

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

EFEITOS DO ÁCIDO BÓRICO NO PERFIL DE EXPRESSÃO PROTÉICA EM  
*CAMPOONOTUS VITTATUS* (HYMENOPTERA: FORMICINAE)

LUCIANA DE OLIVEIRA ALMEIDA

UBERLÂNDIA – MG

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITOS DO ÁCIDO BÓRICO NO PERFIL DE EXPRESSÃO PROTÉICA EM  
*CAMPONOTUS VITTATUS* (HYMENOPTERA: FORMICINAE)**

LUCIANA DE OLIVEIRA ALMEIDA

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética)

UBERLÂNDIA – MG

2006

## FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

A447e Almeida, Luciana de Oliveira, 1979 -  
Efeitos do ácido bórico no perfil de expressão protéica em *Campo-notus vittatus* (Hymenoptera: Formicinae) / Luciana de Oliveira Almeida. - Uberlândia, 2006.  
82f. : il.  
Orientador: Ana Maria Bonetti.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.  
1. Formiga - Teses. I. Bonetti, Ana Maria. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 595.796

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITOS DO ÁCIDO BÓRICO NO PERFIL DE EXPRESSÃO PROTÉICA EM  
*CAMPONOTUS VITTATUS* (HYMENOPTERA: FORMICINAE)**

**LUCIANA DE OLIVEIRA ALMEIDA**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Presidente: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti (Orientadora)

Examinadores:

Prof. Dr. José César Rosa

Prof. Dr. Jacques Delabie

Data de Defesa: 28/02/2006

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da  
Dissertação foram contempladas

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti**

*Ao meu pai, Jorge, por sempre acreditar em mim  
À minha mãe, Nílza, pela compreensão  
As minhas irmãs, Geórgia e Nádia,  
pelo carinho demonstrado  
Aos meus afilhados, Eduarda, Gustavo e Mateus,  
sempre muito amados  
Ao meu querido cunhado, Valdir,  
pela esperança e fé transmitidas.  
Aos meus amigos, que sempre estenderam as mãos e  
ofereceram os ombros nos momentos certos, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela família da qual me fez parte, pelos amigos e anjos colocados em meu caminho.

A Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti, pela orientação desse trabalho, por acreditar em minha capacidade.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart pelo apoio, conhecimento e segurança transmitidos.

A Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Veridiana de Melo R. Ávila, Prof. Dr. Robson Carlos Antunes e Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Hérica Lima do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais que muito contribuíram para sanar minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Malcon A. M. Brandeburgo, pelo bom humor e lógico, por “uma banda de reegae”, que ao final viraram muitas bandas.

Ao mestre e companheiro, Marcus Teixeira Marcolino, por acompanhar meu crescimento científico e fazer parte dele.

Aos amigos Waldesse Pirage e Jaqueline pela atenção e apoio quando o desespero e o cansaço aumentavam com a falta de resultados.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular, em especial, Guilherme Rocha, Juliana Franco, Ana Paula Freschi, Alexandra Cardoso, Rone Cardoso, Paula Cristina, Adriana Neves, Sílvia Ferreira, Luciana Bueno, Elisângela Cordeiro e Carlos Prudêncio.

Aos “meninos do Milton”, Rogério de Freitas, Gabriel Costa, Vinícius Luis, Decivaldo Dias e Hugo Cristiano pela paciência em solucionar minhas dúvidas a respeito das proteínas.

A turma dos “chuchus”, Andréia Capaneli, Johara Boldrini e Renata Santos, obrigada pelas palavras, risadas, cinemas e preocupações com “a tese que nunca tinha resultados”.

A todos os meus amigos e irmãos que ganhei no Laboratório de Genética do Comportamento, Boscolli Barbosa, Camila Cologna, Cícero Donizete, Cristiano Menezes, Daniela Beraldo, Gustavo Borges, Isabel Marques, Juliana Côbo, Luciana Londe, Marcela Silva, Milla Baffi, Patrícia Marteleto, Renato Pereira e Wellington Silva, cada qual com seu jeitinho único e feliz de ser, muito obrigada por vocês estarem sempre presentes.

Ana Carolina Siquieroli, Cristina Soares, Carlos Ueira e Flávia Santana, nem sei como agradecer, não há palavras que definam como vocês foram importantes nessa minha caminhada, se hoje estou com a tese pronta, devo também a vocês.

A minha irmã, Narcisa Soares, pelas grandes idéias e conselhos, dentro e fora do laboratório.

Ao Fausto E. Capparelli, meu irmão que amo demais. Sem ele e sua bioinformática não teria o que discutir nessa tese. Obrigada por tudo, todo apoio, paciência e compreensão, a casa quando fiquei até tarde no laboratório, o ombro

quando precisei chorar, o abraço quando precisei de carinho, enfim, a presença constante em minha vida.

A todos os velhos amigos, Ana Líssa Arantes, Graciele Barbosa, Ione Capparelli, Júlia Lima, Natália Moreira, Roberta Pacheco, Susana Miura e novos amigos, Maíra Rodovalho, Raphaela Yokota, Martha Assis, Cynthia Tinôco, Sérgio Lemes e Humberto Ignácio, que de algum modo, colaboraram para o término da tese.

E por fim, um agradecimento mais que especial, a uma grande pessoa, uma irmã que ganhei nessa maratona chamada mestrado. Cynara Rodovalho, muitíssimo obrigada, pelo companheirismo e dedicação, pelas palavras ditas nas horas que precisava ouvir, por não me deixar cair e desanimar, por não desistir dessa amiga cabeça dura e acreditar que no final tudo termina bem, obrigada de coração.

Ao CNPq e UFU, pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS - AMINOÁCIDOS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO GERAL	xvi
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO GERAL	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	09
CAPÍTULO I	18
RESUMO	19
ABSTRACT	21
INTRODUÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS	24
Material Biológico	24
Extração de Proteína e Teste Eletroforético	25
Digestão Tripsínica	26
Espectrometria de Massa	27
Bioinformática	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

<b>CAPÍTULO II</b>	55
RESUMO	56
ABSTRACT	57
INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS	61
Material Biológico	61
Preparo das Amostras	62
Teste Eletroforético	63
Identificação das Esterases	63
Teste com inibidores	64
RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
CONCLUSÕES GERAIS	78
ANEXOS	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
aa	Aminoácido
AChE	Acetilcolinesterase
ArgK	Arginina Quinase
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Soro albumina bovina
CaEs	Carboxilesterase
CID	<i>Collision-induced dissociation</i>
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
EGTA	Etileno glicol-bis (β-aminoetil éter) N, N, N', N'- ácido tetracético
EST	Esterase
kDa	Kilo Dalton
kV	Kilovolt
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Espectrometria de massa
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometer</i>
nm	nanômetro
OPs	Organofosforados
PAGE	Gel de poliacrilamida
pH	Potencial Hidrogeniônico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
sp. e spp	Qualquer nome específico para um táxon

**LISTA DE ABREVIATURAS**  
**AMINOÁCIDOS**

Ala ou A	Alanina
Arg ou R	Arginina
Asn ou N	Asparagina
Asp ou D	Aspartato ou Ácido aspártico
Cys, Cis ou C	Cisteína
Phe, Fen ou F	Fenilalanina
Gly, Gli ou G	Glicina ou Glicocola
Glu ou E	Glutamato ou Ácido glutâmico
Gln ou Q	Glutamina
His ou H	Histidina
Ile ou I	Isoleucina
Leu ou L	Leucina
Lys, Lis ou K	Lisina
Met ou M	Metionina
Pro ou P	Prolina
Ser ou S	Serina
Tyr, Tir ou Y	Tirosina
Thr, The ou T	Treonina
Trp, Tri ou W	Triptofano
Val ou V	Valina

## LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	Pág.
<b>Tabela 1:</b> Alinhamento (MATCH) das seqüências dos peptídeos deduzidos e reformulados da banda C-5 (43kDa) de <i>C. vittatus</i> com a seqüência de Arginina Quinase de <i>A. mellifera</i> (NP_001011603).	44
<b>Tabela 2:</b> Alinhamento do peptídeo VSSTLSGQVELK de <i>C. vittatus</i> por ClustalW, com seqüências de Arginina quinase de vários artrópodes, mostrando a posição de alinhamento.	45
<b>Tabela 3:</b> Alinhamento do peptídeo LIDDHFLFK de <i>C. vittatus</i> por ClustalW, com seqüências de Arginina Quinase de vários artrópodes, mostrando a posição de alinhamento.	46
<b>Tabela 4:</b> Alinhamento do peptídeo LPFSHNDR de <i>C. vittatus</i> por ClustalW, com seqüências de Arginina Quinase de vários artrópodes, mostrando a posição de alinhamento.	46
<b>Tabela 5:</b> Alinhamento do peptídeo LGLTEYQAVK de <i>C. vittatus</i> por ClustalW, com seqüências de Arginina quinase de vários artrópodes, mostrando a posição de alinhamento.	47

**Tabela 6:** Alinhamento do peptídeo EMNDGIAELIK de *C. vittatus* por 47  
ClustalW, com seqüências de Arginina quinase de vários  
artrópodes, mostrando a posição de alinhamento.

**CAPÍTULO II** Pág.

**Tabela 1:** Efeito de inibidores sobre as esterases de *C. vittatus* 69  
detectadas no Grupo Controle e no Grupo Tratado com  
ácido bórico.

(-) ausência de inibição;  
(+, ++, +++) níveis crescentes de inibição.

## LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO	Pág.
<b>Fig. 1:</b> <i>Camponotus</i> spp – formiga carpinteira (crédito: Alex Wild 2003).	04
<b>Fig. 2:</b> <i>C. vittatus</i> A) Ninho; B) Macho (alado) e operária; C) Rainha fisogástrica. (crédito: Cristiano Menezes 2005).	08
CAPÍTULO I	
<b>Fig. 1:</b> Perfil eletroforético em gel gradiente (5 a 22%) de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 15 µg de proteína total de formigas Controle (C) e Tratadas (T) com ácido bórico. M – Marcador de Alto Peso Molecular. Coloração por <i>Comassie Blue</i> R250. Setas indicam bandas diferencialmente expressas.	29
<b>Fig. 2:</b> Espectro de massa dos peptídeos obtidos por digestão <i>in situ</i> com tripsina em gel de poliacrilamida da banda T-1 (220kDa).	31
<b>Fig. 3:</b> Espectro de massa do peptídeo QEYLxEAGTK obtido por digestão <i>in situ</i> com tripsina em gel de poliacrilamida da banda T-3 (87kDa).	33

- Fig. 4:** Espectro de massa do peptídeo VADSTSANAVK obtido por digestão *in situ* com tripsina em gel de poliacrilamida da banda T-3 (87kDa). 34
- Fig. 5:** Espectro de massa do peptídeo [ALx]NSESDPPNLxVER obtido por digestão *in situ* com tripsina em gel de poliacrilamida da banda T-3 (87kDa). 35
- Fig. 6:** Espectro de massa do peptídeo LxPFSNHDR obtido por digestão *in situ* com tripsina em gel de poliacrilamida da banda C-5 (43kDa). 37
- Fig. 7:** Espectro de massa do peptídeo LxGLxTELxGYQK obtido por digestão *in situ* com tripsina em gel de poliacrilamida da banda C-5 (43kDa). 38
- Fig. 8:** Espectro de massa do peptídeo LxLxDDHFLxFK obtido por digestão *in situ* com tripsina em gel de poliacrilamida da banda C-5 (43kDa). 39
- Fig. 9:** Espectro de massa do peptídeo FLxDDTLxGSHTK obtido por digestão *in situ* com tripsina em gel de poliacrilamida da banda C-5 (43kDa). 40

- Fig. 10:** Espectro de massa do peptídeo VSSTLxSGQVELxK obtido por digestão *in situ* com tripsina em gel de poliacrilamida da banda C-5 (43kDa). 41
- Fig. 11:** Alinhamento da proteína Arginina quinase de *A. mellifera* (NP\_001011603) com as seqüências deduzidas da banda C-5 de *C. vittatus*. 42
- Fig. 12:** Alinhamento da proteína Arginina quinase de *A. mellifera* (NP\_001011603) com as seqüências deduzidas e reformuladas da banda C-5 de *C. vittatus*. 44

- CAPÍTULO II** **Pág.**
- Fig. 1:** Formigas *C. vittatus* mantidas no Laboratório de Genética do Comportamento. 61
- Fig. 2:** Perfil esterásico de *C. vittatus* submetidos à coloração com  $\alpha$  naftil-acetato e  $\beta$  naftil-acetato. C - Grupo Controle e T - Grupo Tratado. Gel de poliacrilamida 10% não desnaturante. 67

**Fig. 3:** Zimograma representativo de presença e ausência das regiões 68  
esterásicas dos indivíduos de *C. vittatus* submetidos à  
coloração com  $\alpha$  naftil-acetato e/ou  $\beta$  naftil-acetato. C - grupo  
Controle e T - grupo Tratado.

## RESUMO GERAL

Iscas líquidas de ácido bórico, em baixas concentrações, têm-se mostrado eficientes para o controle de formigas carpinteiras, agindo lentamente, sendo bem distribuídas na colônia por trofalaxia sem serem repelidas, além de não prejudicarem organismos não-alvos. Devido à predominância de *Camponotus vittatus* em residências de Uberlândia-MG e a quase inexistência de trabalhos a respeito da biologia, fisiologia e métodos de controle dessa formiga, esse trabalho teve por objetivo analisar os efeitos que a ingestão do ácido bórico pode provocar na expressão de proteínas desse inseto, visando subsidiar propostas de controle. Foi analisado o perfil protéico, através de eletroforese SDS-PAGE e espectrometria de massa, e esterásico por eletroforese e testes de inibição. Os resultados mostraram que o ácido bórico alterou a expressão de várias proteínas. Duas bandas foram capazes de gerar fragmentos tripsínicos que após análise por bioinformática indicaram alta similaridade de uma delas com a enzima arginina quinase. Com relação ao perfil de esterases, duas tiveram sua expressão aumentada no grupo tratado com ácido bórico e uma foi observada somente neste grupo, colocando tais enzimas como candidatas a esterases-resistência específicas, utilizadas pelas formigas na tentativa de detoxificação e/ou resistência ao ácido bórico.

PALAVRAS-CHAVE: *Camponotus vittatus*, ácido bórico, perfil protéico.

## ABSTRACT

Boric acid aqueous bait, in lower concentrations, have been showed efficient for the control of carpenter ants, acting slowly and being well distributed in the colony by trofalaxis, without repellence, and besides this, they don't injury non-target organisms. Because of the prevalence of *Camponotus vittatus* in residences in Uberlândia-MG and because there aren't almost any works about its biology, physiology and methods for the control of this ant, this study had the objective to analyze the effects that boric acid ingestion can cause in this insect protein expression aiming to support control proposals. The protein profile was analyzed by SDS-PAGE electrophoreses and mass spectrometry and the esterasic profile by electrophoreses and inhibition tests. The results showed that the boric acid changed the expression of many proteins. Two bands were able to generate trypsinic fragments which indicated, after bioinformatics analysis, similarity of one band with the enzyme arginine kinase. About the esterasic profile, two of them had their expression increased in the group treated with boric acid and one was observed only in this group, what put this enzymes as candidates to specific resistance esterases, used by ants as an attempt to detoxification and/or resistance to boric acid.

KEY-WORDS: *Camponotus vittatus*, boric acid, protein profile.

---

## INTRODUÇÃO GERAL

---

A urbanização é um produto do crescimento populacional humano e da industrialização, que tem se acelerado nos últimos 40 anos. Em 1960, um terço da população mundial morava em cidades; hoje, quase metade da população e, por volta de 2030, aproximadamente 90% das pessoas viverá em áreas urbanas (UNFRA, 2005).

Com essa explosão populacional, o surgimento das chamadas pragas urbanas é uma consequência inevitável. A ação do homem na utilização indiscriminada dos recursos naturais vem modificando seus *habitats* e tornando-os adequados para o aumento populacional de várias espécies (PANIZZI & PARRA, 1991).

As pragas urbanas consistem de animais que infestam ambientes urbanos, podendo causar agravos à saúde e prejuízos econômicos (ATHAYDE, 2000). Dentre elas podemos citar baratas, mosquitos, ácaros, carapatos, cupins e formigas.

As formigas, na maioria dos ecossistemas, constituem um dos maiores grupos, tanto na riqueza de espécies quanto na abundância e número de indivíduos, compondo, aproximadamente, um terço da biomassa global entre os insetos. São especialmente notáveis pela sua dominância como predadores, necrófagos e herbívoros indiretos (WILSON, 1987; WILSON & HÖLLOBLER, 2005).

Há muito tempo vem sendo constatada a ocorrência de formigas em ambientes urbanos, entretanto, na medida em que a urbanização se intensifica,

as condições para a sua sobrevivência aumentam. Uma vez estabelecidas na área urbana, as formigas podem trazer prejuízos quando instaladas em equipamentos elétrico-eletrônicos (televisores, geladeiras, aparelhos de som, máquinas de lavar roupa) e rede elétrica, comprometendo seu funcionamento, além de apresentarem risco à saúde quando infestam fábricas de alimentos, restaurantes e ambientes hospitalares (FOWLER, 1990; FOWLER *et al.*, 1993; FOWLER & BUENO, 1995 e 1998).

As espécies classificadas como formigas urbanas apresentam um conjunto de características que dificulta o seu controle, tais como: formação de populações unicoloniais, que implica na ausência de agressividade e competição intraespecífica; presença de poliginia, com várias rainhas funcionais, alta taxa de reprodução, forte tendência em migrar e seu comportamento generalista, com alta adaptabilidade a perturbações ambientais (BUENO & CAMPOS-FARINHA, 1998).

Campos-Farinha *et al.* (2002) mostraram em seus levantamentos que as principais espécies de formigas urbanas no Brasil e no mundo estão compreendidas nas subfamílias Myrmicinae, Formicinae e Dolichoderinae.

O gênero *Camponotus* (Fig. 1), popularmente formiga carpinteira, pertencente a subfamília Formicinae, é um dos maiores do mundo, sendo encontrado em uma grande variedade de *habitats*. Somente na região Neotropical, estão descritas mais de 200 espécies de difícil identificação, por serem altamente polimórficas (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990, BUENO & CAMPOS-FARINHA, 1999a e CAETANO, *et al.*, 2002).



Figura 1 – *Camponotus* spp – formiga carpinteira (crédito: Alex Wild 2003).

Formigas desse gênero são consideradas por Akre & Hansen (1990) como importantes pragas estruturais nos Estados Unidos. A maioria das formigas carpinteiras possui hábito noturno e constrói seus ninhos em madeira macia, entretanto, não se alimentando dela. Sendo onívoras, seus hábitos alimentares são bastante diversificados, indo desde substâncias adocicadas como mel, açúcar e frutas frescas a fontes protéicas como carnes e outros insetos (FOWLER, 1990; KOEHLER *et al.*, 1997; MARCOLINO, 2000).

A tolerância dos humanos à presença de formigas em ambientes domiciliares favorece o sucesso desses insetos, no entanto, com os problemas e incômodos causados, seu controle é necessário e inevitável (BUENO & CAMPOS-FARINHA, 1999b).

Por muitos anos, o controle de formigas e outras pragas urbanas tem sido baseado no uso de inseticidas químicos, como organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (ULLOA-CHACON & CHERIX, 1994). A ação letal

desses compostos estende-se a outras formas de vida, incluindo os animais domésticos e o homem (CAMPOS-FARINHA *et al.*, 2002).

O uso indiscriminado de inseticidas acaba gerando efeitos colaterais, como por exemplo, poluição do meio ambiente por acúmulo de resíduos, ruptura do equilíbrio ecológico pela desnecessária eliminação de alguns insetos benéficos (polinizadores), intoxicações e seleção de resistência.

Para formigas, os inseticidas habitualmente usados acentuam o processo de fragmentação das colônias, provocando crescimento desordenado da população, com seleção de indivíduos resistentes (CAMPOS-FARINHA *et al.*, 2002).

A superprodução de enzimas esterásicas, devido à amplificação gênica, é um dos mecanismos responsáveis pela condição de resistência à pesticidas nos artrópodes. As esterases pertencem a um grupo heterogêneo de enzimas hidrolíticas, amplamente distribuídas entre os seres vivos. Catalisam a hidrólise, preferencialmente, de ésteres de ácidos carboxílicos, podendo atuar, também, sobre outros substratos que contenham ligações amidas (OAKESHOTT *et al.*, 1993). São enzimas que podem estar relacionadas com outras atividades fisiológicas, como a regulação dos níveis de Hormônio Juvenil (HIDAYAT & GOODMAN, 1994), processos digestivos (ARGENTINE & JAMES, 1995), funcionamento do sistema nervoso (VILLATE & BACHMANN, 2002), resistência a pesticidas (NASCIMENTO *et al.*, 2000) e metabolismo de agroquímicos (WHEELOCK *et al.*, 2005), além de estarem envolvidas no comportamento

reprodutivo (LABATE *et al.*, 1990). As esterases são classificadas com base em sua sensibilidade frente a inibidores, estando divididas em quatro classes: arilesterases, carboxilesterases, colinesterases e acetilesterases.

