta de prata Ag/AgCl foi dispersada com o auxílio de um pincel, e os eletrodos foram mantidos mais uma vez em estufa, para outra cura térmica à 60°C por 30 minutos (3º etapa). Após esta etapa, o vinil é totalmente retirado e em cada arranjo é colocado um corte de vinil que demarca a parte do arranjo que estará em contato com as soluções e isola a parte que estará conectada ao potenciostato. Com o auxílio de uma prensa térmica, esse corte de vinil é fixado então nos eletrodos (4º etapa).

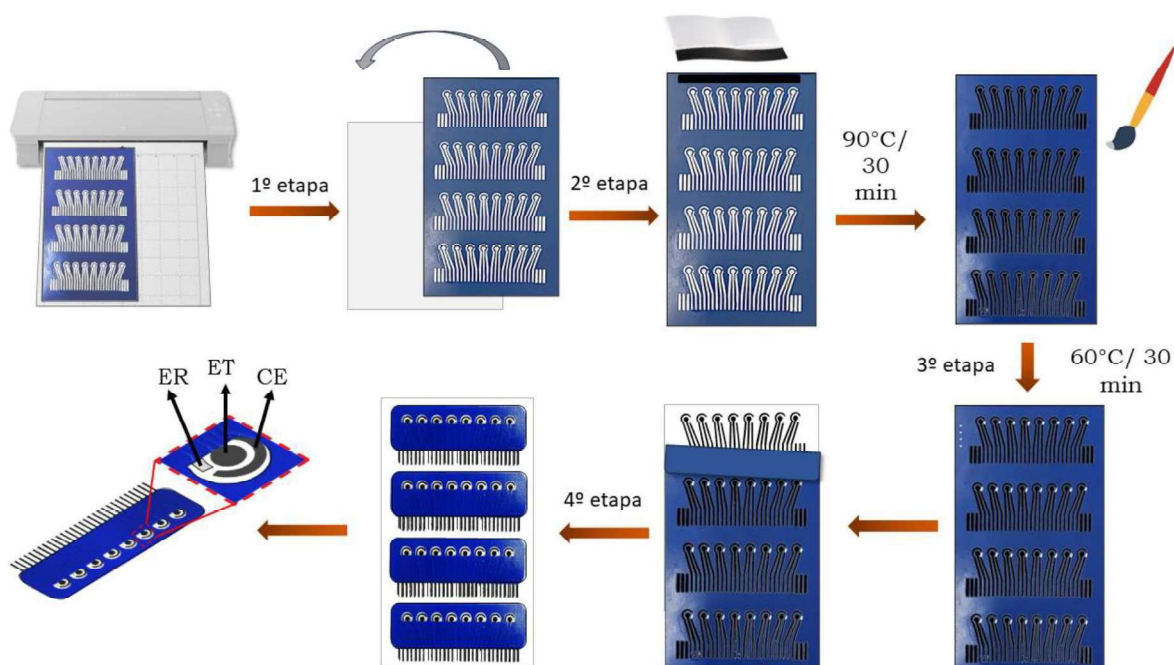


FIGURA 3.1- Etapas de construção dos SPCEs.

### 3.5 Síntese das Nanopartículas de ouro

Para a síntese das nanopartículas de ouro decoradas com glutatona seguiu-se o método estabelecido por Mani *et al.* (MANI *et al.*, 2009). Desta forma, foram pesados 0,079 g de ácido cloroáurico com espátula de plástico e 0,0308 g de L-glutatona reduzida e adicionados a um erlenmeyer, com 2 mL de ácido acético e 12 mL de metanol, resultando em uma solução de cor amarelo claro. Uma solução 0,5 mol L<sup>-1</sup> de borohidreto de sódio foi preparada e então 6 mL desta solução foram adicionados lentamente à solução anterior sob rápida

agitação, e assim foi mantido por 2 horas. A solução resultante foi filtrada em membrana de filtração molecular de 50 kDa (previamente lavada com hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e centrifugada a 3500 rpm. O precipitado foi lavado quatro vezes com água ultrapura durante a centrifugação e dissolvido em tampão HEPES  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  pH 8,0. O volume final de AuNP-GSH foi de 15 mL. A dispersão foi estocada a  $4^\circ\text{C}$ .

### **3.6 Extração e purificação de AChEs**

Esta etapa do trabalho foi realizada em parceria com o Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural (LBFE) sob orientação da Professora Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza e da Dra. Kelli Cristina Micocci.

#### **3.6.1 Amostras biológicas**

A coleta das formigas operárias cortadeiras *A. sexdens* foi realizada em colaboração com os técnicos do laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (UNESP, Rio Claro, Brasil). As formigas foram coletadas de um grande ninho mantido no mesmo laboratório e armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  até o uso.

#### **3.6.2 Purificação de enzimas**

As AChEs (AChE A e B) foram obtidas conforme relatado na literatura, sendo 1 g de cabeças de operárias maceradas em tampão fosfato de potássio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 8,0, precipitadas com sulfato de amônio, dialisadas contra o mesmo tampão fosfato de potássio e purificadas por cromatografia de troca aniônica empregando uma coluna HiTrap DEAE-FF (DOS SANTOS et al., 2019). Para a construção do SPCE, uma etapa final de purificação foi adicionada ao protocolo por Santos e colaboradores, cromatografia de interação hidrofóbica de alta resolução em uma coluna HiTrap Phenyl HP. Esta etapa foi necessária porque a AChE A apresentou alguns contaminantes após a purificação com a coluna DEAE que impediram a construção dos biossensores (Bio-AChE A).

#### **3.6.3 Concentração da enzima**

A concentração das proteínas foi determinada usando o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

### 3.6.4 Ensaio enzimático após a concentração das enzimas

O método de Ellman (ELLMAN et al., 1961) foi utilizado para avaliar a atividade da colinesterase usando acetiltiocolina (ATCh) como substrato. A reação enzimática consistiu em 10  $\mu\text{L}$  de extrato bruto ou 50  $\mu\text{L}$  de frações purificadas em 790 ou 750  $\mu\text{L}$  de mistura de reação, respectivamente (tampão Tris-HCl 50  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 8,0, ATChI 0,3  $\text{mmol L}^{-1}$  e DTNB 0,3  $\text{mmol L}^{-1}$ ). A absorbância foi monitorada a 412 nm.

### 3.7 Modificações e imobilizações das Acetilcolinesterases nos eletrodos de trabalho

Para a imobilização das AChEs nos SPEs foi necessária a modificação da superfície do eletrodo de trabalho. A primeira etapa de modificação é a adição de 10  $\mu\text{L}$  de solução de PDDA 2,0  $\text{mg mL}^{-1}$  e onde a mesma age sobre o eletrodo de trabalho durante 20 minutos. Após o tempo decorrido, retirou-se o excesso de PDDA e os SPEs secaram à temperatura ambiente. Na etapa seguinte, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de  $2,37 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  da dispersão de nanopartículas de ouro decoradas com glutathione (AuNP-GSH, síntese detalhada na sessão 3.5) que, também por 20 minutos, agiu sobre o eletrodo. Nestas duas etapas de modificação, ambos os reagentes interagem eletrostaticamente, pois a solução de PDDA é um polycation e a dispersão de AuNP-GSH são aniônicas (MANI et al., 2009). Após retirada do excesso de solução e nova secagem à temperatura ambiente, 10  $\mu\text{L}$  de solução de EDC-HOBt foram adicionados aos eletrodos para reagir por 10 minutos. Esta etapa é crucial para a imobilização das enzimas nos SPEs, pois o EDC ativa os grupos carboxilas presentes nas AuNPs, que pertencem a glutathione, para posterior reação de amidização com grupos amina presentes em aminoácidos das enzimas (Figura 3.2). O HOBt gera um reagente intermediário mais estável, levando à formação de uma amida, além de reagir com um maior número de aminoácidos comparado a outros reagentes como, por exemplo, o NHS (FIORAMONTE et al., 2018).

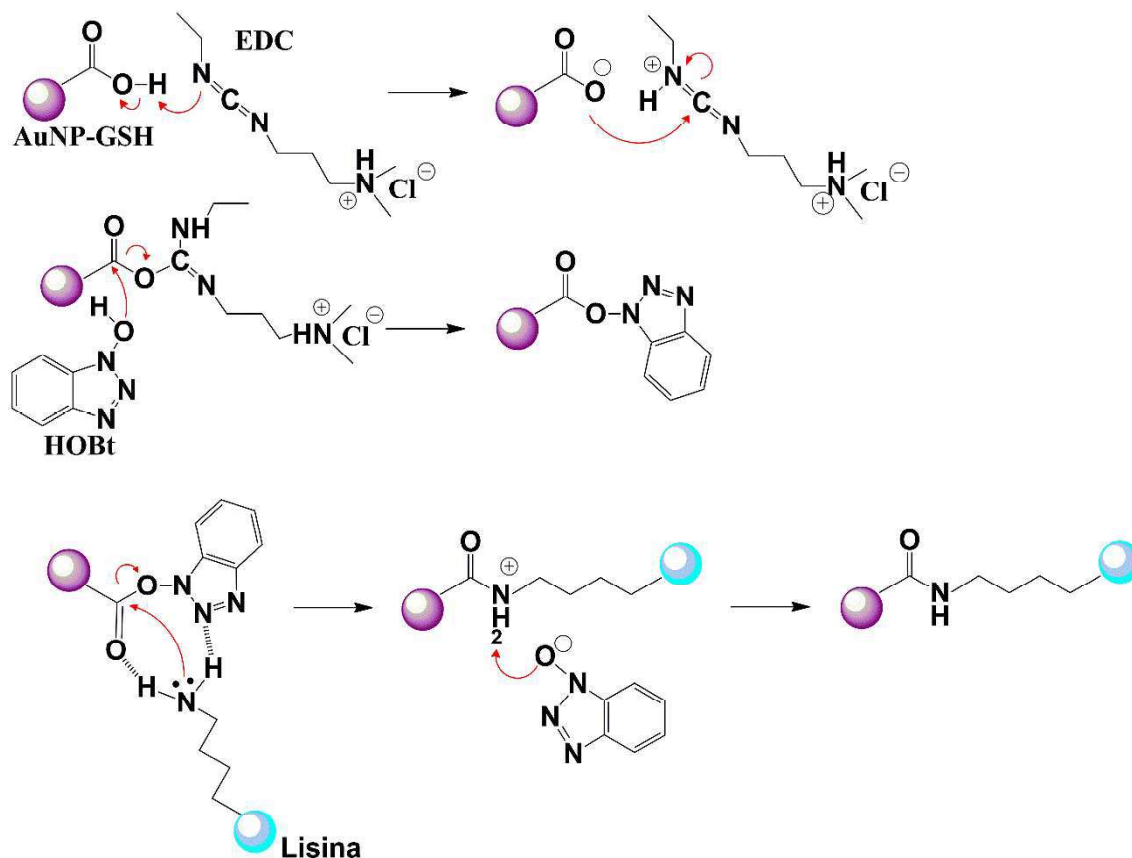


FIGURA 3.2- Etapas da reação de ativação dos grupos carboxilas das AuNPs-GSH através dos reagentes EDC e HOBT.

Após os 10 minutos de reação da solução EDC-HOBT, os eletrodos foram lavados pipetando 200  $\mu\text{L}$  de solução PBS-TW sobre cada eletrodo do arranjo e secados a temperatura ambiente e então adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  da solução enzimática e os mesmos foram mantidos em placa de Petri emudecida por 17 horas a temperatura de 4°C. A próxima etapa foi uma nova lavagem dos eletrodos com PBS-TW e secagem à temperatura ambiente. Para evitar reações não específicas foram adicionados aos eletrodos 10  $\mu\text{L}$  de solução de Etanolamina, com o intuito de bloquear os grupos carboxilas ativos que não reagiram com a enzima. Esta solução reage sobre os eletrodos de trabalho por 1 hora. Por último, os eletrodos foram lavados novamente.

### **3.8 Caracterização morfológica das AuNPs, dos SPEs e otimização das condições para os bioensaios e estabilidade dos biossensores**

Para a caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram utilizadas 10 gotas da dispersão das AuNPs sintetizadas. A dispersão de AuNPs foram gotejadas sobre um filme de carbono amorfo, que é sustentado por uma grade de cobre, e após essa etapa foi aguardada a secagem do filme em temperatura ambiente para que posteriormente fosse inserido no equipamento e então realizada as caracterizações. Para verificar a influência das etapas de modificações dos SPCEs frente às reações eletroquímicas, 50  $\mu\text{L}$  de solução de ácido Ferrocenomonocarboxílico 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 8,0 em Cloreto de Potássio 0,5  $\text{mol L}^{-1}$  foram depositados sobre os eletrodos e as medidas foram realizadas em eletrodos sem qualquer etapa de modificação e com modificação, até a etapa de adição das soluções enzimáticas, e avaliados pela técnica de Voltametria Cíclica com velocidade de varredura de 100  $\text{mV s}^{-1}$  e intervalo de potencial de -0,2 a +0,8 V vs. Ag/AgCl.

Para os estudos de otimização das condições, a técnica eletroquímica aplicada foi Voltametria de Onda Quadrada (VOQ). No estudo de variação de concentração de substrato, a concentração enzimática utilizada para cada AChE foi de 1,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em tampão TRIS-HCl 0,02  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 8. Foi aplicado em cada biossensor 50  $\mu\text{L}$  de solução de ATChI em concentrações de 3,35; 3,45; 3,6; 3,7; 3,8  $\text{mmol L}^{-1}$ . Todas as concentrações do substrato foram preparadas em tampão fosfato 0,01  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,4. Os parâmetros da VOQ fixados foram a Amplitude= 50 mV e  $f= 50$  Hz.

O estudo do efeito da concentração das enzimas na resposta eletroquímica foi efetuado utilizando as seguintes concentrações: 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os testes foram realizados em 50  $\mu\text{L}$  de solução de ATChI 3,8  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,4. Amplitude= 50 mV;  $f= 50$  Hz. Para o estudo de efeito da variação de pH (referente a solução do substrato aplicada sobre os biossensores) nas leituras eletroquímicas, as faixas de pH avaliadas foram: 6,0; 6,5; 7,0; 7,4 e 8,0. Testes realizados em 50  $\mu\text{L}$  de solução de ATChI 3,8  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,4. Concentração das AChEs de 1,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Amplitude= 50 mV;  $f= 50$  Hz.

Após os estudos de otimização de condições, foram selecionados os valores que obtiveram o melhor padrão de resposta eletroquímica nas mesmas condições (concentração de substrato e enzimas, faixa de pH) e realizou-se o estudo de estabilidade dos biossensores. Nesta análise, vários arranjos de biossensores foram desenvolvidos em um só dia e conforme o dia selecionado (Exemplo: 6º dia após o desenvolvimento do biossensor), era realizado o teste eletroquímico para verificar se houve a manutenção da atividade enzimática ou o decréscimo da mesma. Em virtude de todos os arranjos serem desenvolvidos nas mesmas condições, era realizada uma única leitura eletroquímica e após isso o biossensor era descartado. Testes realizados em 50 µL de solução de ASChI 3,8 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Concentração das AChEs de 1,5 µg mL<sup>-1</sup>. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.

### **3.9 Determinação da atividade inibitória por Voltametria de Onda Quadrada**

As medidas voltamétricas foram realizadas em 30 µL de solução de ATChI 3,8 mmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato, pH 7,0. A solução de ATChI reagiu sobre a superfície de cada eletrodo por um tempo de 10 minutos e então se aplicou a medida por VOQ que foi registrada em correntes anódicas no *software* Dropsens.

#### **3.9.1 Tempo de incubação**

O tempo de ação do pesticida Malation sobre os biossensores foi otimizado. Os tempos em que as soluções agiram sobre os SPEs foram de 1, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos. Cada tempo de ação do malation se refere a um arranjo dos eletrodos. Após a incubação, os mesmos foram lavados com PBS-TW e então conectados ao potenciostato para as medições eletroquímicas. Concentração da solução de Malation= 7,2 mg L<sup>-1</sup>.

#### **3.9.2 Avaliação da atividade inibitória em função da concentração**

Definido o tempo de incubação para cada inibidor testado, foram aplicadas as seguintes concentrações de inibidor sobre os biossensores: 0,72 mg L<sup>-1</sup>; 1,4 mg L<sup>-1</sup>; 2,8 mg L<sup>-1</sup>; 4,3 mg L<sup>-1</sup> e 5,7 mg L<sup>-1</sup>. Após o tempo demarcado,

os mesmos foram lavados com PBS-TW e conectados ao potenciostato para as leituras eletroquímicas. As curvas analíticas foram então construídas através do processo de inibição enzimática, calculando a porcentagem de inibição (% I) em função da variação das soluções de malation e extratos brutos.