Atualmente, para o controle de formigas são utilizadas substâncias com baixa toxicidade aos mamíferos, sob a forma de iscas atrativas sólidas e líquidas (KOEHLER & OI, 2002), as quais são levadas, pelas operárias para dentro da colônia, onde são compartilhadas por trofalaxia, ou seja, transferência de alimento processado de um indivíduo a outro através de regurgitação. Além da troca de alimento, especula-se que haja também troca de informações químicas importantes entre os membros da colônia (HOYT, 1998).

Assim, nem todas as formigas precisam entrar em contato direto com o inseticida (KLOTZ *et al.*, 2000; CAMPOS-FARINHA *et al.*, 2002).

O ácido bórico é um tipo de inseticida inorgânico que tem sido utilizado no controle de formigas e baratas desde 1900 (RUST, 1986) e, mais recentemente, iscas com ácido bórico têm sido aplicadas às formigas.

Klotz & Moss (1996), testando a toxicidade oral de isca-líquida de ácido bórico em formigas carpinteiras da Flórida, *Camponotus abdominalis floridatus* (Buckley), observaram um rompimento na regulação da água, de forma que as formigas ingeriam mais isca para contrabalancear a desidratação. Neste mesmo trabalho, verificaram que concentrações abaixo de 1% (0,16M) são efetivas na mortalidade da colônia. Resultados semelhantes foram encontrados com o uso de isca de ácido bórico em solução de sacarose em formigas lava-pés, *Solenopsis*

*invicta* (Buren) com redução de 90% da colônia após seis semanas de tratamento (KLOTZ *et al.*, 1997).

O uso de iscas líquidas de ácido bórico em *Tapinoma melanocephalum* (Fabricius), *Linepithema humile* (Mayr) e *Monomorium pharaonis* (Linnaeus) mostrou, também, mesmo que de maneira diferente entre as espécies, ser eficiente no controle. As baixas concentrações de ácido bórico agem lentamente sobre as formigas e não são repelidas por elas, aumentando o tempo de ingestão e permitindo ampla distribuição entre os indivíduos da colônia (KLOTZ *et al.*, 1996; KLOTZ *et al.*, 1998, HOOPER-BUI & RUST, 2000).

Rust *et al.* (2004) demonstraram que a eficácia de iscas tóxicas no controle de formigas deve-se a um balanço entre a velocidade de ação do princípio ativo e seu efeito na alimentação, trofálaxis e recrutamento de novas operárias.

Poucas são as informações a respeito da atuação do ácido bórico na fisiologia dos insetos (RUST, 1986), sabendo-se apenas que age no metabolismo, protoplasma, sendo abrasivo ao exoesqueleto quando usado em pó (MOSCHETTI, 2003).

Com o avanço de novas tecnologias para a análise protéica, juntamente com o desenvolvimento da bioinformática, torna-se possível selecionar e caracterizar complexos de proteínas, possibilitando assim relacioná-los a esses processos biológicos.

Entre as várias técnicas disponíveis, o seqüenciamento N-terminal e a espectrometria de massa de peptídeos gerados através da clivagem por proteases têm sido utilizados na obtenção de informações estruturais de proteínas, fornecendo dados confiáveis em pequeno intervalo de tempo (WHEELER *et al.*, 1996; WILKINS *et al.*, 1996; YATES, 2000).

Quantidades mínimas de proteínas, na faixa de picomoles, podem ser seqüenciadas, facilitando o estudo de sistemas biológicos onde a obtenção de grandes quantidades de proteína é limitante (MATSUDAIRA, 1987).

Devido à predominância de *Camponotus vittatus* (Fig. 2) em residências de Uberlândia-MG (SOARES *et al.* 2005) e a quase inexistência de trabalhos a respeito da biologia, fisiologia e métodos de controle dessa formiga, esse trabalho teve por objetivo analisar os efeitos que a ingestão do ácido bórico pode provocar na expressão de proteínas desse inseto, visando subsidiar propostas de controle.

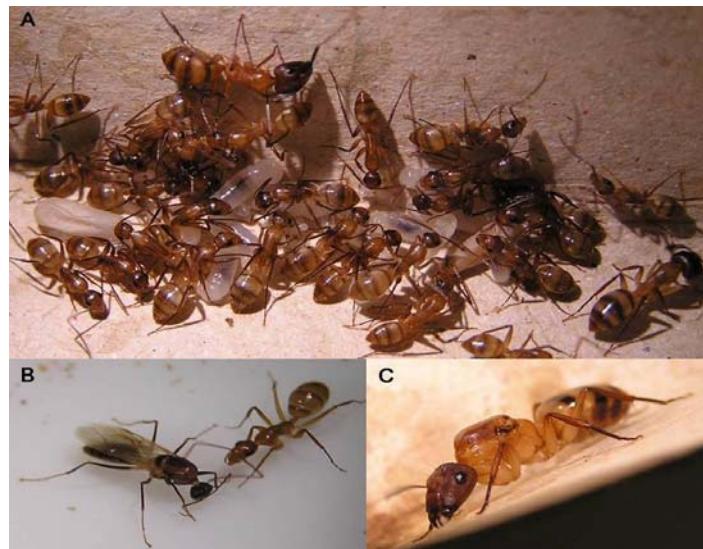


Figura 2 – *C. vittatus* A) Ninho; B) Macho (alado) e operária; C) Rainha fisogástrica. (crédito: Cristiano Menezes 2005).

---

---

**REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

AKRE, R.D., HANSEN, L.D. Management of carpenter ants. In: VANDER MEER, R.K., JAFFE, K., CEDENO, A. (Ed.) *Applied myrmecology: A world perspective*. Boulder: Westview Press, 1990. p.691-700, 741p.

ARGENTINE, J. A., JAMES, A. A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochm. Mol. Biol.* v.25, p.621-630, 1995.

ATHAYDE, A. Controle integrado de pragas assegura inocuidade dos alimentos. *Engenharia de Alimentos*. v.6, n.29, p.20-25, 2000.

BUENO, O. C. & CAMPOS-FARINHA, A. E. C. Formigas Urbanas: comportamento das espécies que invadem as cidades brasileiras. *Vetores & Pragas*. Ano I, n.12, p.13-16, 1998.

BUENO, O.C. & CAMPOS-FARINHA, A.E.C. As formigas domésticas. In: MARICONI, F. A. M. (Ed.) *Insetos e Outros Invasores de Residências*. Piracicaba: FEALQ, 1999a. v.6, p.135-180.

BUENO, O.C. & CAMPOS-FARINHA, A.E.C. Formigas Urbanas: estratégias de controle. *Vetores & Pragas*. Ano II, n.5, p.5-7, 1999b.

CAETANO, F. H., JAFFÉ, K. & ZARA, F. J. *Formigas: biologia e anatomia*. Rio Claro: UNESP, 2002. 42 p.

CAMPOS-FARINHA, A. E. de C., BUENO, O. C., CAMPOS, M. C. G. & KATO, L. M. As formigas urbanas no Brasil: retrospecto. *Biológico*. São Paulo, v. 64, n. 2, p.129-133, 2002.

FOWLER, H.G. Carpenter ants (*Camponotus* sp): pest status and human perception. In: VANDER MEER, R. K, JAFFE, K. & CEDENO, A. (Eds.) *Applied Myrmecology: A World Perspective*. Boulder: Westview Press, 1990. p.525-532, 741p.

FOWLER, H. G.; BUENO, O. C.; SADATSUNE, T. & MONTELLI, A. Ants as potential vectors of pathogens in hospitals in the state of São Paulo, Brazil. *Insect. Sci. Applic.*, v.14, n 3, p.367-370, 1993.

FOWLER, H.G. & BUENO, O.C. Microtopografia da atividade de formigas (Hymenoptera: Formicidae) num prédio urbano: sucessão dinâmica e espacial numa paisagem simples. *Acta Biológica Leopoldensia*, v.17, n.1, p.73-80, 1995.

FOWLER, H.G & BUENO, O. C. O avanço das formigas urbanas. *Ciência Hoje*. v.23, n.123, p.73-80, 1998.

HIDAYAT, P. & GOODMAN, W. G. Juvenile hormone and hemolymph juvenile hormone binding protein titers and their interaction in the hemolymph of fourth stadium *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* v.24, n.7, p.709-715, 1994.

HÖLLDOBLER, B. & WILSON, E. O. *The ants*. Massachusetts: Belknap Press of Harvard University, 1990. 732p.

HOOPER-BUI, L.M. & RUST, M.K. Oral toxicity of abamectin, boric acid, fipronil, and hydramethylnon to laboratory colonies of Argentine Ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* v.93, p.858-864, 2000.

HOYT, E. *The earth dwellers: adventure in the land of ants*. Mainstream Publishing. London. England, 1998. 318p.

KLOTZ, J.H. & MOSS, J. Oral Toxicity of a boric acid – sucrose water bait to Florida Carpenter Ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Entomol. Sci.* v.31, p.9-12, 1996.

KLOTZ, J.H., OI, D.H., VAIL, K.M. & WILLIAMS, D. F. Laboratory evaluation of a boric acid liquid bait on colonies of *Tapinoma melanocephalum*, Argentine ants

and Pharaoh ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* v.89, p.673-677, 1996.

KLOTZ, J.H., VAIL, K.M. & WILLIAMS, D. Toxicity of a boric acid-sucrose water bait to *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* v.90, p.488-491, 1997.

KLOTZ, J.H., GREENBURG, L. & VENN, E. C. Liquid boric acid bait for control of the Argentine ant (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* v.91, p. 910-914, 1998.

KLOTZ, J.H., GREENBURG, L., AMRHEIN, C. & RUST, M.K. Toxicity and repellency of borate-sucrose water baits to Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* v.93, p.1256-1258, 2000.

KOEHLER, P. G & OI, F. M. *Ants*. ENY-203. Department of Entomology and Nematology, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida., 2002. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu> acesso em: 30 janeiro 2005.

KOEHLER, P.G., VAIL, K.M. & CASTNER, J.L. *Pests ants*. SP-119. Department of Entomology and Nematology, Florida Cooperative Extension Service, Institute of

Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 1997. Disponível em: <<http://hammock.ifas.ufl.edu>> acesso em: 30 de janeiro 2005.

LABATE, B., GAME, Y., COOKE, H. & OAKESHOTT, J.G. The number and distribution of esterase 6 alleles in populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*. v.63, p.203-208, 1990.

MARCOLINO, M. T., OLIVEIRA-JUNIOR, W. P. E BRANDEBURGO, M. A. M. Aspectos comportamentais da interação entre formigas *Camponotus atriceps* SMITH (Hymenoptera, Formicidae) e abelhas africanizadas *Apis mellifera* (L.) (Hymenoptera, Apidae). *Naturalia*, v. 25, p. 321-330, 2000.

MATSUDAIRA, P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto PVDF membranes. *J. Biol. Chem.*. v.262, n.21, p.10035-10038, 1987.

MOSCHETTI, R.: *IPM of Alaska* (2003). [online] Disponível em: <http://www.ipmofalaska.homestead.com/files/carpantcontrol.html> Acesso em: 24 jan. 2.

NASCIMENTO, V.A., MATUSITA, S.H & KERR, W.E. Evidence of hybridization between two species of Melipona bees. *Gen. Mol. Biol.* v.23, n.1, p.79-81, 2000.

OAKESHOTT, J.G., VAN PAPENRECHT, E.A., BOYCE, T.M., HEALY, M.J. & RUSSEL, R.J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetics*. v.90, p.239-268, 1993.

PANIZZI, A. R. & PARRA, J. R. P. (Eds) *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. São Paulo: Manole, 1991. 359p.

RUST, M. K. Managing household pests. In: G. W. Bennent and J. M. Owens (eds.), *Advances in urban pest management*. Van Nostrand Reinhold, New York, NY., p. 335-368, 1986.

RUST, M. K., REIERSON, D.A. & KLOTZ, J. Delayed Toxicity as a Critical Factor in the Efficacy of Aqueous Baits for Controlling Argentine Ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* v.97, n.3, p.1017-1024, 2004.

SOARES, N.S., ALMEIDA, L.O., GONÇALVES, C.A., MARCOLINO, M.T., BONETTI, A.M. Levantamento da diversidade de formigas na região urbana de Uberlândia-MG. *Neotrop. Entomol.* 2006. (no prelo).

ULLOA-CHACON, P. & CHERIX, D. Perspectives on control of the little Fire ants (*Wasmannia auropunctata*) on the Galapagos Islands. In: Williams, D.F. (Ed.)

*Exoticants. Biology, Impact and Control of Introduced Species.* Boulder: Westview Press. p.63-77, 1994.

UNFPA. *United Nations Population:* [online] Disponível em:  
[http://www.fnuap.org.br/ESTRUT/SERV/arquivos/tendencias\\_da\\_populacao\\_mundial.htm](http://www.fnuap.org.br/ESTRUT/SERV/arquivos/tendencias_da_populacao_mundial.htm) Acesso em: 02 dez. 2005.

VILLATTE, F. & BACHMANN, T.T. How many genes encode cholinesterase in arthropods? *Pest. Biochem. and Physiol.* v.73, p.122-129, 2002.

WHEELOCK, C.E., SHAN, G. & OTTEA, J. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *J. Pestic. Sci.* v.30, n.2, p.75-83, 2005.

WHEELR, C.H., BERRY, S.L., WILKINS, M.R., CORBETT, J.M., OU, K., GOOLEY, A.A., HUMPHERY, I.S., WILLIAMS, K.L. & DUNN, M.J. Characterization of Proteins from Two-dimensional Electrophoresis Gels by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry and Amino Acid Compositional Analysis. *Electrophoresis.* v.17, n.3, p.580-587, 1996.

WILKINS M.R., PASQUALI, C., APPEL, R.D., OU, K., GOLAZ, O., SANCHEZ, J., YAN, J.X., GOOLEY, A.A., HUGHES, G., HUMPHERY-SMITH, I., WILLIAMS, K.L. & HOCHSTRASSER, D.F. From proteins to proteomes: large scale protein

identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis.

*Biotechnology*. v.14, p.61-65, 1996.

WILSON, E. O. Causes of ecological success: the case of the ants. *J. Anim.*

*Ecol.*, v. 56, p. 1-9, 1987.

WILSON, E.O. & HÖLLOBLER, B. The rise of the ants: A phylogenetic and

ecological explanation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.102, n. 21, p. 7411-7414,

2005.

YATES, J.R. Mass spectrometry: from genomics to proteomics. *Trends in*

*Genetics*. v.16, n.1, p.5-8, 2000.

---

# CAPÍTULO I

ESTUDOS DO PERFIL PROTÉICO DE *Camponotus*  
*vittatus* (HYMENOPTERA: FORMICINAE) TRATADAS  
COM ISCAS LÍQUIDAS DE ÁCIDO BÓRICO

---

## RESUMO

Vários são os tipos de pesticidas utilizados atualmente, entretanto, os efeitos colaterais indesejados gerados são enormes. Sendo assim, iscas são ideais para o uso contra formigas urbanas, devido a sua baixa toxicidade, fácil transporte para o ninho e boa distribuição para os membros da colônia, através de trofalaxia. Além disso, possuem baixo impacto ambiental, não prejudicando organismos não-alvos. Iscas de ácido bórico têm sido utilizadas no controle de formigas carpinteiras, mostrando-se efetivas em baixas concentrações. Considerando-se que trabalhos sobre os modos de ação do ácido bórico em formigas são inexistentes, nesse estudo foi analisado, por gel SDS-PAGE e espectrometria de massa, o perfil protéico de *Camponotus vittatus* tratadas com iscas líquidas desse veneno. Os resultados mostraram que o ácido bórico alterou a expressão de várias proteínas. Foram obtidos vários fragmentos tripsínicos de duas bandas diferencialmente expressas, uma delas expressa no grupo Tratado, não apresentou similaridade com nenhuma proteína já estudada e depositada em bancos de dados públicos. A análise de bioinformática para a segunda banda, que não ocorre no grupo Tratado, indicou similaridade com a enzima Arginina quinase (ArgK), importante para manutenção da homeostase energética em himenópteros. Provavelmente, o ácido bórico estaria ocasionando a supressão da ArgK, comprometendo o funcionamento do sistema de tamponamento pelo ATP.

Não há banco de dados para *C. vittatus*, o que dificulta resultados mais conclusivos para análise de proteínas.

PALAVRAS-CHAVE: ácido bórico, *Camponotus vittatus*, controle, isca líquida.

## ABSTRACT

There are many types of pesticides used nowadays, however, they generate a big amount of undesirable collateral effects. Because of this, baits are an ideal tool against urban ants: they have a lower toxicity and are easily transported to the nest, being well distributed by *trofotaxis*. Moreover, they aren't a threat to non target organisms and have a short environmental impact. Acid boric baits have been used in the control of carpenter ants, showing a good effect in low concentrations. Papers retracting how the acid boric acts in ants are nonexistent. In order to provide some information on this field, this study aims to analyze the protein profile of *Camponotus vittatus* treated with aqueous baits of this poison by gel SDS-PAGE and mass spectrometry. The results have shown that the boric acid altered the expression of many proteins. Many trypsinics fragments were obtained from two differentially expressed bands. The first, highly expressed in the Treated Group, failed in display similarity with any protein from public database. Bioinformatics analysis made to the second band, suppressed in the Treated Group, indicated similarity with Arginine kinase (ArgK), an important enzyme in the maintenance of energetic homeostasis in hymenopteros. Probably, the boric acid would be occasioning ArgK suppression and compromising the ATP buffering system work. More conclusive results weren't possible because of the lack of a *C. vittatus* database.

Key-words: boric acid, *Camponotus vittatus*, control, aqueous baits.

## INTRODUÇÃO

As formigas desempenham diversos papéis nos ecossistemas terrestres, agindo como predadores, necrófagos, herbívoros, detritívoros e granívoros, além de participarem de um rol de associações com plantas e outros insetos, atuando, ainda, como agentes revolvedores do solo e na redistribuição de nutrientes (HOLLDÖBLER & WILSON, 1990; FOLGRAIT, 1998).

Como qualquer ambiente natural, os ambientes artificiais, como os centros urbanos, podem ser colonizados e explorados por várias espécies de formigas, muitas das quais, por apresentarem comportamento sinantrópico, conseguiram distribuir-se por todo mundo através da atividade mercantil (BUENO & CAMPOS-FARINHA, 1998). O sucesso na colonização de diferentes ambientes deve-se a uma variedade de estratégias de adaptação ao novo habitat (CLARK *et al.*, 1982; PASSERA, 1994).

Os pesticidas utilizados incluem derivados arsenicais, organoclorados, carbamatos, amidinas, organofosforados e piretróides, sendo esses últimos, amplamente utilizados no Brasil (FURLONG *et al.*, 2004). Tais formas de controle geram muitos efeitos colaterais indesejados (CAMPOS-FARINHA *et al.*, 2002).

Iscas são ideais para o combate às contra formigas urbanas, devido a sua baixa toxicidade, são facilmente transportadas para o ninho e bem distribuídas através de trofaliaxia para os membros da colônia. Além disso, possuem baixo impacto ambiental, não prejudicando organismos não-alvo (CAMPOS-FARINHA

*et al.*, 2002; DAANE *et al.*, 2005; KLOTZ *et al.*, 1996, 2000, 2002; TRIPP *et al.* 2000).

A espectrometria de massa é uma ferramenta importante para a biologia molecular e celular de sistemas biológicos. Essa técnica inclui estudos de interações proteína-proteína, mapeamento de organelas, descrição do genoma e proteoma e geração de perfis protéicos de diversas espécies (AEBERSOLD & MANN, 2003).

Davies *et al.*, em 2004, caracterizaram a maioria dos peptídeos da peçonha de *Myrmecia pilosula* (Smith), por espectrometria de massa. Leoncini *et al.*, em 2004, identificaram uma substância produzida por campeiras de *Apis mellifera* (Linnaeus), o etil oleato, que age como um fator químico inibidor que retarda o envelhecimento no início do forrageamento. Scarselli *et al.*, em 2005, estudaram o proteoma da geléia real de *A. mellifera*, com a mesma técnica.

Estudos sobre o modo de ação do ácido bórico em formigas são inexistentes e, por isso, nesse trabalho, analisou-se, por espectrometria de massa, o perfil protéico de *C. vittatus* tratadas com iscas líquidas de ácido bórico.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Biológico

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética do Comportamento, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, onde são mantidas colônias de *C. vittatus* capturadas em diversas residências de Uberlândia-MG.