O cálculo de inibição para estes dois estudos foi realizado aplicando a Equação 1, com as correntes obtidas após o tempo de 10 minutos de reação entre o biossensor e a solução de substrato:

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

Sendo  $I_0$  as correntes medidas sem a presença de inibidor, e  $I_1$  as correntes medidas após incubação dos biossensores com o inibidor.

Para o cálculo de Limite de Detecção, a Equação 2 foi aplicada:

$$LD = \frac{3 \times SD}{b} \quad \text{Equação 2}$$

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

Para o cálculo de Limite de Quantificação, a Equação 3 foi aplicada:

$$LQ = \frac{10 \times SD}{b} \quad \text{Equação 3}$$

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

### 3.10 Ensaio inseticida em *Atta sexdens*

Este ensaio foi realizado no laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP, Rio Claro. Os ensaios foram realizados em operárias de *A. sexdens*, com massa corpórea variando de 15 a 25 mg, na ausência do fungo simbionte. Distribuídas em lotes de 50 operárias para cada concentração de extrato bruto testado, as mesmas foram divididas em grupos de 10 formigas e mantidas em 5 placas de Petri de 10 cm de diâmetro forradas com papel filtro. Essas placas foram colocadas em estufa com temperatura de 24°C e umidade relativa aproximadamente em 70%. A dieta para manutenção das formigas

(controle) ou dieta acrescida dos ingredientes ativos (tratamentos) foi colocada em papel alumínio na quantidade aproximada de 0,4 a 0,5 g por placa. Os ingredientes ativos, dissolvidos em mistura de acetona e óleo de soja (8:2), foram incorporados em dieta artificial nas concentrações estipuladas. No bioensaio por ingestão foram utilizados dois controles. No primeiro, a mistura de acetona e óleo de soja foi incorporada na dieta artificial e, no segundo apenas a dieta artificial. O objetivo do primeiro controle foi acompanhar e avaliar a sobrevivência das formigas com referência a toxicidade da acetona e do óleo, enquanto que a do segundo foi verificar a interferência do manuseio na sobrevivência das formigas. Os bioensaios foram examinados diariamente, para a retirada e contagem do número de formigas mortas, por um período de 25 dias. Todo este protocolo encontra-se descrito na literatura (VICTOR et al., 2001). Os extratos aplicados nestes bioensaios foram: hexânico de folhas de *Ocotea* sp., benzênico de folhas de *Solanum lycocarpum* e etanólico de galhos de *Eugenia brasiliense*.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Caracterização por MEV do eletrodo de trabalho dos biossensores e caracterização das AuNPs por MET

Com o objetivo de observar a morfologia da superfície do eletrodo de trabalho sem qualquer etapa de modificação e também após as etapas de modificações com PDDA e AuNPs, a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada e gerou as imagens contidas na Figura 4.1.

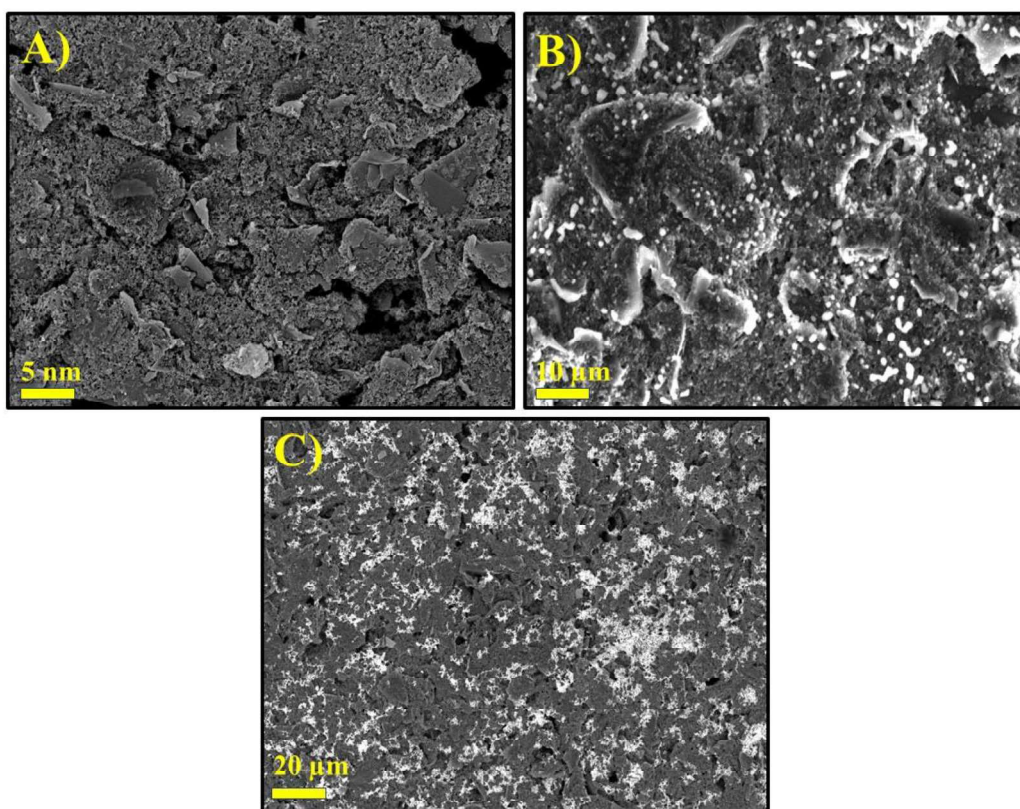


FIGURA 4.1- A) Imagem de MEV de SPCE sem modificação. B) Imagem de MEV de PDDA/SPCE. C) Imagem de MEV de AuNP/PDDA/SPCE.

A Figura 4.1A se refere a imagem MEV do eletrodo de trabalho de carbono sem modificação com muitos poros e pequenas cavidades. Esta estrutura de rugosidade é uma morfologia típica da tinta de grafite (DE OLIVEIRA et al., 2020). A presença de estruturas poliméricas PDDA pode ser observada na superfície do microeletrodo em função do contraste na Figura 4.1B. A interação das AuNPs na superfície dos SPEs é vista na Figura 4.1C, onde a distribuição das

nanopartículas pode ser observada ao longo da região da imagem do eletrodo de trabalho.

A técnica de microscopia eletrônica por transmissão foi utilizada para verificar a dispersão das AuNPs, o valor aproximado de diâmetro das mesmas e a caracterização química/análise elemental do material, conforme observado na Figura 4.2.

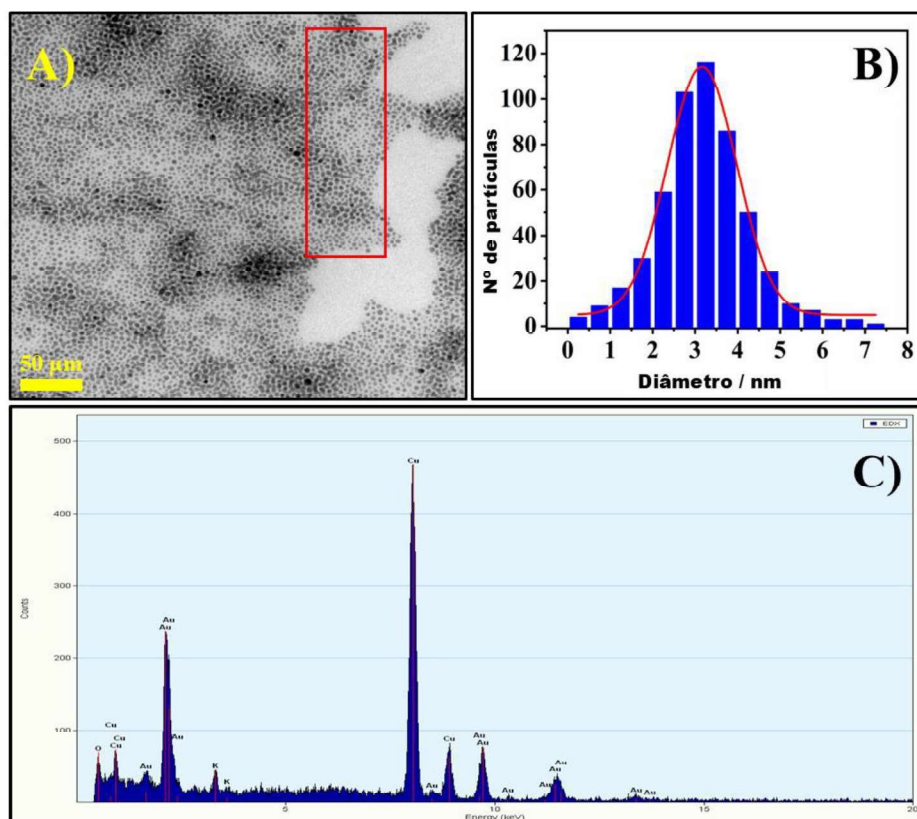


FIGURA 4.2- A) Imagem de MET das AuNPs. B) Histograma de distribuição de tamanho das AuNPs. C) Gráfico de EDS das AuNPs.

Como pode ser visto na Figura 4.2A, as AuNPs foram sintetizadas com eficácia de acordo com o método previsto (MANI et al., 2009). As AuNPs são esféricas e estão bem dispersas, confirmando assim a estabilidade das mesmas em tampão HEPES  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  pH 8,0. Os diâmetros das nanopartículas foram medidos usando o software *ImageJ* apenas na área de destaque em vermelho na imagem 4.2A, e o valor médio de 3,2 nm foi obtido, como demonstrado na figura 4.2B. Análises de EDX (Figura 4.2C) confirmaram a composição majoritária de ouro nas NPs.

## 4.2 Caracterização por Voltametria Cíclica do SPCEs sem modificação e com modificação

As propriedades eletroquímicas de SPCE sem modificação e SPCE com diferentes etapas de modificações como PDDA/SPCE, AuNP/PDDA/SPCE, AChE A/AuNP/PDDA/SPCE e AChE B/AuNP/PDDA/SPCE foram investigadas por VC utilizando solução de  $C_{11}H_{10}FeO_2$  (Figura 4.3). Os voltamogramas cíclicos obtidos mostram uma forma e perfil sigmoidal típico do processo de oxidação e redução do ferroceno (KUMAR; SUNDRAMOORTHY, 2019). Cada arranjo de eletrodos com as etapas de modificação apresentou diferentes correntes de pico, o que indica o processo gradual de desenvolvimento dos biossensores, como será discutido a seguir.

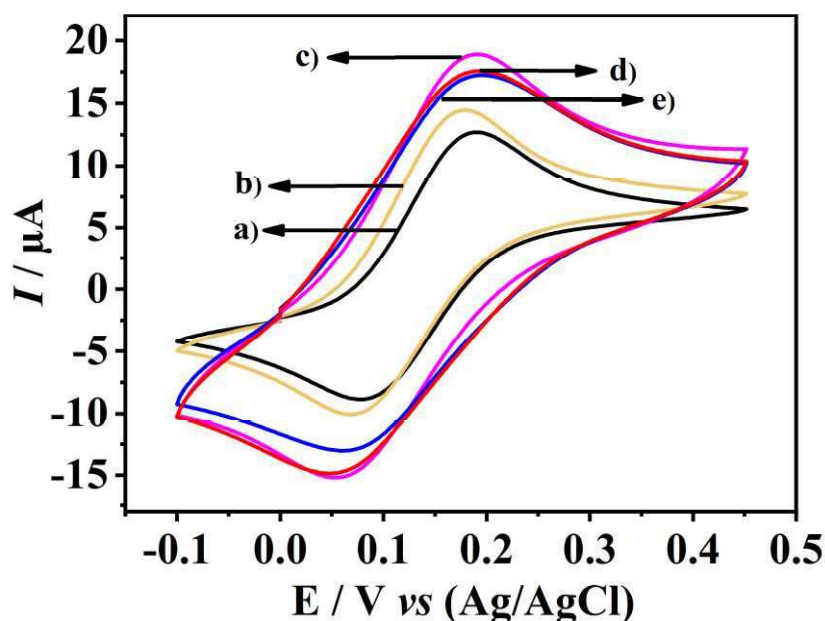


FIGURA 4.3- Voltamogramas cíclicos de a) SPCE (linha preta), b) PDDA/SPCE (linha mostarda), c) AuNP/PDDA/SPCE (linha rosa), d) AChE B/AuNP/PDDA/SPCE (linha vermelha), e e) AChE A/AuNP/PDDA/SPCE (linha azul) em  $1 \text{ mmol L}^{-1} C_{11}H_{10}FeO_2$ . Velocidade de varredura:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Intervalo de potencial:  $-0,2$  a  $+0,8 \text{ V}$ . [AChE A and B] =  $1,5 \text{ µg mL}^{-1}$ .

Há um aumento nas correntes de pico redox e diferença nos potenciais de pico do ferroceno em SPCE sem modificação em comparação ao

PDDA/SPCE (Figura 4.3, curvas a,b), com  $i_{pa} = 1,42 \mu A$  e  $\Delta E_a = 12 mV$ . Por ser um polímero catiônico, o PDDA possui boa condutividade elétrica, interagindo eletrostaticamente com o Ferroceno, facilitando assim a transferência de elétrons no processo redox (CHEN et al., 2018; LIU et al., 2014). A maior diferença nas correntes redox das etapas de modificações está entre PDDA/SPCE e AuNP/PDDA/SPCE, com  $i_{pa} = 2,98 \mu A$  e  $\Delta E_a = 13 mV$ . Esse aumento nas correntes de pico se deve à camada de AuNPs adicionada à superfície dos SPCEs, estas nanopartículas possuem propriedades como alta condutividade e grande razão superfície-volume, o que permite ao biossensor ter alta sensibilidade e baixos limites de detecção (SICILIANO et al., 2023).

Nas etapas de imobilização enzimática, em comparação com a etapa anterior, AuNP/PDDA/SPCE, intercorreu um decréscimo nas correntes redox em AChE A/AuNP/PDDA/SPCE e AChE B/AuNP/PDDA/SPCE. Em AChE A/AuNP/PDDA/SPCE o valor de  $i_{pa} = -1,07 \mu A$ , enquanto para AChE B/AuNP/PDDA/SPCE  $i_{pa} = -0,47 \mu A$ . Esta diminuição nos valores de correntes de pico pode ser explicado pela propriedade não condutora das enzimas, dificultando assim a transferência interfacial de elétrons (CUI et al., 2018; DU et al., 2010).

### **4.3 Detecção da atividade enzimática por resposta eletroquímica da tiocolina**

A atividade enzimática foi avaliada através do monitoramento da corrente anódica gerada pela oxidação do produto da reação entre AChE e ATChI. A caracterização eletroquímica da Bio-AChE A e B na presença e ausência do substrato iodeto de acetiltiocolina (ATChI) foi realizada por VOQ em  $0,01 mol L^{-1}$  de PBS, pH 7,4 (Figura 4.4).

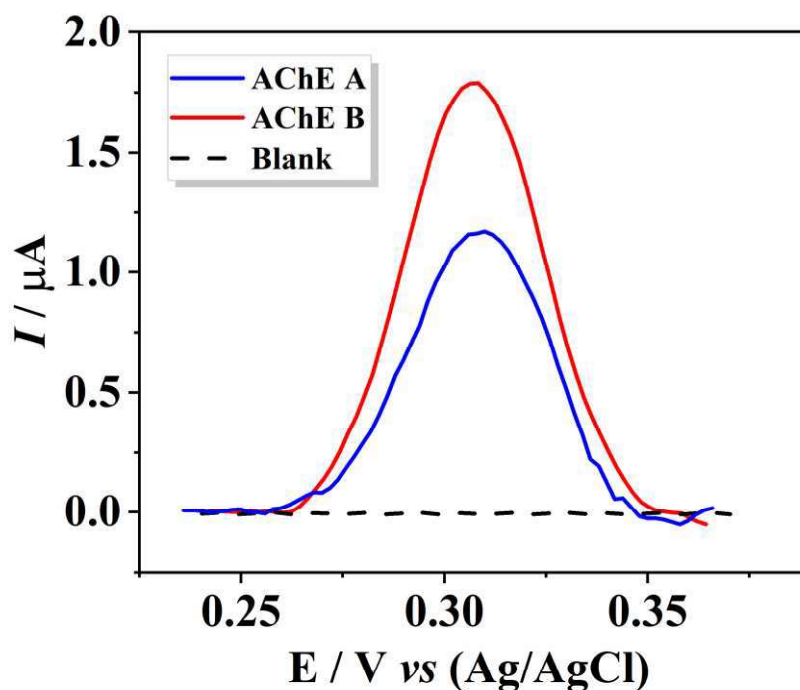


FIGURA 4.4- Resposta eletroquímica por VOQ na ausência (linha tracejada) e presença de  $3,35 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ATChI usando o Bio-AChE A e B em solução PBS  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4.  $A= 50\text{mV}$ ;  $f= 50\text{Hz}$ . Tempo de reação: 10 minutos.