Para o teste foram coletadas operárias com uniformidade de tamanho, divididas em bandejas plásticas de 20x28cm, separadas em dois grupos de 15 indivíduos cada: Controle e Tratado, sendo os experimentos conduzidos em triplicata. As formigas foram mantidas sob condições naturais de temperatura e umidade e desprovidas de alimento nas primeiras 24 horas, após o qual, foram tratadas com iscas de ácido bórico 0,1M (99%[Al] Sigma-Aldrich, EUA) dissolvido em solução de sacarose (água deionizada a 10% de sacarose) e o Controle, igualmente manipulado, recebeu apenas solução de sacarose 10%. Ambos os grupos receberam como fonte protéica larva de besouro *Tenebrio* e um suprimento de água em tubo de ensaio com algodão na extremidade livre.

Durante 30 dias sucessivos, as operárias mortas do grupo Tratado e vivas do grupo Controle foram coletadas e armazenadas a – 80°C para posterior análise do perfil de proteína total.

### Extração de Proteína e Teste Eletroforético

Foram maceradas, em nitrogênio líquido, dez formigas do grupo Tratado e dez do Controle, sendo solubilizadas em tampão de extração (Tris-HCl 0,02M pH 7,2; sacarose 0,25M; EGTA 0,002M e EDTA 0,01M) e submetidas à centrifugação a 15.000g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a dosagem protéica realizada pelo método de Bradford (1976). A absorbância foi lida a 595nm em espectrofotômetro Hitach U-2000 e a concentração média dos extratos de proteína foi determinada a partir de uma curva padrão utilizando albumina sérica bovina (Anexo I).

O perfil de polipeptídeos dos grupos Controle e Tratado foi analisado em SDS-PAGE usando o sistema descontínuo de Laemmli (1970) através de mini-géis preparados em gradiente de concentração de 5 a 22%, sendo aplicados 15µg de proteína total para cada amostra.

A separação eletroforética dos polipeptídeos foi conduzida em tampão Tris-HCl 25mM pH 8,5, EDTA 2mM, glicina 0,2M, SDS 2,5mM, sob voltagem constante de 100V por 2h. Os géis foram corados com solução de *Coomassie Brilliant Blue R250* 0,125%, metanol 50% e ácido acético 10%, sendo descorados em solução de metanol 10% e ácido acético 12,5%.

O cálculo do peso molecular aparente dos polipeptídeos em gel foi determinado tomando como parâmetro o marcador de alto peso molecular SDS-6H (Sigma-Aldrich USA), segundo Laemmli (1970).

## Digestão Tripsínica

As amostras que apresentaram diferença de expressão em gel gradiente de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram selecionadas e recortadas, sendo enviadas em tubos tipo *eppendorf* para análise de espectrometria de massa ao Prof. Dr. José César Rosa do Centro de Química de Proteínas - Hemocentro, FMRP-USP.

O dodecil sulfato de sódico (SDS) e o corante *Coomassie Blue* foram removidos por 3 lavagens com 400 $\mu$ l de acetato de amônio 50mM contendo 50% acetonitrile, sendo, por último, desidratadas com acetonitrila pura e secas por centrífuga rotatória à vácuo (SpeedVac, Savant). Os géis secos foram reidratados com solução de tripsina (Promega) a 0,5ug/20ul e após completo intumescimento, foi adicionado volume de bicarbonato de amônio para cobrir completamente o gel que foi incubado a 37°C por 24h. A reação foi interrompida pela adição de 5 $\mu$ l de ácido fórmico e mantida em temperatura ambiente para extração dos peptídeos. O extrato foi conservado em freezer (-20°C) até o momento da análise por espectrometria de massas.

Cada solução de peptídeos tripsínicos das amostras foi dessalificada em micro-tip contendo resina de fase reversa (POROS R2, Perseptive Biosystems, USA) previamente ativada com metanol, equilibrada com ácido fórmico a 0,2%. Cada amostra foi carregada em micro-tip individual e dessalificada com 3 x 100 $\mu$ l de ácido fórmico a 0,2% sendo eluída da resina com 30 $\mu$ l de uma solução de metanol a 60% em ácido fórmico 5%. Nesse solvente as amostras foram infundidas diretamente no espectrômetro de massas.

## Espectrometria de Massa

Os peptídeos tripsínicos foram analisados em um espectrômetro de massa do tipo eletrospray triplo-quadrupolo (Quattro II, Micromass, Manchester, UK) utilizando uma origem eletrospray do tipo nanoflow contendo um capilar de sílica fundida de 20µm de diâmetro interno, mantido a 2,8 kV, 40V no cone de entrada e a uma temperatura de 100°C. As amostras foram infundidas através de uma bomba tipo seringa (Harvard, Inc, USA) a um fluxo de 300nl/min e os espectros de massa foram coletados na forma de média de scans (15-30 scans) sendo processados com o software MassLynx v.3.3 (Micromass, Manchester, UK). A coleta de dados de massa utilizou varredura em MS1 (400-1500 u.m.a) obtendo-se assim a determinação da massa dos peptídeos (*peptide mass fingerprint*). Cada íon de peptídeo detectado foi submetido a CID-MS/MS (*daughter ion scanning*) que promoveu a fragmentação do íon selecionado originando fragmentos de íons tipo *b* e *Y* que foram utilizados para a dedução das respectivas seqüências de aminoácidos dos peptídeos.

## Bioinformática

A comparação das seqüências dos peptídeos gerados com seqüências de bancos públicos de dados não-redundantes foi feita pelo programa BLAST para peptídeos curtos (*short, nearly exact matches*) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. A homologia de cada peptídeo foi testada utilizando o programa MATCH disponível em <http://relic.bio.anl.gov/match.aspx>,

para parear uma seqüência provável com todas as seqüências peptídicas deduzidas a partir da espectrometria de massa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram variação da expressão de proteínas entre formigas não tratadas e tratadas com ácido bórico (Fig. 1).

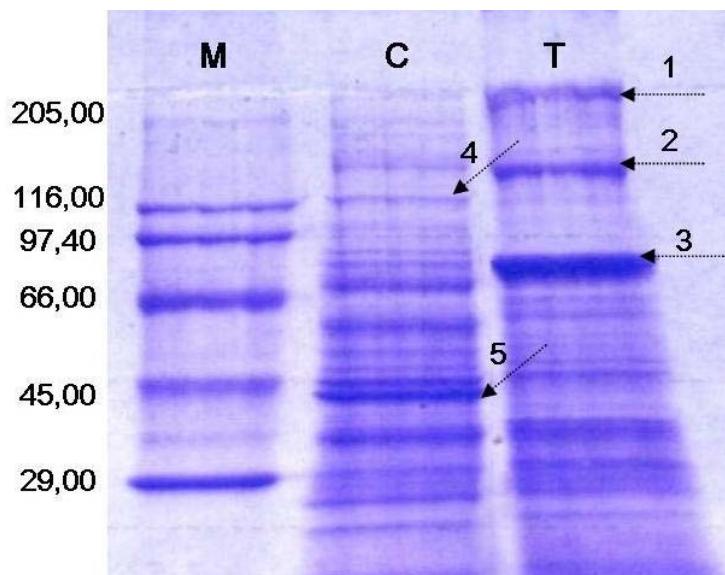


Figura 1 – Perfil eletroforético em gel gradiente (5 a 22%) de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 15 $\mu$ g de proteína total de formigas Controle (C) e Tratadas (T) com ácido bórico. M – Marcador de Alto Peso Molecular. Coloração por *Comassie Blue* R250. Setas indicam bandas diferencialmente expressas.

O grupo Tratado apresentou expressão mais intensa dos polipeptídeos de pesos moleculares 220,30kDa, 147,49kDa e 87,34kDa (setas 1, 2 e 3, Fig. 1). Mecanismos fisiológicos da formiga, na tentativa de sobreviver à ingestão do ácido bórico podem ter ativado os genes que codificam para essas proteínas. A seta 4 (Fig. 1) indica um polipeptídeo com peso molecular aparente de 126,37kDa que não teve expressão no grupo Tratado. O polipeptídeo indicado pela seta 5

(42,93kDa) (Fig.1), mostrou, também, expressão suprimida nas formigas tratadas com ácido bórico. Essas variações na expressão dos polipeptídeos refletem ação do ácido bórico alterando o metabolismo desses insetos.

As bandas diferencialmente expressas entre o grupo Tratado (setas 1 e 2, Fig.1) e o Controle (seta 4, Fig.1) foram submetidas a espectrometria de massa (MS), porém não foram identificados íons correspondentes à peptídeos tripsínicos devido à insuficiência de material (Fig. 2).

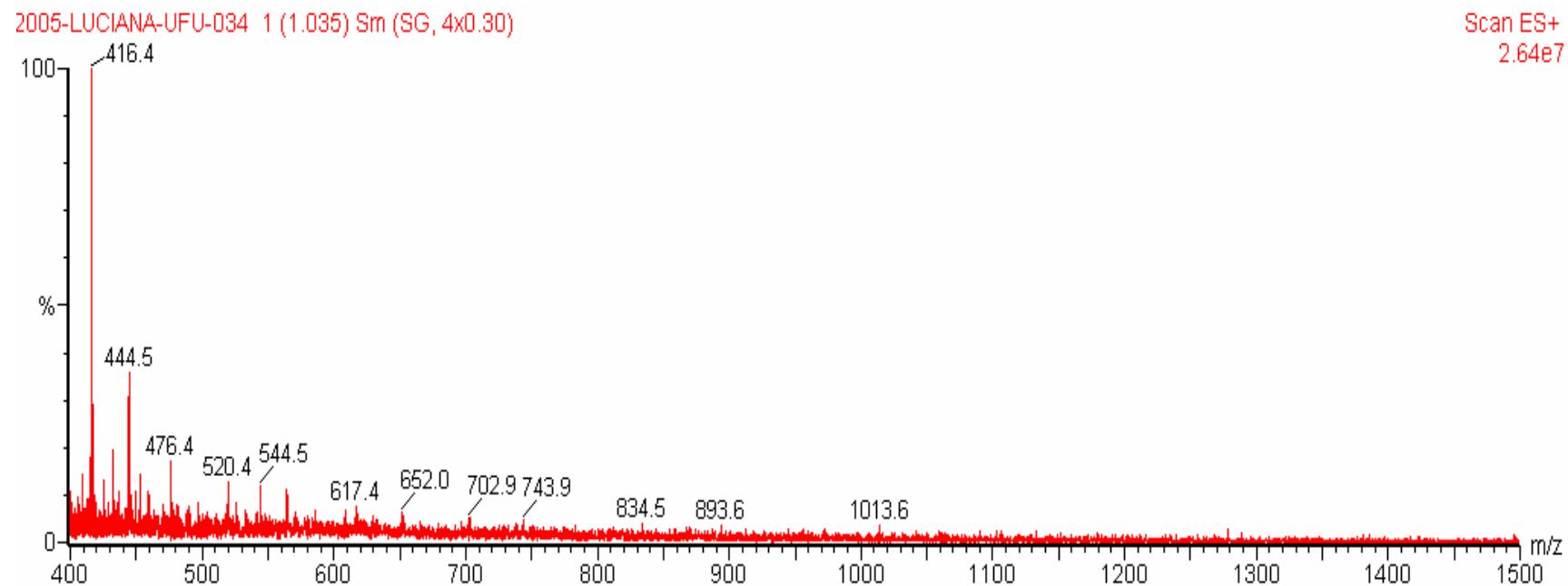
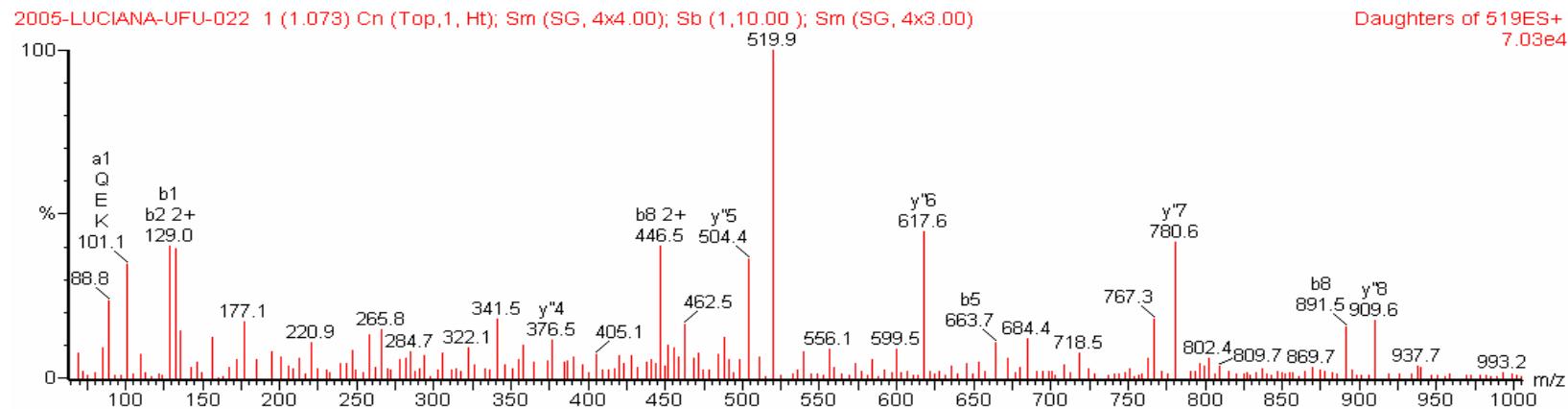


Figura 2 - Espectro de massa dos peptídeos obtidos por digestão *in situ* com tripsina em gel de poliacrilamida da banda T-1 (220kDa).

O tratamento com ácido bórico provocou acentuado aumento de intensidade de expressão da banda T-3, indicada pela seta 3 (Fig. 1). Vários fragmentos tripsínicos foram obtidos através da análise de espectrometria de massa, dos quais apenas três apresentaram alta qualidade e suas seqüências de aminoácido puderam ser deduzidas (Fig. 3, 4 e 5).

Para a seqüência [ALx]NSESDPPNLxVER, (Fig. 5) a posição dos aminoácidos entre colchetes, não pôde ser identificada com certeza, pois a ordem para tais aa pode estar invertida. O aminoácido Lx pode ser uma leucina (Leu) ou isoleucina (Ile), isômeros que não podem ser discriminados.

A análise através do programa BLAST foi feita para banco de dados de artrópodes. Não foi encontrado consenso de similaridade com nenhuma proteína depositada nesse banco de dados. Essa banda T-3 pode representar um complexo de proteínas de mesmo peso molecular, o que pode ser resolvido em gel bidimensional, que separa proteínas por peso e ponto isoelétrico.



Mass Window = 1.00 amu, Threshold = 2.00%

Average Mass = 1038.1074, Monoisotopic Mass = 1037.4924

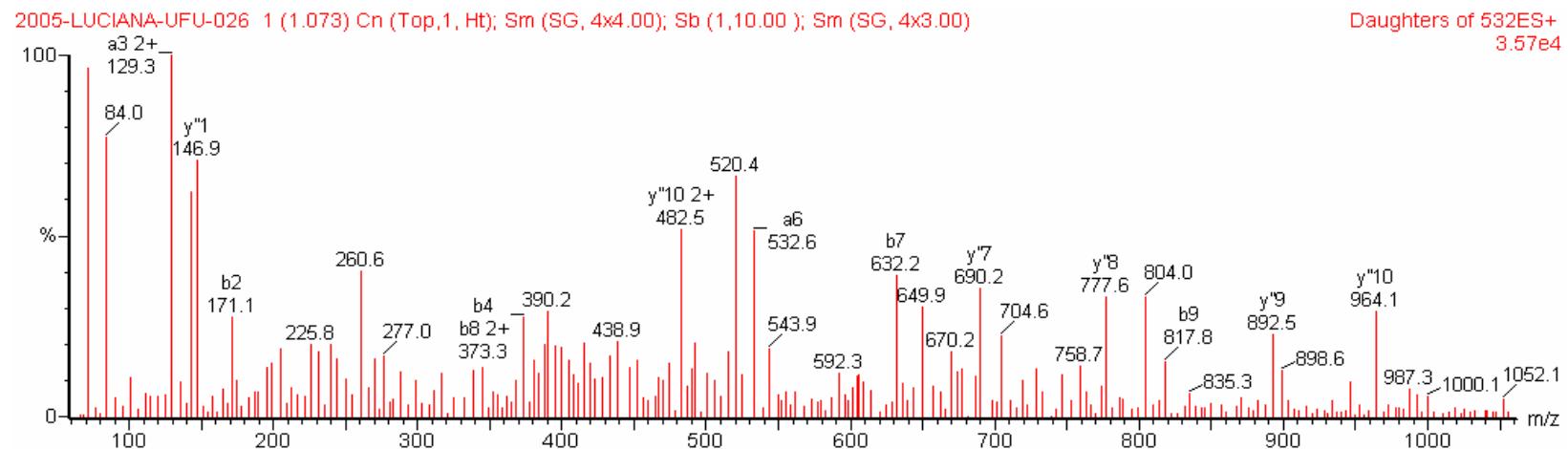
Residues: 1-9 proposed

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

<b>a</b>	101.1	230.1	393.2	506.3	635.3	706.3	763.4	864.4	-
<b>b</b>	129.1	258.1	421.2	534.2	663.3	734.3	791.3	892.4	-
<b>c''</b>	146.1	275.1	438.2	551.3	680.3	751.4	808.4	909.4	-
<b>i</b>	101.1	102.1	136.1	86.1	102.1	44.1	30.0	74.1	101.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	<b>Gln</b>	<b>Glu</b>	<b>Tyr</b>	<b>Leu</b>	<b>Glu</b>	<b>Ala</b>	<b>Gly</b>	<b>Thr</b>	<b>Lys</b>
	9	8	7	6	5	4	3	2	1
<b>x</b>	-	936.4	807.4	644.3	531.2	402.2	331.2	274.1	173.1
<b>y''</b>	-	910.4	781.4	618.3	505.3	376.2	305.2	248.2	147.1
<b>z</b>	-	893.4	764.4	601.3	488.2	359.2	288.2	231.1	130.1

Figura 3 - Espectro de massa do peptídeo QEYLxEAGTK obtido por digestão *in situ* com tripsina em gel de poliacrilamida da banda T-3 (87kDa).



Mass Window = 1.00 amu, Threshold = 2.00%

Average Mass = 1062.1300, Monoisotopic Mass = 1061.5247

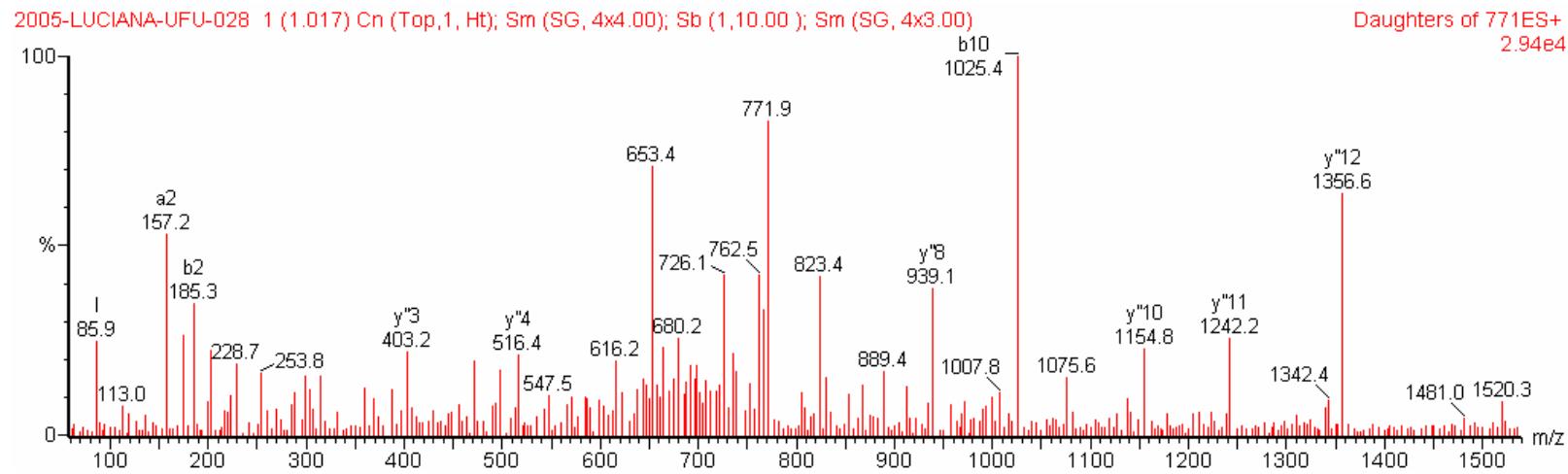
Residues: 1-11 proposed

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

<b>a</b>	72.1	143.1	<b>258.1</b>	345.2	446.2	533.2	604.3	718.3	789.4	888.4	-
<b>b</b>	100.1	171.1	<b>286.1</b>	373.2	474.2	561.2	632.3	746.3	817.4	916.4	-
<b>c"</b>	<b>117.1</b>	188.1	303.2	390.2	<b>491.2</b>	<b>578.3</b>	649.3	763.4	834.4	933.5	-
<b>i</b>	72.1	<b>44.1</b>	<b>88.0</b>	<b>60.0</b>	<b>74.1</b>	<b>60.0</b>	<b>44.1</b>	<b>87.1</b>	<b>44.1</b>	72.1	101.1
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<b>Val</b>	<b>Ala</b>	<b>Asp</b>	<b>Ser</b>	<b>Thr</b>	<b>Ser</b>	<b>Ala</b>	<b>Asn</b>	<b>Ala</b>	<b>Val</b>	<b>Lys</b>	
11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
<b>x</b>	-	<b>989.5</b>	<b>918.4</b>	803.4	<b>716.4</b>	615.3	<b>528.3</b>	457.2	<b>343.2</b>	272.2	<b>173.1</b>
<b>y"</b>	-	963.5	892.4	777.4	690.4	<b>589.3</b>	<b>502.3</b>	<b>431.3</b>	317.2	<b>246.2</b>	147.1
<b>z</b>	-	946.4	875.4	<b>760.4</b>	673.3	572.3	<b>485.3</b>	<b>414.2</b>	<b>300.2</b>	<b>229.2</b>	130.1

Figura 4 - Espectro de massa do peptídeo VADSTSANAVK obtido por digestão *in situ* com tripsina em gel de poliacrilamida da banda T-3 (87kDa).