Considerando que o potencial de oxidação da tiocolina já foi registrado em  $E_{pa} = +300 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$  em outros estudos (CINTI et al., 2017; FIORE et al., 2023), foi realizada varredura de potencial nesta janela de potencial. Como pode ser observado na Figura 4.4, na ausência de ATChI na solução não há qualquer processo eletroquímico. Por outro lado, a presença de atividade enzimática é atestada pelas correntes de pico referentes às atividades das enzimas A e B, confirmando assim a eficácia da imobilização de ambas as enzimas no protocolo de modificação proposto.

Nos estudos realizados neste trabalho, as enzimas apresentaram diferentes respostas eletroquímicas quando comparadas as magnitudes de corrente.

#### 4.4 Efeito da concentração da acetiltiocolina na resposta eletroquímica

Para otimizar a concentração ideal para os estudos de inibição, a concentração do substrato acetiltiocolina foi variada e o efeito deste estudo sobre as correntes foram registradas por VOQ (Figura 4.5).

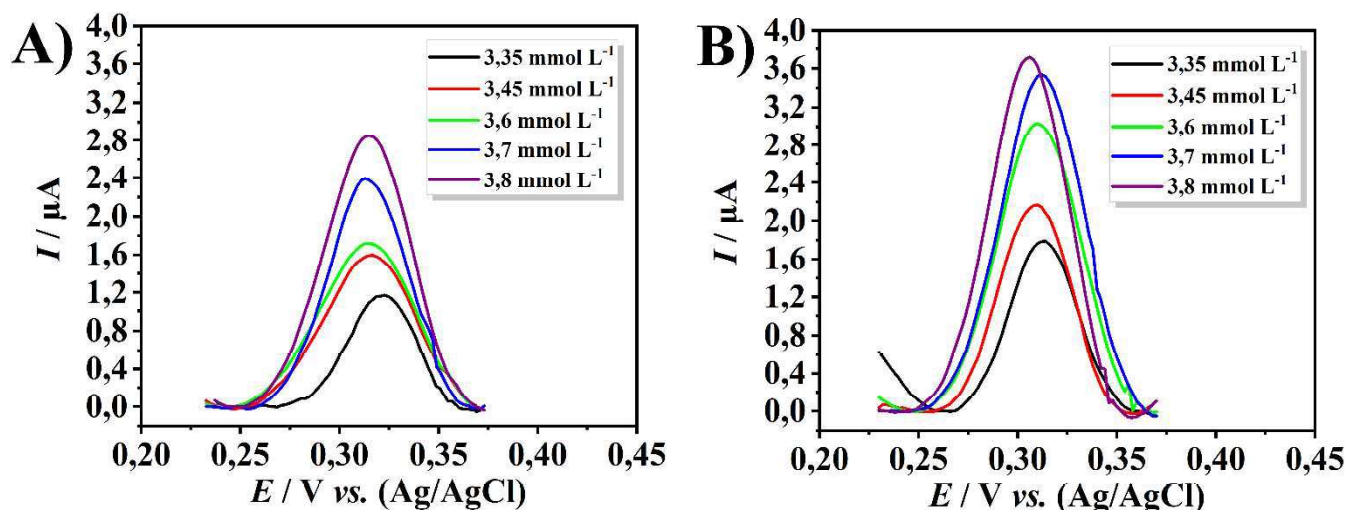
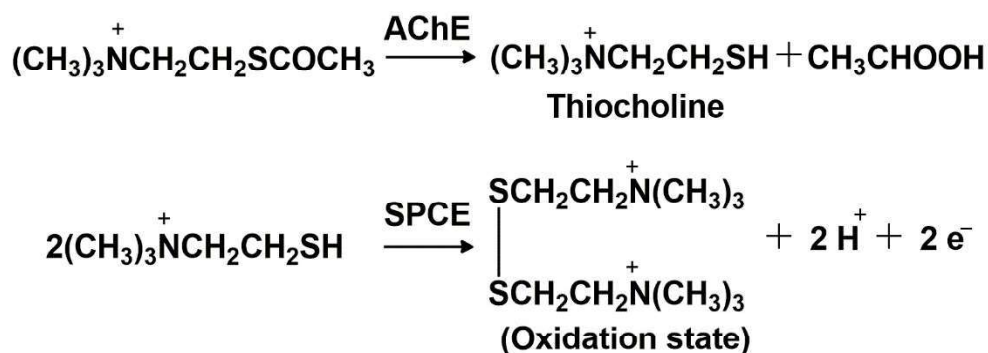


FIGURA 4.5- Voltamogramas obtidos do Bio-AChE A e B em diferentes concentrações de ATChI em PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4. A= 50mV; *f*= 50Hz; Tempo de reação: 10 minutos; [AChE A e B]= 1,5 µg mL<sup>-1</sup>.

Ao reagir com o sítio catalítico da AChE, o substrato é hidrolisado gerando ácido acético e tiocolina. A corrente anódica registrada é correspondente à oxidação da tiocolina pelo potencial aplicado ao biossensor, gerando dímeros de ditio-bis-colina respectivamente (Esquema 1).



Esquema 1. Processo de oxi-redução do substrato ASChI.

Para ambos os biossensores, o valor de  $I$  aumenta proporcionalmente à concentração de ATChI de 3,35 para 3,8 mmol L<sup>-1</sup>, conforme apresentado na Figura 4.6. O acréscimo nos valores da corrente anódica é efeito da maior quantidade de moléculas de ATChI que são hidrolisadas pelas AChEs, consequentemente gerando mais moléculas de TCh que são oxidadas pelo potencial aplicado, resultando no aumento dos valores das médias das correntes registradas.

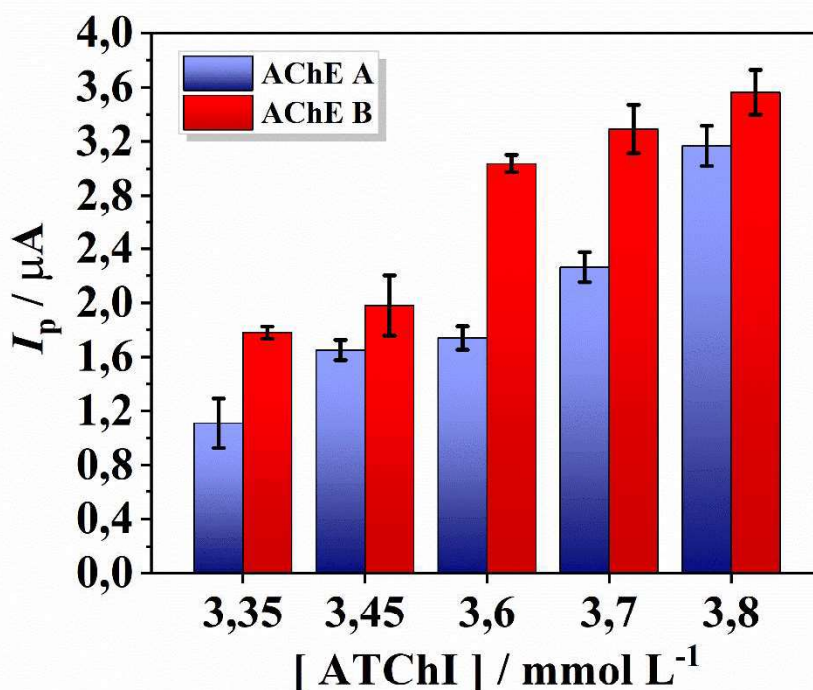


FIGURA 4.6- Médias de correntes registradas do Bio-AChE A e B em diferentes concentrações de ATChI em PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4. A= 50mV;  $f= 50\text{Hz}$ ; Tempo de reação: 10 minutos; [AChE A e B]= 1,5 µg mL<sup>-1</sup>.

Este perfil de crescimento dos valores de corrente é compatível com a literatura (TUN et al., 2023; WAN et al., 2022), é observado principalmente na AChE de enguia elétrica (*Electrophorus electricus*), sendo a primeira vez registrada para enzimas de formigas cortadeiras. Com a maior média de corrente obtida, a concentração de 3,8 mmol L<sup>-1</sup> de ATChI foi selecionada como a concentração ideal para os experimentos seguintes em ambos os biossensores.

## 4.5 Efeito da concentração das enzimas na resposta eletroquímica

Após a determinação da concentração ótima de substrato, outro parâmetro do processo de fabricação do biossensor foi otimizado, a concentração de AChEs sobre a superfície dos biossensores. Os resultados dos valores de  $I_p$  em resposta a ATChI  $3,8 \text{ mmol L}^{-1}$  para a variação das concentrações de AChE A e AChE B entre  $0,05$  e  $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  estão representados na

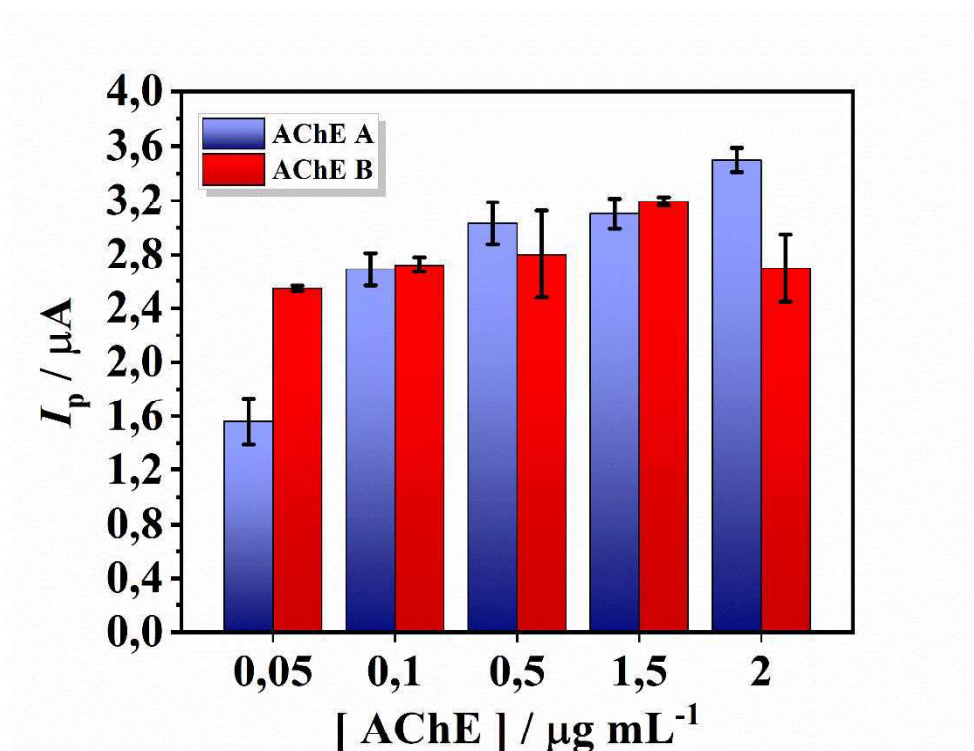


Figura 4.7.

FIGURA 4.7- Médias de correntes registradas do Bio-AChE A e B em diferentes concentrações das enzimas AChE A e AChE B imobilizadas nos biossensores. Correntes obtidas por VOQ em ATChI  $3,8 \text{ mmol L}^{-1}$ , PBS  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4. Amplitude=  $50 \text{ mV}$ ;  $f= 50 \text{ Hz}$ . Tempo de reação=  $10 \text{ min}$ .

O diagrama de barras na Figura 4.7 apresenta um aumento contínuo nos valores da média  $I_p$  do biossensor à medida que a concentração de AChE A aumenta, obtendo um valor de  $3,5 \pm 0,08 \text{ } \mu\text{A}$  em  $2,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em contrapartida, para Bio-AChE B, os valores de  $I_p$  apresentam um aumento gradual seguida de uma diminuição ( $I_p = -0,5 \text{ } \mu\text{A}$ ) na concentração de  $2,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  quando comparado

à concentração de  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Portanto,  $i_p = 3,20 \pm 0,03 \mu\text{A}$  foi a maior resposta obtida para o Bio-AChE B na concentração de  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Este perfil de decréscimo nas médias de correntes para Bio-AChE B está relacionado com o aumento da espessura da interface (DU et al., 2010). As unidades adicionadas em excesso da AChE B podem dificultar o acesso da ATChI aos sítios catalíticos, ocasionando a limitação de moléculas de TChs geradas, e assim, conseqüentemente a diminuição da média das correntes de oxidação.

Para garantir condições experimentais uniformes tanto para Bio-AChE A quanto para Bio-AChE B, a concentração selecionada para testes posteriores foi de  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A concentração escolhida baseou-se na resposta superior e em um desvio de apenas 1,00% para AChE B, juntamente com um desvio de 2,61% para AChE A.

#### **4.6 Efeito do valor de pH na solução de ATChI na resposta eletroquímica e repetibilidade dos biossensores**

Após o valor da concentração das enzimas na superfície dos eletrodos ter sido fixada, soluções de ATChI 3,8 mM foram preparadas em cinco valores de pH diferentes: 6,0; 6,5; 7,0; 7,4 e 8,0, para avaliar os resultados catalíticos do biossensor. Os resultados podem ser analisados na Figura 4.8.

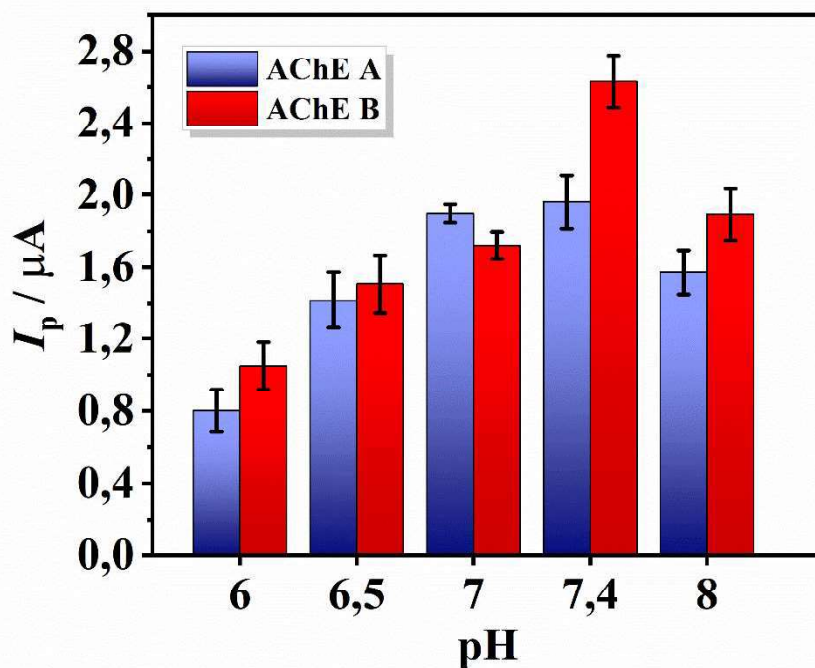


FIGURA 4.8- Efeito na corrente de oxidação da tiocolina em função do valor de pH da solução de ATChI. Correntes obtidas por VOQ em ATChI  $3,8 \text{ mmol L}^{-1}$ , PBS  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . Amplitude=  $50 \text{ mV}$ ;  $f= 50 \text{ Hz}$ . Tempo de reação=  $10 \text{ min}$ . [AChE A e B]=  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Conforme apresentado na Figura 4.8, o valor de  $I_p$  exibiu uma tendência ascendente com o aumento dos valores de pH, com um subsequente declínio no sinal observado em pH 8,0 para ambas as enzimas sob investigação. Na faixa de pH 7,4, Bio-AChE A e Bio-AChE B obtiveram  $I_p = 1,96 \pm 0,14 \mu\text{A}$  e  $2,63 \pm 0,14 \mu\text{A}$ , respectivamente. Na faixa de pH 8,0, Bio-AChE A e Bio-AChE B obtiveram  $I_p = 1,57 \pm 0,12 \mu\text{A}$  e  $1,89 \pm 0,14 \mu\text{A}$ , respectivamente, ou seja, um decréscimo em médias de correntes nos valores de  $I_p = -0,38 \mu\text{A}$  para Bio-AChE A e  $I_p = -0,73 \mu\text{A}$  Bio-AChE B.