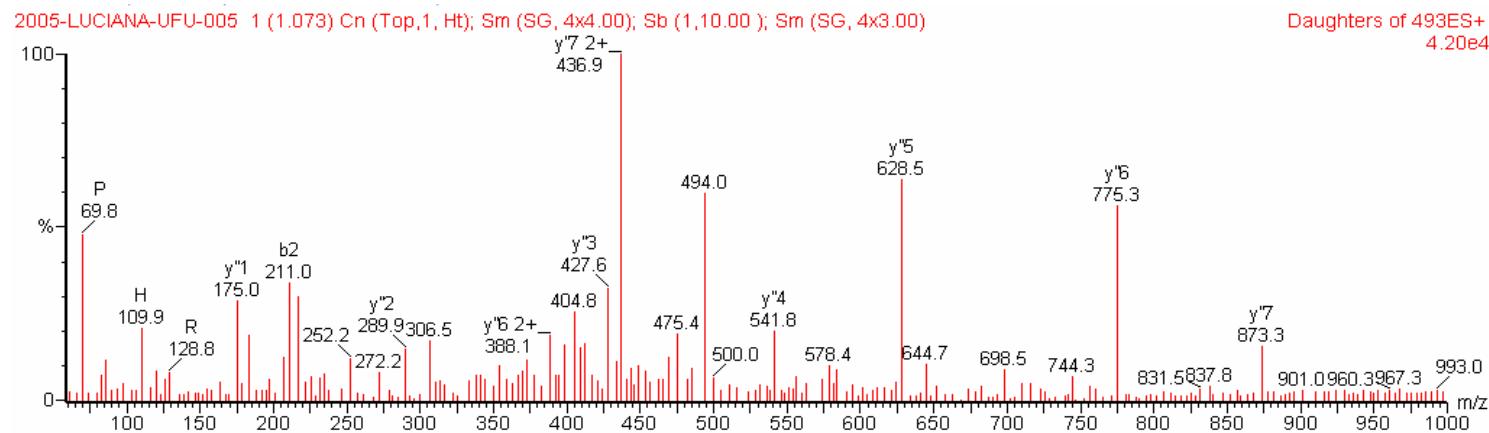
a	44.0	157.1	271.2	358.2	487.2	574.3	689.3	786.4	883.4	997.5	1110.5	1209.6	1338.6	-
b	72.0	185.1	299.2	386.2	515.2	602.3	717.3	814.4	911.4	1025.4	1138.5	1237.6	1366.6	-
c"	89.1	202.1	316.2	403.2	532.3	619.3	734.3	831.4	928.4	1042.5	1155.6	1254.6	1383.7	-
i	44.1	86.1	87.1	60.0	102.1	60.0	88.0	70.1	70.1	87.1	86.1	72.1	102.1	129.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ala		Ile	Asn	Ser	Glu	Ser	Asp	Pro	Pro	Asn	Ile	Val	Glu	Arg
14		13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
x	-	1495.7	1382.6	1268.6	1181.5	1052.5	965.5	850.4	753.4	656.3	542.3	429.2	330.1	201.1
y"	-	1469.7	1356.6	1242.6	1155.6	1026.5	939.5	824.5	727.4	630.4	516.3	403.2	304.2	175.1
z	-	1452.7	1339.6	1225.6	1138.5	1009.5	922.5	807.4	710.4	613.3	499.3	386.2	287.1	158.1

Figura 5 - Espectro de massa do peptídeo [ALx]NSESDPPNLxVER obtido por digestão *in situ* com tripsina em gel de poliacrilamida da banda T-3 (87kDa).

A proteína C-5, indicada pela seta 5 (Fig. 1) foi suprimida pelo tratamento com ácido bórico.

A análise por espectrometria de massa dos peptídeos tripsínicos de C-5 gerou várias seqüências, contudo, somente cinco de melhor qualidade tiveram suas seqüências de aminoácidos deduzidas (Fig. 6, 7, 8, 9 e 10).

Através do programa BLAST, foi feita uma busca por similaridade com proteínas presentes em banco de dados para artrópodes. Constatou-se similaridade das seqüências deduzidas com a enzima Arginina quinase (ArgK) de várias espécies de insetos. O programa Protein Molecular Weight, disponível em [http://bioinformatics.org/sms/prot\\_mw.html](http://bioinformatics.org/sms/prot_mw.html), revelou similaridade entre o peso molecular da ArgK de *A. mellifera* (40,01kDa) e a banda C-5 (43kDa) de *C. vittatus*.



Mass Window = 1.00 amu, Threshold = 2.00%  
 Average Mass = 985.0524, Monoisotopic Mass = 984.4672

Residues: 1-8 proposed

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	86.1	183.1	330.2	417.2	531.3	668.3	783.4	-
b	114.1	211.1	358.2	445.2	559.3	696.3	811.4	-
c''	131.1	228.2	375.2	462.3	576.3	713.4	828.4	-
i	86.1	70.1	120.1	60.0	87.1	110.1	88.0	129.1
	1	2	3	4	5	6	7	8
Leu	Pro	Phe	Ser	Asn	His	Asp	Arg	
8	7	6	5	4	3	2	1	
x	-	898.4	801.3	654.3	567.2	453.2	316.1	201.1
y''	-	872.4	775.3	628.3	541.2	427.2	290.1	175.1
z	-	855.4	758.3	611.3	524.2	410.2	273.1	158.1

Figura 6 - Espectro de massa do peptídeo LxPFSNHDR obtido por digestão *in situ* com tripsina em gel de poliacrilamida da banda C-5 (43kDa).

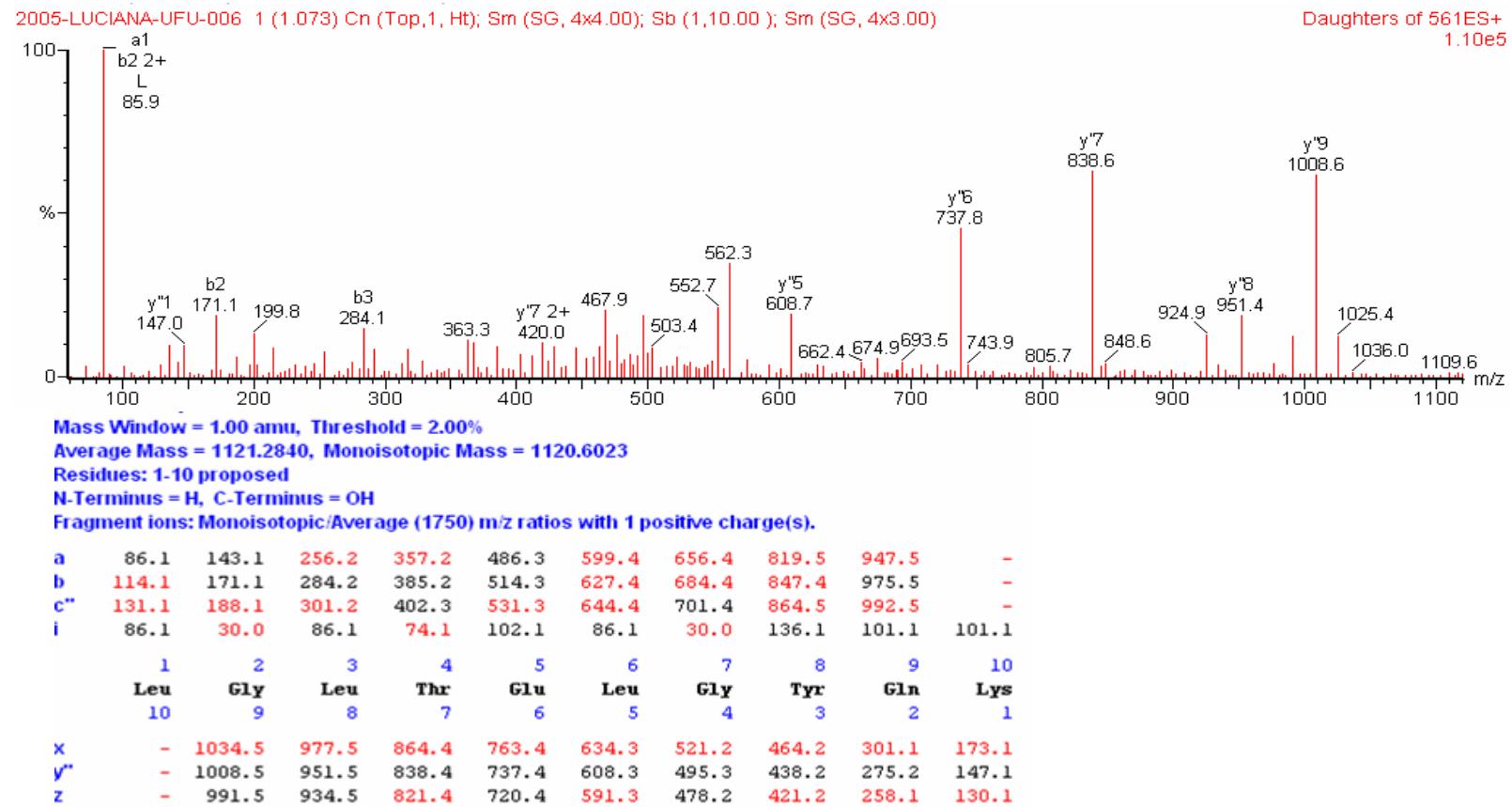
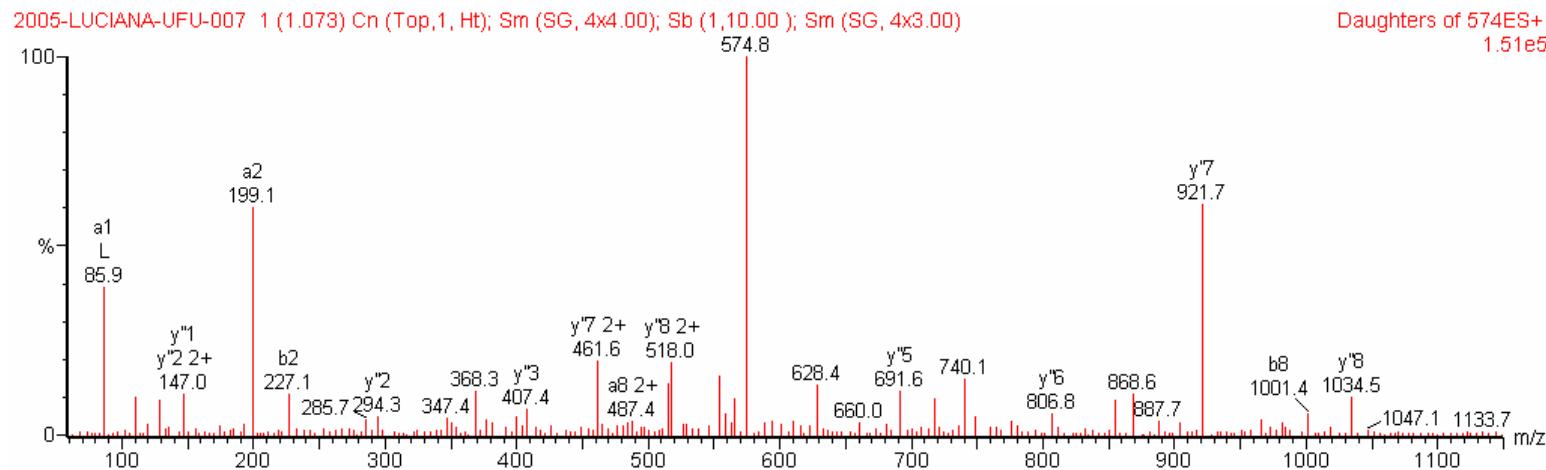