Notavelmente, para AChE A, os valores de  $I_p$  estavam estaticamente alinhados em pH 7,0 e 7,4, enquanto para AChE B, o sinal eletroquímico registrado em pH 7,4 atingiu o valor mais alto. No entanto, também foi observado que em pH 7,4, os resultados catalíticos monitorados apresentaram desvios padrão mais elevados, em valores de 7,53% para AChE A e 5,51% para AChE B.

Diferentes valores de pH ou alterações nos mesmos levam a mudanças nos estados de protonação de resíduos de aminoácidos dentro de uma proteína (HOFER et al., 2020). Desta forma, pH 7,0 foi considerado o mais adequado para testes subsequentes dos biossensores, uma vez que nesta condição, os resultados exibiram desvios padrão mais baixos, 0,26% para AchE A e 3,37% para AchE B.

Em última análise, o pH selecionado neste estudo está dentro da faixa de pH utilizado em outros trabalhos da literatura (BAO et al., 2019; CUI et al., 2018; DU et al., 2008; DZUDZEVIC CANCAR et al., 2016; LANG et al., 2016; SUN; WANG, 2010; WANG et al., 2020b).

Uma vez selecionadas as condições ideais para os bioensaios de inibição, sendo estas: a concentração de ATChI ( $3,8 \text{ mmol L}^{-1}$ ), as concentrações das AChEs ( $1,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e a faixa de pH (7,0); avaliou-se a repetibilidade dos biossensores calculando o DPR intra-dia e inter-dia ( $n= 3$ ) (Tabela 4.1).

TABELA 4.1- Desvio Padrão Relativo para intra e inter-dia de biossensores nas condições escolhidas para os testes de inibição.

<b>Biossensores</b>	<b>Repetibilidade</b>	<b>DPR / %</b>
<b>Bio-AChE A</b>	Intra-dia	3,97
	Inter-dia	6,61
<b>Bio-AChE B</b>	Intra-dia	2,00
	Inter-dia	5,70

Os valores de DPR apresentaram menores porcentagens quando calculados para arranjos de biossensores intra-dia, sendo o valor de 3,97% para Bio-AChE A e 2,00% para Bio-AChE B. O valor de desvio é maior quando calculado para os biossensores construídos em dias diferentes, com os valores de 6,61% para Bio-AChE A e 5,70% Bio-AChE B. Estes valores de DPR confirmam um ótimo desempenho dos biossensores desenvolvidos, uma excelente repetibilidade do protocolo proposto para a imobilização das duas enzimas e das condições propostas para determinações de potenciais inibidores.

Estes valores estão próximos à biossensores de AChE desenvolvidos em eletrodos convencionais (RAGHU et al., 2012, 2014).

#### 4.7 Estudo de estabilidades dos biossensores de AChEs

O estudo de estabilidade dos biossensores envolveram preparações de arranjos de Bio-AChE A e Bio-AChE B ( $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A concentração de ATChI utilizada foi de  $3,8 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0. Os arranjos de biossensores foram preparados no mesmo dia, armazenados em temperatura de  $-4^\circ\text{C}$  e então foi testada a estabilidade destes em intervalos de dias até o décimo terceiro dia após a construção dos mesmos (Figura 4.9). A atividade enzimática está diretamente relacionada com a sensibilidade do biossensor (ÁP HART, 1997).

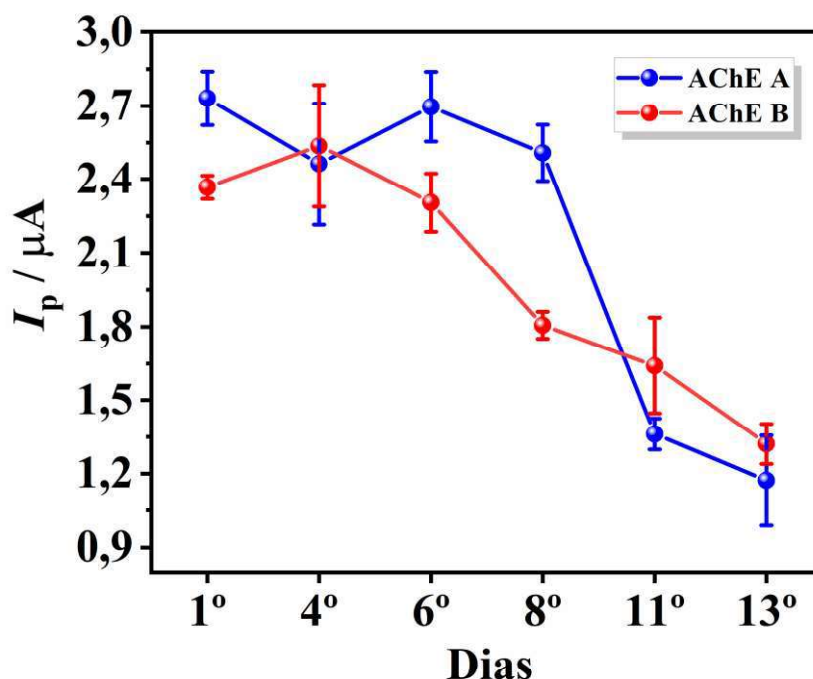


FIGURA 4.9- Efeito nas correntes de pico em relação ao tempo de estocagem dos biossensores de AChE A e AChE B. Correntes obtidas por VOQ em ATChI  $3,8 \text{ mmol L}^{-1}$ , PBS  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Amplitude= 50 mV;  $f = 50 \text{ Hz}$ . Tempo de reação= 10 min.  $[\text{AChE A e B}] = 1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

A Figura 4.9 mostra a estabilidade dos biossensores para AChE A e B. Pode-se observar que a enzima AChE A permaneceu estável até o dia 8, com

94,4% de sua atividade enzimática. No dia 11 houve uma queda de 50% na atividade enzimática. Enquanto a enzima AChE B manteve sua atividade enzimática até o dia 6, com 95,8%, a partir do dia 8 sua atividade caiu para 75,0%, apresentando menor estabilidade no dia 8 em comparação à AChE A.

A partir do dia 11, a enzima AChE B apresenta maior atividade enzimática quando comparada à AChE A, pois enquanto a AChE A possui 50% de sua atividade enzimática inicial, a AChE B possui 68,7%. No dia 13, as atividades enzimáticas foram consideradas estatisticamente equivalentes. Esta diferença na estabilidade pode ser atribuída a alterações na estrutura tridimensional da enzima (KHAN; WERNET, 1997; SOTIROPOULOU; VAMVAKAKI; CHANIOTAKIS, 2005).

Como mostrado a partir destes dados, o biossensor baseado em AChE A manteve a sua atividade inicial durante um período mais longo de avaliação, mas mostrou uma diminuição considerável na sua atividade a partir do 11º dia. Por outro lado, o biossensor AChE B, apesar de diminuir consideravelmente a sua atividade a partir do dia 6, apresentou maior atividade em comparação com a AChE A no 11º dia.

Ao final do período de teste (13º dia), a atividade remanescente dos biossensores AChE A e B permaneceu estatisticamente equivalente (considerando o sinal analítico). Resultados semelhantes foram observados em (ARDUINI et al., 2013), que mostrou uma diminuição de cerca de 60% na atividade enzimática da AChE (peixe-elétrico) na primeira semana de armazenamento do biossensor. Conclui-se, portanto, que ambas as enzimas utilizadas são potenciais matrizes estabilizadoras para o desenvolvimento de biossensores baseados em AChE.

#### **4.8 Estudo de inibição e determinação do inseticida Malation**

Aplicando as mesmas condições do estudo de estabilidade dos biossensores (concentração de ATChI, concentração de AChEs e pH), foi analisado o efeito de inibição do malation baseado na inibição enzimática. Primeiramente foi verificada a influência do tempo de incubação do malation nos biossensores nas correntes medidas (FIGURA 4.10).

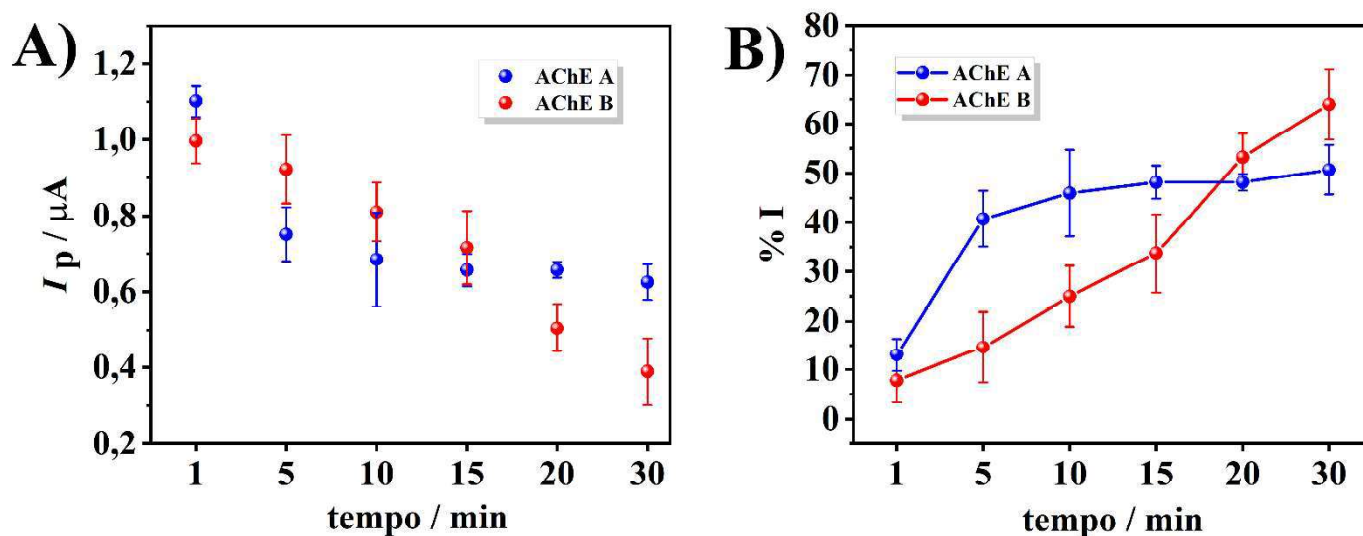


FIGURA 4.10- A) Efeito nas correntes de pico em relação ao tempo de inibição do malation sobre os biossensores de AChE A e AChE B. B) Porcentagem de inibição enzimática através das médias de correntes obtidas. [malation]=  $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Correntes obtidas por VOQ em ATChI  $3,8 \text{ mmol L}^{-1}$  em PBS  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Amplitude= 50 mV;  $f= 50 \text{ Hz}$ . Tempo de reação= 10 min. [AChE A e B]=  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

A presença do inseticida organofosforado malation alterou a atividade enzimática de ambas as enzimas, como pode ser visto na Figura 4.10A. O malation liga-se ao sítio catalítico da enzima, o que impede que moléculas de ATCh acessem esse mesmo sítio, fazendo com que menos moléculas de TCh sejam produzidas a partir do substrato (WANG et al., 2022). Como resultado direto, ocorre a diminuição da corrente de oxidação do TCh, consequência do declínio das atividades enzimáticas. Em resumo, o bloqueio do sítio ativo pelo malation está diretamente relacionado à taxa de inibição.

O decréscimo das atividades enzimáticas pode ser representado em termos de porcentagem de inibição (%I) aplicando a equação 1 (seção 3.9). O tempo de inibição é proporcional à %I em ambos os biossensores e como pode ser visto na Figura 4.10B, em apenas 1 min de incubação com malation a taxa é de aproximadamente 13% e 7% para Bio-AChE A e B, respectivamente. Para

Bio-AChE A em 5 min de tempo há um aumento expressivo no valor de taxa de inibição, alcançando o valor de 40%. Percebe-se que a partir deste tempo até 30 min (50%), essa diferença de porcentagem é menor, sendo que a partir de 10 min (45%) os valores de porcentagem estão estatisticamente próximos.

Tratando-se do Bio-AChE B, observa-se um perfil diferente de taxa de inibição. A porcentagem de inibição tem aumento gradual até o tempo máximo de teste, 30 min, obtendo assim um valor máximo de 63% de inibição enzimática. Para alcançar um valor acima dos 40% de inibição, foram necessários 15 min de ação do pesticida sobre a AChE B, tendo em vista que para AChE A esta porcentagem foi obtida em apenas 5 min. Esta ação mais prolongada na AChE B pode indicar uma maior resistência desta enzima ao inibidor.

Lang e colaboradores avaliaram a atividade inibitória de carbamatos e organofosforados sobre as AChEs de *Bombyx mandarina* (mariposa-da-seda) pelo método de Ellman (LANG et al., 2010). A AChE1 (identificação do autor) apresentou maior sensibilidade a todos os compostos testados exceto a um composto organofosforado, indicando assim que a AChE2 possui maior resistência frente a estes inibidores específicos.

Kim e colaboradores ao investigarem o comportamento das duas AChEs de *Apis mellifera* (abelha-europeia) frente a compostos carbamatos e organofosforados, obtiveram respostas de inibição diferentes para cada AChE (KIM et al., 2012b). Nos ensaios realizados pelo método de Ellman os valores de IC<sub>50</sub> para a AChE2 (identificação do autor) foram menores comparados a AChE1, indicando a resistência da AChE1 contra os inibidores testados.

Kim e colaboradores realizaram testes de inibição frente as AChEs de *Blattella germanica* (barata) aplicando organofosforados e carbamatos (KIM et al., 2010). Com os resultados dos testes de Ellman, a AChE2 (identificação do autor) apresentou maior sensibilidade aos inseticidas testados, com valores menores de IC<sub>50</sub> comparado a AChE1.

Dos Santos e colaboradores obtiveram também porcentagens diferentes em testes de inibição de AChEs de *Atta sexdens* (formiga-cortadeira, utilizada neste trabalho) (DOS SANTOS et al., 2019). Compostos derivados de hidantoínas inibiram majoritariamente a atividade enzimática da AChEA (identificação do autor) comparada a AChEB, indicando a maior sensibilidade aos inibidores da AChEA e maior resistência da AChEB a estes compostos.

O tempo de reação entre o malation e a AChE pode variar dependendo do biossensor desenvolvido, variando de 1 min a mais de 30 min, conforme outros trabalhos publicados (BILAL et al., 2022; LUO et al., 2018; RAGHU et al., 2014; RODRIGUES et al., 2018). Como dentro de 15 minutos de inibição há uma diminuição significativa na atividade enzimática (48% para AChE A e 33% para AChE B), decidiu-se definir este tempo para a determinação do malation em diferentes concentrações (Figura 4.11).

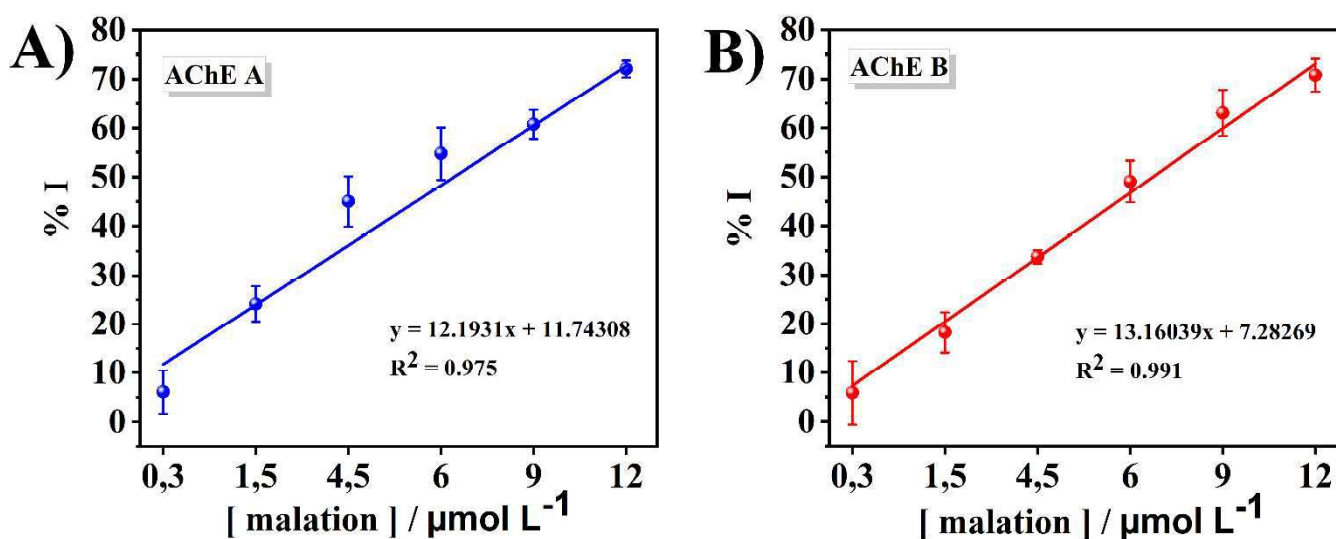


FIGURA 4.11- A) Gráfico linear da concentração de malation versus a porcentagem de inibição da atividade da enzima AChE A. B) Gráfico linear da concentração de malation versus a porcentagem de inibição da atividade da enzima AChE B. Correntes obtidas por VOQ em ATChI  $3,8 \text{ mmol L}^{-1}$  em PBS  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Amplitude= 50 mV;  $f = 50 \text{ Hz}$ . Tempo de reação= 10 min. [AChE A e B]=  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Observa-se na Figura 4.11 um comportamento semelhante sobre a interação do pesticida com cada uma das AChEs. A AChE A mostra maior sensibilidade ao pesticida do que a AChE B. Na concentração de  $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  de malation, a AChE A teve uma diminuição em sua atividade enzimática de 6%, enquanto a AChE B foi inibida em 5%. Esse perfil é mantido até a maior concentração,  $12 \mu\text{mol L}^{-1}$  de malation, com a taxa de inibição sendo de 72% e 70% para AChE A e AChE B, respectivamente. É importante destacar que a inibição da atividade da AChE A entre as concentrações de  $1,5$  e  $4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$

apresenta um aumento significativo de porcentagem, sendo do valor de 24% para 45%. Uma porcentagem de inibição acima dos 40% para a AChE B só é alcançada em uma concentração maior, sendo  $6 \mu\text{mol L}^{-1}$  com 49% de inibição especificamente.

A relação linear entre a taxa de inibição e a concentração de malation apresentou  $R^2 = 0,975$  para Bio-AChE A e  $R^2 = 0,991$  para Bio-AChE B. Com os valores dos coeficientes angulares obtidos pelas equações de cada reta, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados aplicando as equações 2 e 3 (seção 3.9.2), respectivamente. Desta forma, os valores obtidos foram  $9,1 \text{ nmol L}^{-1}$  e  $30,4 \text{ nmol L}^{-1}$  para Bio-AChE A, respectivamente; e  $4,7 \text{ nmol L}^{-1}$  e  $16,0 \text{ nmol L}^{-1}$  para Bio-AChE B, respectivamente. Na Tabela 4.2 pode-se comparar o desempenho analítico dos Bio-AChEs com outros biossensores eletroquímicos relatados recentemente para detecção de malation.

TABELA 4.2- Comparação do desempenho analítico de biossensores eletroquímicos para detecção

<b>Biossensor</b>	<b>AChE</b>	<b>Faixa linear</b>	<b>LD</b>	<b>Re</b>
ZnO/CHI/AChE	NI	1,75-10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	10 $\text{nmol L}^{-1}$	(G
Poly(TTP)/AChE/GCE	<i>E. electricus</i>	0,015-1,644 $\text{mmol L}^{-1}$	4,08 $\text{nmol L}^{-1}$	(G KI
Am-AChE/Ni/GCN/PG	<i>A. mellifera</i>	0,1-16 $\mu\text{mol L}^{-1}$	2 $\text{nmol L}^{-1}$	(B
AChE/CS/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	NI	0,5 to 20 $\text{nmol L}^{-1}$	0,3 $\text{nmol L}^{-1}$	(R
Nafion/AChE/GO@MWNTs/Ru( bpy) <sub>3</sub> <sup>2+</sup> /ZnO-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /GCE.	NI	0,066-0,66 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,22 $\text{nmol L}^{-1}$	(L
Bio-AChE A	<i>A. sexdens</i>	0,3-12 $\mu\text{mol L}^{-1}$	9 $\text{nmol L}^{-1}$	Tr
Bio-AChE B	<i>A. sexdens</i>	0,3-12 $\mu\text{mol L}^{-1}$	4 $\text{nmol L}^{-1}$	Tr

NI- Não Informado.

Apesar dos diferentes materiais utilizados para a fabricação dos biossensores, a faixa linear do malation testada nestes trabalhos relatados nas literaturas citadas anteriormente é próxima à faixa linear testada neste trabalho (0,3-12  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Embora alguns desses trabalhos apresentem LD menores, o objetivo principal é detectar pesticidas para segurança alimentar (ARDUINI et al., 2020; QI et al., 2021). No entanto, este trabalho apresenta uma nova ferramenta na busca por inseticidas que atuem diretamente na acetilcolinesterase das formigas, o que será discutido nos resultados a seguir.

#### **4.9 Estudo de inibição das acetilcolinesterases pelo extrato de *Solanum lycocarpum***

Para o estudo de inibição das AChEs aplicando extratos vegetais, manteve-se as mesmas condições do estudo de determinação do inseticida malation (concentração de substrato, concentração de enzima e valor de pH). O tempo de inibição para os extratos foi fixado em 15 minutos, tempo escolhido para o estudo da variação de concentração do malation. As concentrações dos extratos estão na faixa de 0,01-2  $\text{mg L}^{-1}$ . A Figura 4.12 mostra o perfil de inibição do extrato benzênico de *Solanum lycocarpum* frente as AChEs de *Atta sexdens*.

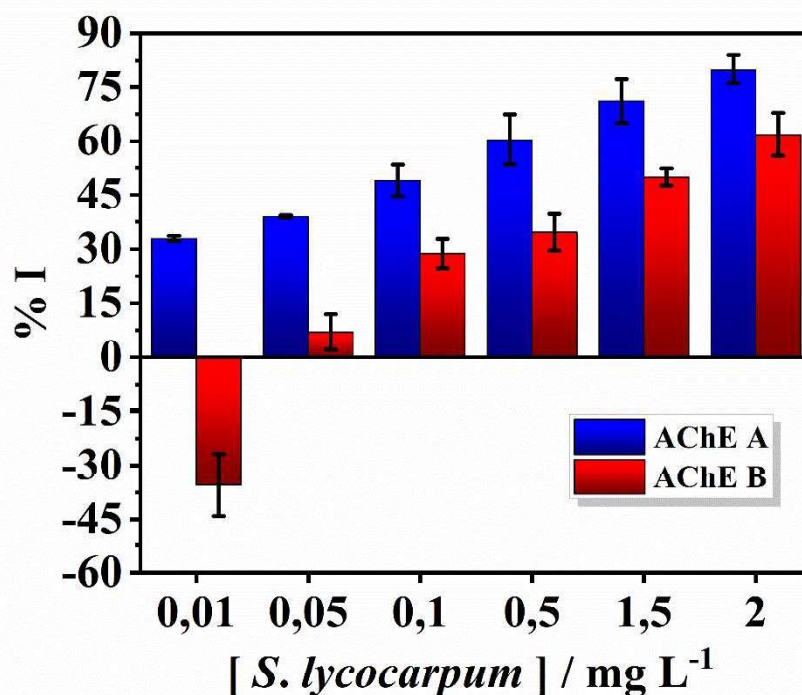


FIGURA 4.12- Porcentagem de inibição enzimática do extrato *S. lycocarpum* em diferentes concentrações. Inibição calculada através das médias de correntes obtidas. Correntes obtidas por VOQ em ATChI 3,8 mmol L<sup>-1</sup> em PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Amplitude= 50 mV;  $f= 50$  Hz. Tempo de reação= 10 min. [AChE A e B]= 1,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Ao analisar os resultados obtidos dos bioensaios em ambos biossensores, identifica-se perfis diferentes de inibição em cada biossensor. Para Bio-AChE A, há um acréscimo de porcentagem de inibição proporcional ao acréscimo de concentração do extrato *S. lycocarpum*. O menor valor de concentração testado, 0,01 mg L<sup>-1</sup>, obteve 32% de inibição da AChE A; em 0,1 mg L<sup>-1</sup> a taxa de inibição alcançou 49% e na solução mais concentrada de extrato, 2 mg L<sup>-1</sup>, o extrato inibiu a atividade enzimática em 80%.

No menor valor de concentração testado, 0,01 mg L<sup>-1</sup>, a taxa de inibição da AChE B apresentou -35%, o que indica estímulo à atividade enzimática do extrato testado. Este comportamento indica interação de algum composto presente no extrato que ao se ligar com a AChE B facilita a interação da mesma com o substrato no ciclo catalítico. Porém, este desempenho do extrato como estímulo é alterado para inibidor quando se aumenta a concentração do mesmo

para 0,05 mg L<sup>-1</sup>, obtendo taxa de inibição de 7%. A partir deste valor de concentração há então um aumento de porcentagem de inibição até 61%, na concentração maior, 2 mg L<sup>-1</sup>. Para alcançar o valor 50% de inibição da AChE B o extrato de *S. lycocarpum* precisa estar em concentração maior que 1,5 mg L<sup>-1</sup>, enquanto para AChE A esse valor pode ser obtido em 0,1 mg L<sup>-1</sup>. Estes perfis indicam a maior sensibilidade da AChE A para o extrato de *S. lycocarpum*.

Plantas do gênero *Solanum* apresentam atividades sobre a AChE. Ogunsuyi e colaboradores verificaram a atividade anticolinesterásica, aplicando o método de Ellman, de extratos aquosos de folhas de *S. macrocarpon* e *S. nigrum* sobre a AChE de *D. melanogaster* (OGUNSUYI; ADEMILUYI; OBOH, 2020). Ambos os extratos obtiveram acima de 80% de inibição enzimática na concentração de 2 mg mL.

Substâncias isoladas de extrato de *Solanum* também já apresentaram atividade inibitória frente a AChE. Chang e colaboradores testaram a atividade inibitória de dois alcalóides isolados de *S. lyratum* (organismo não informado) pelo método de Ellman (CHANG et al., 2023). Ambos os compostos, (-)-(7'S)-N-feruloiltiramina A e N-cis-feruloil-3'-metoxi-tiramina apresentaram atividade inibitória quando comparados com Donepezil (controle), com valores de IC<sub>50</sub> 7,41 μmol L<sup>-1</sup>, 9,21 μmol L<sup>-1</sup> e 3,12 μmol L<sup>-1</sup> respectivamente.

Das classes de compostos identificadas de plantas do gênero *Solanum*, como alcalóides (DU et al., 2020) e sesquiterpenos (LI et al., 2013), as atividades anticolinesterásicas de alcalóides foram amplamente registradas na literatura (BERKOV et al., 2008; HIRASAWA et al., 2008; ORTIZ et al., 2018; ZHAN et al., 2010).

#### 4.10 Estudo de inibição das acetilcolinesterases pelo extrato de *Ocotea* sp.

Aplicando as mesmas condições do teste anterior, a Figura 4.13 mostra o perfil de inibição do extrato benzênico de *Ocotea* sp. frente as AChEs de *Atta sexdens*.

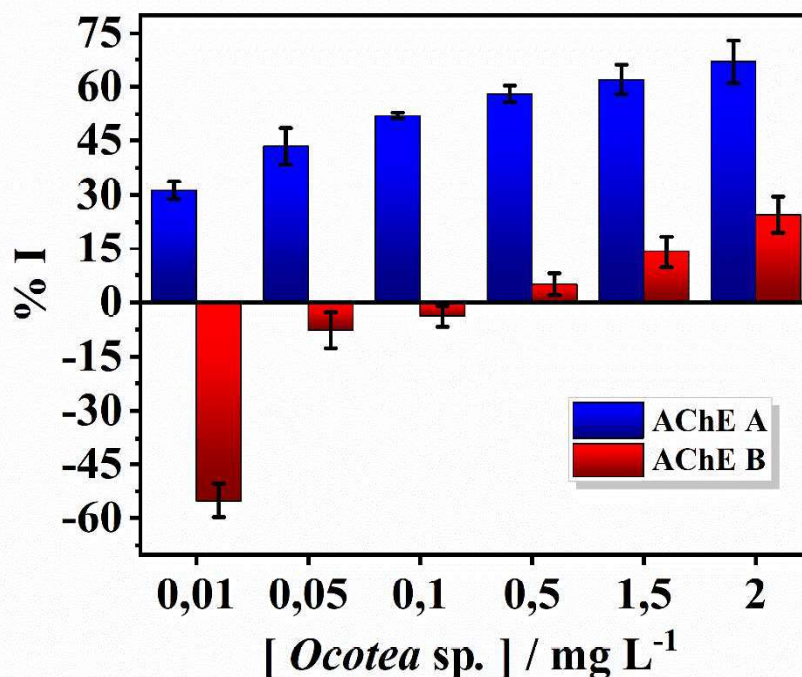


FIGURA 4.13- Porcentagem de inibição enzimática do extrato *Ocotea* sp em diferentes concentrações. Inibição calculada através das médias de correntes obtidas. Correntes obtidas por VOQ em ATChI 3,8 mmol L<sup>-1</sup>, PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Amplitude= 50 mV;  $f= 50$  Hz. Tempo de reação= 10 min. [AChE A e B]= 1,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os perfis de inibição de ambas as AChEs para o extrato de *Ocotea* sp. são similares em alguns pontos comparado aos perfis dos ensaios com *S. Lycocarpum*: Há um acréscimo de inibição da AChE A conforme aplicam-se soluções mais concentradas do extrato de *Ocotea*; quanto a AChE B, o extrato primeiro age como estímulo para a atividade enzimática até ser alterado para inibidor em soluções mais concentradas de extrato.

Ao observar a Figura 4.13, verifica-se para Bio-AChE A que em 0,01 mg L<sup>-1</sup> a taxa de inibição inicia em 31%. A partir de 0,1 mg L<sup>-1</sup> até o valor de 2 mg L<sup>-1</sup> a taxa de inibição não altera significativamente, similar ao bioensaio com o extrato de *S. lycocarpum*, uma vez que em 0,1 mg L<sup>-1</sup> a taxa de inibição está em 51% e em 2 mg L<sup>-1</sup> o valor é de 65%. Essa aproximação de valores indica que a reação do extrato com a enzima está alcançando o topo da cinética, ou seja, todas as unidades enzimáticas disponíveis na superfície do microeletrodo reagiram com as moléculas do extrato.

A inibição do extrato de *Ocotea* sp. apresenta um perfil totalmente diferente em relação a AChE B. Em 0,01 mg L<sup>-1</sup> a taxa de inibição está em -55%, e esse perfil de estímulo à atividade enzimática se mantém até a concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> quando o valor de inibição está em -4%. O extrato tem ação inibitória quando a concentração está em um valor a partir de 0,5 mg L<sup>-1</sup>, obtendo 5% de inibição e alcançando um máximo de inibição de apenas 24%, na concentração de 2 mg L<sup>-1</sup>.

A atividade anticolinesterásica de extratos do gênero *Ocotea* também estão registradas em outros trabalhos. De Almeida e colaboradores realizaram testes com extratos etanólico, hexânico e acetato de etila de folhas de *O. daphnifolia*, obtendo, na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup>, taxa de inibição de 82%, 46% e 20%, respectivamente (DE ALMEIDA et al., 2021). Após fracionamento do extrato mais ativo (etanólico) em fase sólida, a fração mais ativa inibiu a enzima em 72%, o que levou a conclusão de perda de efeito sinérgico para a diminuição da atividade inibitória comparada ao extrato. Após análise por HPLC-MS e modelagem molecular, os autores identificaram nesta fração o composto que contribui significativamente com a atividade de inibição, tratando-se da reticulina, um composto da classe alcalóide. Os bioensaios deste estudo foram realizados com a AChE de *E. electricus* e o método empregado foi o colorimétrico de Ellman.

Reis e colaboradores ao testar extratos hexânico, diclorometanólico e acetato de etila de *O. pomaderroides* sobre a AChE de *E. electricus*, os mesmos inibiram a atividade enzimática em 92%, 71% e 74%, respectivamente, na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> (REIS et al., 2022). Os autores também analisaram os extratos por HPLC-MS e identificaram a presença do alcalóide reticulina e flavonóides derivados de quercetina e kaempferol. Os estudos realizados por

modelagem molecular também indicaram a interação da reticulina com a AChE, sendo este um composto bioativo e com significativa contribuição na atividade inibitória do extrato hexânico.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam uma nova perspectiva sobre a aplicação de biossensores de acetilcolinesterase, em virtude de utilizar um alvo específico: a acetilcolinesterase de formiga cortadeira; e ser uma nova ferramenta de triagem de extratos e análises de compostos com potenciais atividades inseticidas.

#### **4.11 Toxicidade de extratos vegetais em operárias de *Atta sexdens***

Os extratos aplicados nestes bioensaios foram: hexânico de folhas de *Ocotea* sp. (L.o), benzênico de folhas de *Solanum lycocarpum* (S.l) e etanólico de galhos de *Eugenia brasiliense* (E.b). As formigas nos tratamentos com extratos foram alimentadas com o mesmo durante todo o período do experimento (21 dias). A análise gráfica foi realizada através das determinações das porcentagens acumuladas de formigas vivas por dia para cada tratamento. Posteriormente, o tempo de sobrevivência mediana foi determinado e as curvas de sobrevivência foram comparadas por meio do teste não paramétrico “log rank”, com nível de significância de 5% (ELANDT-JOHNSON et al., 1980).

Os resultados obtidos para cada bioensaio são apresentados através da análise gráfica das curvas de sobrevivência (FIGURA 4.14) e da Tabela 4.3 que resumem as porcentagens acumuladas de mortalidade diária, o tempo de sobrevivência mediana (Md) e a interpretação do teste “log rank”.

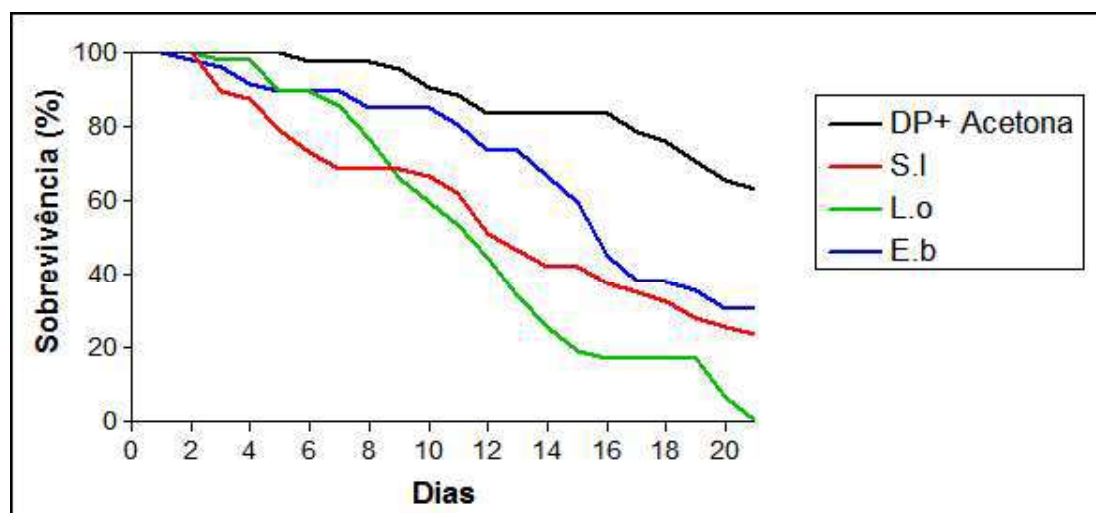


FIGURA 4.14- Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens* submetidas à dieta controle com acetona e aos extratos diluídos em acetona. DP= Dieta pura; S.I= *Solanum lycocarpum*; L.o= *Ocotea* sp; E.b= *Eugenia brasiliense*.

TABELA 4.3- Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operária de *Atta sexdens* submetidas ao bioensaio com extratos vegetais diluídos em acetona.

DIETAS	% acumulada de mortalidade por dia								Md *
	1	2	3	6	9	12	16	21	
<b>Dp + Acetona</b>	0	0	0	2	4	14	14	30	>21a
<b><i>S. lycocarpum</i> (S.I)</b>	0	0	10	26	30	46	58	70	13b
<b><i>Ocotea</i> sp. (L.o)</b>	0	0	2	10	32	52	78	88	12b
<b><i>E. brasiliense</i> (E.b)</b>	0	2	4	10	14	24	48	60	17b

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

Ao analisar a Figura 4.14 e a Tabela 4.3, os extratos mostraram toxicidade frente as operárias das cortadeiras, visualizado na diminuição das curvas de sobrevivência comparadas a curva de controle e também no tempo de sobrevivência mediana das operárias. O extrato de *S. lycocarpum* apresentou tempo de sobrevivência mediana de 13 dias, tendo alcançado o valor de 70% de taxa de mortalidade ao fim dos 21 dias de teste. O extrato de *Ocotea* sp. apresentou maior toxicidade dos extratos aplicados nos bioensaios. O tempo de sobrevivência mediana para este extrato foi de 12 dias, apresentando taxa de mortalidade para este período de 52% e 88% de mortalidade ao fim dos 21 dias de teste. O extrato com menor toxicidade às formigas foi de *E. brasiliense*, apresentando uma mediana de 17 dias e uma taxa de mortalidade de 60% ao fim de 21 dias de teste.

Estudos de diferentes gêneros de formigas e sua interação com a planta *S. lycocarpum* atestam parceria entre formiga e planta (COSTA-SILVA et al., 2024; MOREIRA; DEL-CLARO, 2005), além do consumo do material vegetal por parte do inseto, sendo a parte da planta mais aplicada para estes estudos as sementes (MELI et al., 2018; ROCHA-ORTEGA et al., 2017). Por exemplo, formigas cortadeiras de taxonomia *Atta laevigata* mostraram alto consumo de sementes da planta, com apenas 1,6% de descarte de sementes, ou seja, que não foram coletadas pelas formigas para dentro do ninho (DE ABREU TAVARES; JUNIOR; DE MORAIS, 2016). Não foi encontrado na literatura estudos relacionados ao forrageamento de folhas de *S. lycocarpum*.

Extratos de plantas do gênero *Eugenia* possuem atividades antifúngicas, antimicrobianas, antioxidante e antiviral, sendo considerada potencial planta bioativa (SOBRAL-SOUZA et al., 2014; SOOD et al., 2012; THAMBI et al., 2013; VICTORIA et al., 2012). Em bioensaios com formigas cortadeiras, extratos etanólicos de flores, folhas, galhos e sementes de *E. dysenterica* apresentaram mortalidade de 100%, 90%, 50% e 70% frente as operárias de *A. laevigata* após 72 horas de teste (teste de toxicidade diferente ao utilizado neste trabalho) (FALEIROS et al., 2022). Jung e colaboradores (2013) avaliaram a atividade inseticida de extrato etanólico de folhas e óleo essencial de *E. uniflora*, obtendo 85% e 97% de média de mortalidade em soldados de *A. laevigata* após 5 dias de teste (JUNG et al., 2013).

Do extrato com maior toxicidade frente as operárias das formigas cortadeiras, extratos de gênero *Ocotea* possuem ampla atividade inseticida contra, por exemplo, *Rhipicephalus microplus*, *Dysdercus peruvianus*, *Drosophila suzukii* e *Sitophilus zeamais* (FIGUEIREDO et al., 2018; MOSSI et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2020; TOLEDO et al., 2024). Extratos de casca e galhos de *O. brasiliensis* não apresentaram toxicidade significativa em operárias de *Atta sexdens* em bioensaios de aplicação tópica, tendo alcançado apenas 10% (extrato de casca) e 6% (extrato de galhos) de mortalidade após o tempo máximo de testes (3 dias) (GOMES et al., 2016). Não foi encontrada na literatura bioensaios em formigas cortadeiras com extratos hexânicos de folhas de plantas do gênero *Ocotea*.

## 5 CONCLUSÕES

Os biossensores eletroquímicos das acetilcolinesterases de *Atta sexdens* propostos apresentaram respostas eletroquímicas consistentes com a /imobilização efetiva das enzimas nos eletrodos impressos de carbono. Desta forma, o protocolo desenvolvido aplica-se à imobilização das enzimas acetilcolinesterases extraídas da formiga e pode ser avaliado para a imobilização de outras enzimas-alvo. Os biossensores foram aplicados com sucesso para a avaliação do efeito de inibição do pesticida malation, os LODs calculados com base nos resultados,  $9,1 \text{ nmol L}^{-1}$  para Bio-AChE A e  $4,7 \text{ nmol L}^{-1}$  para Bio-AChE B, são valores próximos a outros biossensores eletroquímicos de actilcolinesterase, demonstrando que os biossensores deste trabalho podem ser aplicados para a detecção de outros pesticidas específicos. Os biossensores foram aplicados para a triagem de extratos com potencial atividade inseticida em formigas cortadeiras, sendo que, dos extratos aplicados nos bioensaios deste trabalho, o extrato de *S. lycocarpum* apresentou significativa inibição da AChE A, inibição máxima de 80%, podendo ser avaliado para futuros testes se possui compostos bioativos para atividade anticolinesterásica. Os biossensores desenvolvidos nesse trabalho são uma nova ferramenta para a triagem de extratos bioativos.

## 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**, [S. l.], v. 146, p. 381–387, 2016.

ALINE, J.; ABREU, S. D. E.; FLÁVIA, A.; SILVA, D. A.; CONTE, H. Controle biológico por insetos parasitoides em culturas agrícolas no brasil: revisão de literatura. *Uningá Review*, [S. l.], v. 22, p. 22–25, 2015.

ÁP HART, J. Flow-injection detector incorporating a screen-printed disposable amperometric biosensor for monitoring organophosphate pesticides. **Analyst**, [S. l.], v. 122, n. 11, p. 1425–1430, 1997.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: A pharmacological interesting enzyme. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.

ARDUINI, F.; GUIDONE, S.; AMINE, A.; PALLESCHI, G.; MOSCONE, D. Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [S. l.], v. 179, p. 201–208, 2013.

ARDUINI, F.; MICHELI, L.; SCOGNAMIGLIO, V.; MAZZARACCHIO, V.; MOSCONE, D. Sustainable materials for the design of forefront printed (bio) sensors applied in agrifood sector. **TRAC Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 128, p. 115909, 2020.

**Aspectos gerais da aplicação de inseticidas.** AGROLINK, 2024. Disponível em: [https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/tecnologia-de-aplicacao/aplicacao-terrestre/como-realizar-a-aplicacao-de-inseticidas-\\_480508.html](https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/tecnologia-de-aplicacao/aplicacao-terrestre/como-realizar-a-aplicacao-de-inseticidas-_480508.html). Acesso em: 20 nov. 2024.

BALLARD, C. G.; GREIG, N. H.; GUILLOZET-BONGAARTS, A. L.; ENZ, A.; DARVESH, S. Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. **Current Alzheimer Research**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 307–318, 2005.

BAO, J.; HUANG, T.; WANG, Z.; YANG, H.; GENG, X.; XU, G.; SAMALO, M.; SAKINATI, M.; HUO, D.; HOU, C. 3D graphene/copper oxide nano-flowers based acetylcholinesterase biosensor for sensitive detection of organophosphate pesticides. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. l.], v. 279, n. May 2018, p. 95–101, 2019.

BARBOSA, L. R.; DOMINGUES, M. M.; WILCKEN, C. F.; ZANUNCIO, J. C. Eucalyptus pests. *In*: **Forest Microbiology**. [s.l.] : Elsevier, 2023. p. 227–249.

BARBOZA, H. T. G.; NASCIMENTO, P. R.; OTNIEL, F. Organophosphorus Compounds and their Role in Agriculture. *Revista Virtual de Química*. [S. l.], v. 10, n. 1, p. 172–193, 2018.

BARRERA, C. A.; SOSA-CALVO, J.; SCHULTZ, T. R.; RABELING, C.; BACCI JR, M. Phylogenomic reconstruction reveals new insights into the evolution and biogeography of *Atta* leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). **Systematic Entomology**, [S. l.], v. 47, n. 1, p. 13–35, 2022.

BARROS, G. S. C.; ALVES, L. R. A.; SANCHES, A. L. R.; OSAKI, A. de O. A. M.; MIRANDA, S. H. G. De. Efeito do não tratamento de pragas e doenças sobre

preços ao consumidor de produtos da cadeia produtiva do milho. **Cepea - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada**, [S. l.], p. 7, 2019.

BERKOV, S.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J. N-Alkylated galanthamine derivatives: Potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, [S. l.], v. 18, n. 7, p. 2263–2266, 2008.

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**, [S. l.], v. 411, p. 125026, 2021.

BHATTU, M.; VERMA, M.; KATHURIA, D. Recent advancements in the detection of organophosphate pesticides: a review. **Analytical Methods**, [S. l.], v. 13, n. 38, p. 4390–4428, 2021.

BILAL, S.; NASIR, M.; HASSAN, M. M.; UR REHMAN, M. F.; 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 NiCr 2 O 4/gC 3 N 4 composite integrated pencil graphite electrode. **RSC advances**, [S. l.], v. 12, n. 26, p. 16860–16874, 2022.

BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série técnica IPEF**, [S. l.], v. 11, n. 30, p. 31–46, 1997.

BOULOGNE, I. OZIER-LAFONTAINE, H.; LORANGER-MERCIRIS, G. Leaf-cutting ants, biology and control. **Sustainable Agriculture Reviews: Volume 13**, [S. l.], p. 1–17, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

**Analytical biochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRAGANÇA, M. A. L.; TONHASCA JR, A.; DELLA LUCIA, T. Biological and behavioral characteristics of *Neodohrniphora elongata* Brown (Diptera, Phoridae), a parasitic fly of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, [S. l.], v. 53, p. 600–606, 2009.

BRANDÃO, C. R. F.; MAYE-NUNES, A.; SANHUDO, C. E. D. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. **Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo**, [S. l.], 2011.

CATALANI, G. C.; SOUSA, K. K. A.; CAMARGO, R. S. d.; 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**, [S. l.], v. 63, n. 4, p. 290–295, 2019.

CHANG, Y.; BAI, M.; ZHANG, X.; SHEN, S.; HOU, J.; YAO, G.; HUANG, X.; SONG, S. Neuroprotective and acetylcholinesterase inhibitory activities of alkaloids from *Solanum lyratum* Thunb.: An in vitro and in silico analyses. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 209, p. 113623, 2023.

**CHBAGRO - Manejo Integrado de Pragas (MIP): Controle Genético.** CHBAGRO, 2024. Disponível em: <https://chbagro.com.br/blog/manejo-integrado-de-pragas-mip-controle-genetico>. Acesso em: 20 nov. 2024.

**CHBAGRO - Manejo Integrado de Pragas (MIP): Controle Varietal.** CHBGRO,

2024. Disponível em: <https://chbagro.com.br/blog/manejo-integrado-de-pragas-mip-controle-varietal>. Acesso em: 20 nov. 2024.

CHEN, Y.; LIU, X.; WU, T.; HOU, W.; LIU, M.; ZHANG, Y.; YAO, S. Enhanced electrochemical sensitivity towards acetaminophen determination using electroactive self-assembled ferrocene derivative polymer nanospheres with multi-walled carbon nanotubes. **Electrochimica Acta**, [S. l.], v. 272, p. 212–220, 2018.

CINTI, S.; MINOTTI, C.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G.; ARDUINI, F. Fully integrated ready-to-use paper-based electrochemical biosensor to detect nerve agents. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 93, p. 46–51, 2017.

COSTA-SILVA, V. M.; CALIXTO, E. S.; MOREIRA, X.; DEL-CLARO, K. No support for the optimal allocation to indirect plant defenses mediated by ant-hemipteran interactions. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, [S. l.], v. 65, p. 125827, 2024.

CUI, H.; WU, W.; LI, M.; SONG, X.; LV, Y.; ZHANG, T. A highly stable acetylcholinesterase biosensor based on chitosan-TiO<sub>2</sub>-graphene nanocomposites for detection of organophosphate pesticides. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 99, p. 223–229, 2018.

CURE, J. R.; RODRÍGUEZ, D.; GUTIERREZ, A. P.; PONTI, L. The coffee agroecosystem: bio-economic analysis of coffee berry borer control (*Hypothenemus hampei*). **Scientific reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 12262, 2020.

DE ABREU TAVARES, P. R.; JUNIOR, V. V. A.; DE MORAIS, G. A. Does *Atta laevigata* (Smith, 1858) act as *Solanum lycocarpum* seed dispersers?

**Sociobiology**, [S. l.], v. 63, n. 1, p. 682–687, 2016.

DE ALMEIDA, R. B. M.; CONCEIÇÃO, R. S.; DA SILVA, K. S.; DOS SANTOS JUNIOR, M. C.; BRANCO, A.; BOTURA, M. B. *Ocotea daphnifolia*: phytochemical investigation, in vitro dual cholinesterase inhibition, and molecular docking studies. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 57, p. 10, 2021.

DE BRITTO, J. S.; FORTI, L.; OLIVEIRA, M.; ZANETTI, R.; WILCKEN, C.; ZANUNCIO, J.; LOECK, A.; CALDATO, N.; NAGAMOTO, W.; LEMES, P. G.; CAMARGO, R. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Research in Environmental Studies**, [S. l.], 2016.

DE CASTRO MORAIS, W. C.; DOS ANJOS, N.; DELLA LUCIA, T. M. C. Consumo Foliar de *Eucalyptus* spp. por *Acromyrmex disciger* (Mayr, 1887)(Hymenoptera: Formicidae). **EntomoBrasilis**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 73–74, 2011.

DE LIMA, B. R.; LIMA, J.M.; MACIEL, J.B.; VALENTIM, C.Q.; NUNOMURA, R.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**, [S. l.], v. 7, p. 629, 2019.

DE OLIVEIRA, T. R.; ERBERELI, C. R.; MANZINE, P. R.; MAGALHÃES, T. N. C.; BALTHAZAR, M. L. F.; COMINETTI, M. R.; FARIA, R. C. Early Diagnosis of Alzheimer's Disease in Blood Using a Disposable Electrochemical Microfluidic

Platform. **ACS Sensors**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 1010–1019, 2020.

DELLA LUCIA, T. M. C.; ARAÚJO, M. S. Formigas cortadeiras: Atualidades no combate. **Manejo Integrado-Doenças, Pragas e Plantas Daninhas; Zanbolim, L., Ed**, [S. l.], p. 245–273, 2000.

DELLA LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. **Formigas cortadeiras da bioecologia ao manejo**, [S. l.], p. 13–26, 2011.

DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. [s.l.] : Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, 2011.

DELLA LUCIA, T. M. C.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. C. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest management science**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 14–23, 2014.

DONATO, A.; VARGAS, A. B.; MENEZES, B. F.; NUNES, F. A. Controle de formigas cortadeiras com *Penicillium* spp. proveniente de laranjas em decomposição: Aplicação em diferentes frequências avaliadas por agricultores. **Extensão em Foco**, [S. l.], n. 24, p. 230–250, 2021.

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**, [S. l.], v. 2019, 2019.

DU, D.; CHEN, S.; CAI, J.; ZHANG, A. Electrochemical pesticide sensitivity test

using acetylcholinesterase biosensor based on colloidal gold nanoparticle modified sol-gel interface. **Talanta**, [S. l.], v. 74, n. 4, p. 766–772, 2008. D

DU, D.; YE, X.; CAI, J.; LIU, J.; ZHANG, A. Acetylcholinesterase biosensor design based on carbon nanotube-encapsulated polypyrrole and polyaniline copolymer for amperometric detection of organophosphates. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 25, n. 11, p. 2503–2508, 2010.

DU, X.; WANG, J.; SUN, J.; WU, T.; CAO, X.; LIU, L.; YANG, Y. Steroidal glycoalkaloids from *Solanum lyratum* inhibit the pro-angiogenic activity of A549-derived exosomes. **Fitoterapia**, [S. l.], v. 141, p. 104481, 2020.

DZUDZEVIC CANCAR, H.; SOYLEMEZ, S.; AKPINAR, Y.; KESIK, M.; GÖKER, S.; GUNBAS, G.; VOLKAN, M.; TOPPARE, L. A Novel Acetylcholinesterase Biosensor: Core-Shell Magnetic Nanoparticles Incorporating a Conjugated Polymer for the Detection of Organophosphorus Pesticides. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. 8058–8067, 2016.

EHDIABADI, N. J. M.; CHULTZ, T. R. S. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants ( Hymenoptera : Formicidae : Myrmicinae : Attini ). [S. l.], p. 37–55, 2009.

ELIZALDE, L.; FOLGARAIT, P. J. Behavioral strategies of phorid parasitoids and responses of their hosts, the leaf-cutting ants. **Journal of Insect Science**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 135, 2012.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

FALEIROS, M. V.; FALEIROS, J. H.; OLIVEIRA, R. C.; ROCHA, E. C.; LUZ, J. M. Q.; DA SILVA ARRUDA, A. Atividade inseticida do extrato etanólico de *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) sobre formigas cortadeiras. **Scientia Plena**, [S. l.], v. 18, n. 10, 2022.

**FAO lista 5 doenças de plantas que a crise climática está agravando | As Nações Unidas no Brasil.** FAO, 2024. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/184058-fao-lista-5-doencas-de-plantas-que-crise-climatica-esta-agravando>. Acesso em: 20 nov. 2024.

FIGUEIREDO, A.; NASCIMENTO, L.M.; LOPES, L.G.; GIGLIOTI, R.; ALBUQUERQUE, R.D.D.G.; SANTOS, M.G.; FALCÃO, D.Q.; NOGUEIRA, J.A.P.; ROCHA, L.; CHAGAS, A.C.S. First report of the effect of *Ocotea elegans* essential oil on *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus. **Veterinary parasitology**, [S. l.], v. 252, p. 131–136, 2018.

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**, [S. l.], v. 90, n. 10, p. 6043–6050, 2018.

FIORE, L.; MAZZARACCHIO, V.; SERANI, A.; FABIANI, G.; FABIANI L.; VOLPE, G.; MOSCONE, D.; BIANCO, G. M.; OCCHIUZZI, C.; MARROCCO, G.; ARDUINI, F. Microfluidic paper-based wearable electrochemical biosensor for reliable cortisol detection in sweat. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [S. l.], v. 379, p. 133258, 2023.

FOLGARAIT, P.; GOROSITO, N.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. **Current microbiology**, [S. l.], v. 63, p. 250–258, 2011.

FU, J.; ZHANG, Q.; SHI, Z.; GUO, Y.; LI, F.; ZHANG, Y.; SUN, X. Sensitive acetylcholinesterase biosensor based on screen-printed carbon electrode modified with cerium oxide-chitosan/mesoporous carbon-chitosan for organophosphorus pesticide residue detection. **International Journal of Electrochemical Science**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 9231–9241, 2018.

GARCIA, A. Fungicidas I: utilização no controle químico de doenças e sua ação contra os fitopatógenos. Porto Velho: Embrapa-CPAF Rondônia, 1999.

GOMES, M. de C. A. R.; DE PAULA, V. F.; MOREIRA, A. Alves; CASTELLANI, M. A.; DE MACEDO, G. E. L. Toxicity of plant extracts from Bahia, Brazil, to *Atta sexdens* workers (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, [S. l.], v. 63, n. 2, p. 770–776, 2016.

GUAN, H.; JIANG, J.; CHEN, D.; WANG, W.; WANG, Y.; XIN, J. Acetylcholinesterase biosensor based on chitosan/ZnO nanocomposites modified electrode for amperometric detection of pesticides. *In*: 2015 International conference on materials, environmental and biological engineering 2015, Atlantis Press, 2015. p. 163–166.

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**, [S. l.], v. 23, p. 12343–12351, 2016.

HAMADA, E.; ANGELOTTI, F.; GARRIDO, L.; GHINI, R. Cenários futuros de epidemia do oídio da videira com as mudanças climáticas para o Brasil. **Revista Brasileira de Geografia Física**, [S. l.], v. 08, p. 454–470, 2015.

HE, G.; SUN, Y.; LI, F. RNA interference of two acetylcholinesterase genes in *Plutella xylostella* reveals their different functions. **Archives of insect biochemistry and physiology**, [S. l.], v. 79, n. 2, p. 75–86, 2012.

HIRASAWA, Y.; KATO, E.; KOBAYASHI, J.; KAWAHARA, N.; GODA, Y.; SHIRO, M.; MORITA, H. Lycoparins A–C, new alkaloids from *Lycopodium casuarinoides* inhibiting acetylcholinesterase. **Bioorganic & medicinal chemistry**, [S. l.], v. 16, n. 11, p. 6167–6171, 2008.

HOFER, F.; KRAML, J.; KAHLER, U.; KAMENIK, A. S.; LIEDL, K. R. Catalytic Site pKa values of aspartic, cysteine, and serine proteases: Constant pH MD simulations. **Journal of chemical information and modeling**, [S. l.], v. 60, n. 6, p. 3030–3042, 2020.

HUCHARD, E.; MARTINEZ, M.; ALOUT, H.; DOUZERY, E. J. P.; LUTFALLA, G.; BERTHOMIEU, A.; BERTICAT, C.; RAYMOND, M.; WEILL, M. Acetylcholinesterase genes within the Diptera: takeover and loss in true flies. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [S. l.], v. 273, n. 1601, p. 2595–2604, 2006.

ISTAMBOULIE, G.; CORTINA-PUIG, M.; MARTY, J.; NOGUER, T. The use of Artificial Neural Networks for the selective detection of two organophosphate insecticides: Chlorpyrifos and chlorfenvinfos. **Talanta**, [S. l.], v. 79, n. 2, p. 507–511, 2009.

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

JIANG, X.; QU, M.; DENHOLM, I.; FANG, J.; JIANG, W.; HAN, Z. Mutation in acetylcholinesterase1 associated with triazophos resistance in rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biochemical and biophysical research communications**, [S. l.], v. 378, n. 2, p. 269–272, 2009.

JUNG, P. H.; SILVEIRA, A. C.; NIERI, E. M.; POTRICH, M.; SILVA, E. R. L. Da; REFATTI, M. Atividade Inseticida de *Eugenia uniflora* L. e *Melia azedarach* L. sobre *Atta laevigata* Smith. **Floresta e Ambiente**, [S. l.], v. 20, p. 191–196, 2013.

KHAN, G. F.; WERNET, W. Design of enzyme electrodes for extended use and storage life. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 69, n. 14, p. 2682–2687, 1997.

KIM, J.; JOO, Y. R.; KWON, M.; KIM, G. H.; LEE, S. H. Mutation in ace1 associated with an insecticide resistant population of *Plutella xylostella*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 401–407, 2012. a.

KIM, Y. H.; CHA, D. J.; JUNG, J. W.; KWON, H. W.; LEE, S.H. Molecular and kinetic properties of two acetylcholinesterases from the western honey bee, *Apis mellifera*. **PLoS One**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. e48838, 2012. b.

KIM, Y. H.; CHOI, J. Y.; JE, Y. H.; KOH, Y. H.; LEE, S. H. Functional analysis and molecular characterization of two acetylcholinesterases from the German cockroach, *Blattella germanica*. **Insect Molecular Biology**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 765–776, 2010.

KIM, Y. H.; LEE, S. H. Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the Class Insecta? **Insect biochemistry and molecular biology**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 47–53, 2013.

KONO, Y.; TOMITA, T. Amino acid substitutions conferring insecticide insensitivity in Ace-paralogous acetylcholinesterase. **Pesticide biochemistry and physiology**, [S. l.], v. 85, n. 3, p. 123–132, 2006.

KUMAR, M.; GUPTA, G. P.; RAJAM, M. V. Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. **Journal of insect physiology**, [S. l.], v. 55, n. 3, p. 273–278, 2009.

KUMAR, T. H. V.; SUNDRAMOORTHY, A. K. Electrochemical biosensor for methyl parathion based on single-walled carbon nanotube/glutaraldehyde crosslinked acetylcholinesterase-wrapped bovine serum albumin nanocomposites. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 1074, p. 131–141, 2019.

LANG, G.; YAN ZHU, K.; ZHANG, C.. Can acetylcholinesterase serve as a target for developing more selective insecticides? **Current drug targets**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 495–501, 2012.

LANG, G.; ZHANG, X.; ZHANG, M.; ZHANG, C. Comparison of catalytic properties and inhibition kinetics of two acetylcholinesterases from a lepidopteran insect. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 98, n. 2, p. 175–182, 2010.

LANG, Q.; HAN, L.; HOU, C.; WANG, F.; LIU, A. A sensitive acetylcholinesterase biosensor based on gold nanorods modified electrode for detection of organophosphate pesticide. **Talanta**, [S. l.], v. 156–157, p. 34–41, 2016.

LI, G.; YAO, F.; ZHANG, L.; YUE, X.; DAI, S. Two new cytotoxic sesquiterpenoids from *Solanum lyratum*. **Chinese Chemical Letters**, [S. l.], v. 24, n. 11, p. 1030–1032, 2013.

**Linhas de Ação – Moscamed.** MOSCAMED, 2024. Disponível em: <http://moscamed.org.br/linhas-de-acao/>. Acesso em: 20 nov. 2024.

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; CALISI, A.; GIORDANO, M. E.; SCHETTINO, T. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. **BioMed research international**, [S. l.], v. 2013, 2013.

LIU, L.; GAO, X.; ZHANG, P.; FENG, S.; HU, F.; LI, Y.; WANG, C. Ultrasensitive detection of ferulic acid using poly (diallyldimethylammonium chloride) functionalized graphene-based electrochemical sensor. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, [S. l.], v. 2014, 2014.

LU, J.; SHAN, X. WU, Q.; ZHAO, Y.; LI, C.; LI, H.; YANG, S.; TIAN, L. ZnO-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> based electrochemiluminescence sensor for sensitive detection of malathion. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 186, p. 108321, 2023.

LU, Y.; PARK, Y.; GAO, X.; ZHANG, X.; YAO, J.; PANG, Y.; JIANG, H.; ZHU, K.. Cholinergic and non-cholinergic functions of two acetylcholinesterase genes revealed by gene-silencing in *Tribolium castaneum*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 288, 2012.

LUO, R.; FENG, Z.; SHEN, G.; XIU, Y.; ZHOU, Y.; NIU, X.; WANG, H. Acetylcholinesterase biosensor based on mesoporous hollow carbon spheres/core-shell magnetic nanoparticles-modified electrode for the detection of

organophosphorus pesticides. **Sensors**, [S. l.], v. 18, n. 12, p. 4429, 2018.

**Manejo integrado de pragas e doenças - Portal Embrapa**. EMBRAPA, 2024.

Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/producao/manejo/fitossanidade/manejo-integrado-de-pragas-e-doencas>. Acesso em: 20 nov. 2024.

MANI, V.; CHIKKAVEERIAH, B. V.; PATEL, V.; GUTKIND, J. S.; RUSLING, J. F. Ultrasensitive immunosensor for cancer biomarker proteins using gold nanoparticle film electrodes and multienzyme-particle amplification. **ACS Nano**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 585–594, 2009.

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

MATOŠEVIĆ, A.; BOSAK, A. Carbamate group as structural motif in drugs: A review of carbamate derivatives used as therapeutic agents. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, [S. l.], v. 71, n. 4, p. 285–299, 2020.

MATRANGOLO, C. A. R.; CASTRO, R. V. O.; LUCIA, T. M. C. D.; LUCIA, R. M. D.; MENDES, A. F. N.; COSTA, J. M. F. N.; LEITE, H. G. Crescimento de eucalipto sob efeito de desfolhamento artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S. l.], v. 45, p. 952–957, 2010.

MCHARDY, S. F.; WANG, H. L.; MCCOWEN, S. V.; VALDEZ, M. C. Recent advances in acetylcholinesterase Inhibitors and Reactivators: an update on the

patent literature (2012-2015). **Expert opinion on therapeutic patents**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 455–476, 2017.

MELI, P.; ISERNHAGEN, I.; BRANCALION, P. H. S.; ISERNHAGEN, E. C. C.; BEHLING, M.; RODRIGUES, R. R. Optimizing seeding density of fast-growing native trees for restoring the Brazilian Atlantic Forest. **Restoration Ecology**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 212–219, 2018.

MIRANDA, J. E. Manejo Integrado de Pragas do Algodoeiro no Cerrado Brasileiro. **Embrapa - Circular Técnica**, [S. l.], v. 131, n. 1989, p. 36, 2010.  
Disponível em:  
[https://www.cnpa.embrapa.br/aunidade/MIP\\_algodoeiro\\_2013.pdf](https://www.cnpa.embrapa.br/aunidade/MIP_algodoeiro_2013.pdf).

MONTOYA-LERMA, J.; GIRALDO-ECHEVERRI, C.; ARMBRECHT, I.; FARJIBRENER, A.; CALLE, Z. Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. **International Journal of Pest Management**, [S. l.], v. 58, n. 3, p. 225–247, 2012.

MOREAU, R. L. de M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Ciências farmacêuticas: toxicologia analítica. **2ª edição. Rio de Janeiro**, [S. l.], 2015.

MOREIRA, V. S. S.; DEL-CLARO, K. The outcomes of an ant-treehopper association on *Solanum lycocarpum* St. Hill: increased membracid fecundity and reduced damage by chewing herbivores. **Neotropical Entomology**, [S. l.], v. 34, p. 881–887, 2005.

MORESSI, M.; NETO, A. M.; CREPALDI, R. A.; CARBONARI, V.; DEMÉTRIO, M. F.; SILVESTRE, R. A eficiência do controle mecânico de formigas cortadeiras (*atta laevigata*) no reflorestamento com espécies nativas. **Biológico, São Paulo**,

[S. l.], v. 69, n. suplemento 2, p. 471–473, 2007.

MORGAN, E. D. Chemical sorcery for sociality: exocrine secretions of ants (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecol News**, [S. l.], v. 11, p. 79–90, 2008.

MOSSI A. J.; ZANELLA, C. A.; KUBIAK, G.; LERIN, L. A.; CANSIAN, R. L.; FRANDOLOSO, F. S.; PRÁ, V. D.; MAZUTTI, M. A.; COSTA, J. A. V.; TREICHEL, H. Essential oil of *Ocotea odorifera*: An alternative against *Sitophilus zeamais*. **Renewable Agriculture and Food Systems**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 161–166, 2014.

MOTA FILHO, T. M. M.; STEFANELLI, L. E. P.; CAMARGO, R. da S.; MATOS, C. A. O. De; FORTI, L. C. Biological control in leaf-cutting ants, *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), using pathogenic fungi. **Revista Árvore**, [S. l.], v. 45, 2021.

NASCIMENTO, L. M.; APOLINARIO, R.; MACHADO, F. P.; CORREA, A. L.; CALDAS, G. R.; RUPPELT, B. M.; SOUZA, K. F. C.; GOUVEIA, G.; BURTH, P.; FALCAO, D. Q.; SANTOS, M. G.; AZAMBUJA, P.; GONZALEZ, M. S.; MELLO, C. B.; ROCHA, L.; FEDER, D. Effects of nanoemulsion and essential oil from the leaves of *Ocotea elegans* against *Dysdercus peruvianus*. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. e909108424–e909108424, 2020.

NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por “silk-screen”. **Quimica Nova**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 614–629, 1998.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. de A.; BATISTUZZO, J. A. de O. Fundamentos de toxicologia. *In: Fundamentos de toxicologia*. [s.l: s.n.]. p. 677.

OGUNSUYI, O. B.; ADEMILUYI, A. O.; OBOH, G. *Solanum leaves* extracts exhibit antioxidant properties and inhibit monoamine oxidase and acetylcholinesterase activities (in vitro) in *Drosophila melanogaster*. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, [S. l.], v. 31, n. 3, 2020.

OLIVERA, S.; RODRIGUEZ-ITHURRALDE, D.; HENLEY, J. M. Acetylcholinesterase promotes neurite elongation, synapse formation, and surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurones. **Molecular and Cellular Neuroscience**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 96–106, 2003.

ORTIZ, J.E.; GARRO, A.; PIGNI, N. B.; AGÜERO, M.B.; ROITMAN, G.; SLANIS, A.; ENRIZ, R.D.; FERESIN, G.E.; BASTIDA, J.; TAPIA A. Cholinesterase-inhibitory effect and in silico analysis of alkaloids from bulbs of *Hieronymiella* species. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 39, p. 66–74, 2018.

OUJJI, N. B.; BAKAS, I.; ISTAMBOULIÉ, G.; AIT-ICHOU, I.; AIT-ADDI, E.; ROUILLON, R.; NOGUER, T. Sol–gel immobilization of acetylcholinesterase for the determination of organophosphate pesticides in olive oil with biosensors. **Food Control**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 657–661, 2013.

PANG, Y.; BRIMIJOIN, S.; WRAGSDALE, D.; YAN ZHU, K.; SURANYI, R. Novel and viable acetylcholinesterase target site for developing effective and environmentally safe insecticides. **Current drug targets**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 471–482, 2012.

PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. *Trichogramma* in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. **Neotropical Entomology**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 271–281, 2004.

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

**Pragas agrícolas: como fazer o controle de maneira eficiente?** AGRIQ, 2024. Disponível em: <https://agriq.com.br/controle-de-pragas/>. Acesso em: 20 nov. 2024.

**Principais pragas na agricultura do Brasil - Sensix Blog.** SENSIX, 2024. Disponível em: <https://blog.sensix.ag/principais-pragas-na-agricultura-do-brasil/>. Acesso em: 20 nov. 2024.

PUNDIR, C. S.; CHAUHAN, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 429, n. 1, p. 19–31, 2012. DOI: 10.1016/j.ab.2012.06.025.

QI, J.; TAN, D.; WANG, X.; MA, H.; WAN, Y.; HU, A.; LI, L.; XIAO, B.; LU, B. A novel acetylcholinesterase biosensor with dual-recognized strategy based on molecularly imprinted polymer. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [S. l.], v. 337, p. 129760, 2021.

RAGHU, P.; REDDY, T. M.; REDDAIAH, K.; SWAMY, B. E. K.; SREEDHAR, M. Acetylcholinesterase based biosensor for monitoring of malathion and acephate in food samples: A voltammetric study. **Food chemistry**, [S. l.], v. 142, p. 188–196, 2014.

RAGHU, P.; REDDY, T. M.; SWAMY, B. E. K.; CHANDRASHEKAR, B. N.; REDDAIAH, K.; SREEDHAR, M. Development of AChE biosensor for the determination of methyl parathion and monocrotophos in water and fruit samples:

A cyclic voltammetric study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 665, p. 76–82, 2012.

REIS FILHO, W.; SANTOS, F. Dos; STRAPASSON, P.; NICKELE, M. A. Damage caused by different levels of artificial defoliation, simulating the leaf-cutting ants attack on young plantations of *Pinus taeda* and *Eucalyptus grandis*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, [S. l.], v. 31, n. 65, p. 37–42, 2011.

REIS, I. M. A.; CASSIANO, D. S. A.; CONCEIÇÃO, R. S.; FREITAS, H. F. De; PITA, S. S. da R.; DAVID, J. M.; BRANCO, A. Acetylcholinesterase inhibitory activity of *Ocotea pomaderroides* extracts: HPLC-MS/MS characterization and molecular modeling studies. **Natural Product Research**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 999–1003, 2022.

**Relatórios de comercialização de agrotóxicos — Ibama**. IBAMA, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 20 nov. 2024.

REVUELTA, L.; PIULACHS, M.-D.; BELLÉS, X.; CASTAÑERA, P.; ORTEGO, F.; DÍAZ-RUÍZ, J. R.; HERNÁNDEZ-CRESPO, P.; TENLLADO, F. RNAi of *ace1* and *ace2* in *Blattella germanica* reveals their differential contribution to acetylcholinesterase activity and sensitivity to insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 39, n. 12, p. 913–919, 2009.

PARRA, J. R. P.; COSTA, V. A.; PINTO, A. S. Insetos parasitoides. *Ciência e Ambiente* 43: 19-36, 2011.

ROCHA-ORTEGA, M.; BARTIMACHI, A.; NEVES, J.; BRUNA, E. M.;

VASCONCELOS, H. L. Seed removal patterns of pioneer trees in an agricultural landscape. **Plant Ecology**, [S. l.], v. 218, p. 737–748, 2017.

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**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 16, 2018.

ROMAN, E. S.; BECKIE, H.; VARGAS, L.; HALL, L.; RIZZARDI, M. A.; WOLF, T. M. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. [s.l.] : Berthier Passo Fundo, 2007.

SICILIANO, G.; ALSADIG, A.; CHIRIACÒ, M. S.; TURCO, A.; FOSCARINI, A.; FERRARA, F.; GIGLI, G.; PRIMICERI, E. Beyond traditional biosensors: Recent advances in gold nanoparticles modified electrodes for biosensing applications. **Talanta**, [S. l.], p. 125280, 2023.

SILBERMAN, J.; TAYLOR, A. Carbamate toxicity. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2018.

SILVA, D. E. M. Da; AZEVEDO, L. A. S. De; POLTRONIERI, T. P. de S. Avaliação da resistência de espécies de eucalipto à ferrugem (*Puccinia psidii* Winter). **Summa Phytopathologica**, [S. l.], v. 40, p. 54–62, 2014.

SOBRAL-SOUZA, C. E.; LEITE, N. F.; CUNHA, F. A. B.; PINHO, A. I.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de *Eugenia uniflora* Lineau e *Psidium sobleleanum* contra metais pesados. **Revista Ciencias de la Salud**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 401–409, 2014.

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**, [S. l.], v. 75, n. 2, p. 117–123, 2009.

SOOD, R.; SWARUP, D.; BHATIA, S.; KULKARNI, D. D.; DEY, S.; SAINI, M.; DUBEY, S. C. Antiviral activity of crude extracts of *Eugenia jambolana* Lam. against highly pathogenic avian influenza (H5N1) virus. [S. l.], 2012.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 294–302, 2001.

SOTIROPOULOU, S.; VAMVAKAKI, V.; CHANIOTAKIS, N. A. Stabilization of enzymes in nanoporous materials for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 20, n. 8, p. 1674–1679, 2005.

SOUZA, J. L. De.; SANTOS, J. A.; MARJOTTA-MAISTRO, M. C.; MONTEBELLO, A. E. S. Principais ingredientes ativos dos agroquímicos: aplicação e uso no Brasil. *Revista De Gestão E Secretariado*, 14(6), 9842–9863, 2023.

STOYTICHEVA, M. **Pesticides: The impacts of pesticides exposure**. [s.l.] : BoD—Books on Demand, 2011.

SUN, X.; WANG, X. Acetylcholinesterase biosensor based on prussian blue-modified electrode for detecting organophosphorous pesticides. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 25, n. 12, p. 2611–2614, 2010.

SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.;

TOKER, L.; SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, [S. l.], v. 253, n. 5022, p. 872–879, 1991.

THAMBI, M.; TAVA, A.; MOHANAKRISHNAN, M.; SUBBURAJ, M.; PRADEEPKUMAR, K. M.; SHAFI, P. M. Composition and antimicrobial activities of the essential oil from *Eugenia uniflora* L. leaves growing in India. **J Pharm Biomed Sci**, [S. l.], v. 4, p. 46–49, 2013.

TOLEDO, M. A. De; RIBEIRO, P. L.; CARROSSONI, P. S. F.; TOMOTANI, J. V.; HOFFMAN, A. N.; KLEBANER, D.; WATEL, H. R.; IANNINI, C. A. N.; HELENE, A. F. Two castes sizes of leafcutter ants in task partitioning in foraging activity. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 46, p. 1902–1908, 2016.

TOLEDO, P. F. S.; DA CRUZ ARAUJO, S. H.; MANTILLA AFANADOR, J. G.; SILVA, A. C. F.; MACHADO, F. P.; ROCHA, L. M.; OLIVEIRA, E. E. Potential of *Ocotea indecora* essential oil for controlling *Drosophila suzukii*: Molecular predictions for toxicity and selectivity to beneficial arthropods. **Neotropical Entomology**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 189–199, 2024.

TOUTANT, J. P. Insect acetylcholinesterase: Catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. **Progress in Neurobiology**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 423–446, 1989.

TRANG, A.; KHANDHAR, P. B. Physiology, acetylcholinesterase. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019.

TSOUNIDI, D.; SOULIS, D.; MANOLI, F.; KLINAKIS, A.; TSEKENIS, G. AChE-based electrochemical biosensor for pesticide detection in vegetable oils: matrix

effects and synergistic inhibition of the immobilized enzyme. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. I.], v. 415, n. 4, p. 615–625, 2023.

TUN, W. S. T.; 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**, [S. I.], v. 13, n. 14, p. 9603–9614, 2023.

VALDÉS-RAMÍREZ, G.; CORTINA, M.; RAMÍREZ-SILVA, M. T.; MARTY, J.-L. Acetylcholinesterase-based biosensors for quantification of carbofuran, carbaryl, methylparaoxon, and dichlorvos in 5% acetonitrile. **Analytical and bioanalytical chemistry**, [S. I.], v. 392, p. 699–707, 2008.

VASCONCELOS, H. L.; CHERRETT, J. M. Leaf-cutting ants and early forest regeneration in central Amazonia: effects of herbivory on tree seedling establishment. **Journal of Tropical Ecology**, [S. I.], v. 13, n. 3, p. 357–370, 1997.

VERZA, S. S.; FORTI, L. C.; MATOS, C. A. O.; GARCIA, M. G.; NAGAMOTO, N. S. Attractiveness of citrus pulp and orange albedo extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, [S. I.], v. 47, n. 2, p. 391–400, 2006.

VICTOR, S.R.; CRISÓSTOMO, F.R.; BUENO, F.C.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J.B.; CORREA, A.G.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.; BACCI, J. M.; VIEIRA, P.C.; DA SILVA, M. F. Toxicity of synthetic piperonyl compounds to leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. **Pest Management Science**, [S. I.], v. 57, n. 7, p. 603–608, 2001.

VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; DA SILVA, W. P.; DA MOTTA, A. de S.; DA SILVA NASCENTE, P. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. **Food and chemical toxicology**, [S. l.], v. 50, n. 8, p. 2668–2674, 2012.

VINHA, G. L.; ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R.; DELLA LUCIA, T. M. C.; WILCKEN, C. F.; DA SILVA, E. D.; LEMES, P. G.; ZANUNCIO, J. C. Leaf-cutting ants in commercial forest plantations of Brazil: Biological aspects and control methods. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**, [S. l.], v. 82, n. 2, p. 95–103, 2020.

WALGENBACH, J. F. Integrated pest management strategies for field-grown tomatoes. **Sustainable Management of Arthropod Pests of Tomato**, [S. l.], p. 323–339, 2018.

WAN, Y.; WANG, H.; ZHANG, L.; CHEN, Y.; LI, S.; ZHOU, J.; ZHANG, Q.; XIA, L. Highly stable acetylcholinesterase electrochemical biosensor based on polymerized ionic liquids microgel for pesticides detection. **Microchimica Acta**, [S. l.], v. 189, n. 8, p. 300, 2022.

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**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. e0231981, 2020. a.

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**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 1–16, 2020. b.

WANG, X.; YANG, S.; SHAN, J.; BAI, X. Novel electrochemical acetylcholinesterase biosensor based on core-shell covalent organic framework@ multi-walled carbon nanotubes (COF@ MWCNTs) composite for detection of malathion. **International Journal of Electrochemical Science**, [S. l.], v. 17, n. 5, p. 220543, 2022.

WARE, G. W. **The pesticide book**. Thomson Publications, 1989.

WEN, L.; WANG, J.; LIU, Z.; TAO, C.; RAO, J.; HANG, J.; LI, Y. A portable acetylcholinesterase-based electrochemical sensor for field detection of organophosphorus. **RSC advances**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 6389–6395, 2023.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J.; SANTOS, J. C.; DA SILVA, W. L. P.; RIBEIRO, G. T.; LEMES, P. G. An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. **Forests**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 439–454, 2014.

ZANETTI, R.; DIAS, N.; REIS, M.; SOUZA-SILVA, A.; MOURA, M. A. Eficiência de iscas granuladas (sulfluramida 0, 3%) no controle de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). **Ciência e Agrotecnologia**, [S. l.], v. 28, p. 878–882, 2004.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; MAYHÉ-NUNES, A. J.; MEDEIROS, A. G. B.; SOUZA-SILVA, A. Combate sistemático de formigas-cortadeiras com iscas granuladas, em eucaliptais com cultivo mínimo. **Revista Árvore**, [S. l.], v. 27, p. 387–392, 2003. a.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SOUZA-SILVA, A.; ABREU, L. G. De. Eficiência de isca formicida aplicada sobre o monte de terra solta de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, [S. l.], v. 27, p. 407–410, 2003. b.

ZHAN, Z.-J.; YU, Q.; WANG, Z.-L.; SHAN, W.-G. Indole alkaloids from *Ervatamia hainanensis* with potent acetylcholinesterase inhibition activities. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, [S. l.], v. 20, n. 21, p. 6185–6187, 2010.