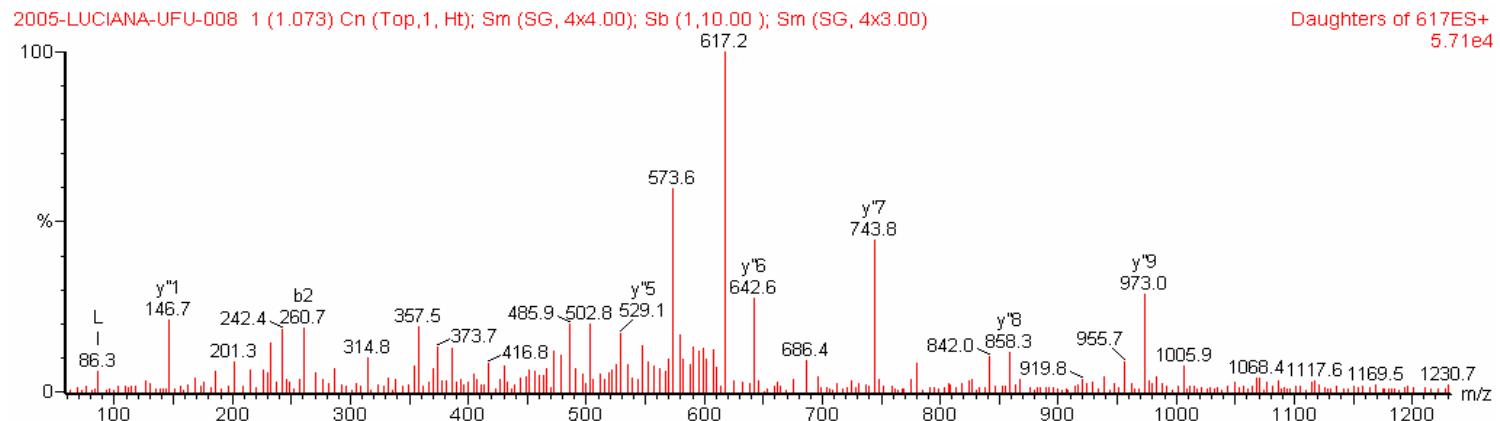
Figura 7 - Espectro de massa do peptídeo LxGLxTELxGYQK obtido por digestão *in situ* com tripsina em gel de poliacrilamida da banda C-5 (43kDa).



Mass Window = 1.00 amu, Threshold = 2.00%  
 Average Mass = 1147.3243, Monoisotopic Mass = 1146.5968  
 Residues: 1-9 proposed  
 N-Terminus = H, C-Terminus = OH  
 Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	86.1	199.2	314.2	429.2	566.3	713.4	826.4	973.5	-
b	114.1	227.2	342.2	457.2	594.3	741.3	854.4	1001.5	-
c''	131.1	244.2	359.2	474.2	611.3	758.4	871.5	1018.5	-
i	86.1	86.1	88.0	88.0	110.1	120.1	86.1	120.1	101.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Leu	Leu	Asp	Asp	His	Phe	Leu	Phe	Lys
	9	8	7	6	5	4	3	2	1
x	-	1060.5	947.4	832.4	717.4	580.3	433.2	320.2	173.1
y''	-	1034.5	921.4	806.4	691.4	554.3	407.3	294.2	147.1
z	-	1017.5	904.4	789.4	674.4	537.3	390.2	277.2	130.1

Figura 8 - Espectro de massa do peptídeo LxLxDDHFLxFK obtido por digestão *in situ* com tripsina em gel de poliacrilamida da banda C-5 (43kDa).



Mass Window = 0.80 amu, Threshold = 2.00%

Average Mass = 1233.3286, Monoisotopic Mass = 1232.5932

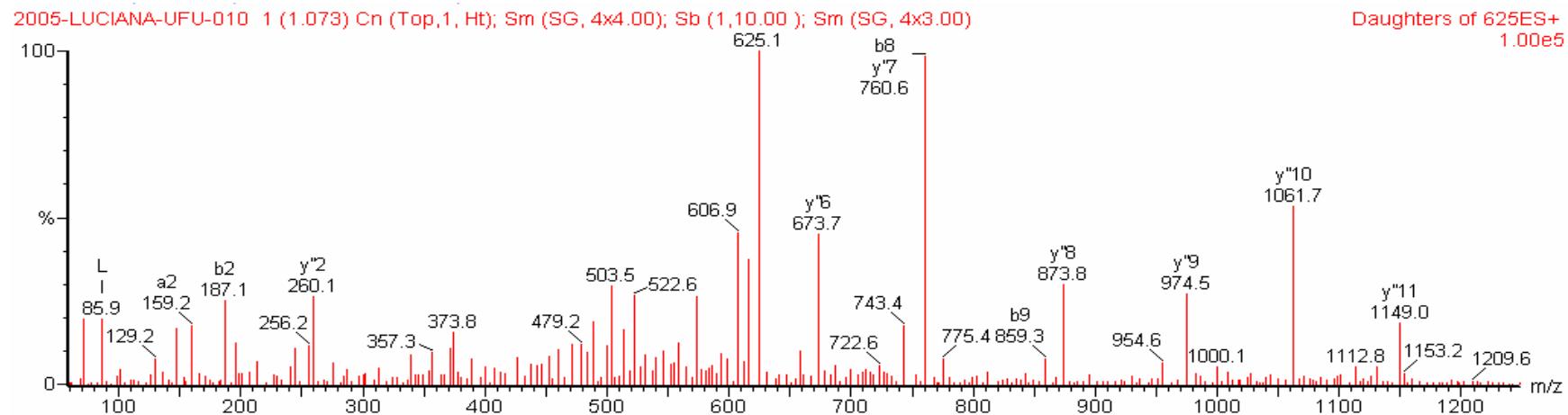
Residues: 1-11 proposed

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	120.1	233.2	348.2	463.2	564.3	677.3	734.4	821.4	958.5	1059.5	-
b	148.1	261.2	376.2	491.2	592.3	705.3	762.4	849.4	986.5	1087.5	-
c"	165.1	278.2	393.2	508.2	609.3	722.4	779.4	866.4	1003.5	1104.5	-
i	120.1	86.1	88.0	88.0	74.1	86.1	30.0	60.0	110.1	74.1	101.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Phe	Leu	Asp	Asp	Thr	Ile	Gly	Ser	His	Thr		Lys
11	10	9	8	7	6	5	4	3	2		1
x	-	1112.5	999.4	884.4	769.4	668.3	555.2	498.2	411.2	274.1	173.1
y"	-	1086.5	973.5	858.4	743.4	642.4	529.3	472.2	385.2	248.2	147.1
z	-	1069.5	956.4	841.4	726.4	625.3	512.2	455.2	368.2	231.1	130.1

Figura 9 - Espectro de massa do peptídeo FLxDDTLxGSHTK obtido por digestão *in situ* com tripsina em gel de poliacrilamida da banda C-5 (43kDa).



<b>a</b>	72.1	159.1	246.1	347.2	460.3	547.3	604.3	732.4	831.4	960.5	1073.6	-
<b>b</b>	100.1	187.1	274.1	375.2	488.3	575.3	632.3	760.4	859.4	988.5	1101.6	-
<b>c"</b>	117.1	204.1	291.2	392.2	505.3	592.3	649.3	777.4	876.5	1005.5	1118.6	-
<b>i</b>	72.1	60.0	60.0	74.1	86.1	60.0	30.0	101.1	72.1	102.1	86.1	101.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Val</b>	Val	Ser	Ser	Thr	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Glu	Ile	Lys
	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
<b>x</b>	-	1174.6	1087.6	1000.5	899.5	786.4	699.4	642.3	514.3	415.2	286.2	173.1
<b>y"</b>	-	1148.6	1061.6	974.5	873.5	760.4	673.4	616.4	488.3	389.2	260.2	147.1
<b>z</b>	-	1131.6	1044.6	957.5	856.5	743.4	656.4	599.3	471.3	372.2	243.2	130.1

Figura 10 - Espectro de massa do peptídeo VSSTLxSGQVELxK obtido por digestão *in situ* com tripsina em gel de poliacrilamida da banda C-5 (43kDa).

O programa MATCH (Fig. 11) comparou a seqüência da enzima Arginina quinase de *A. mellifera* (nº ac. NP\_ 001011603) com todas as seqüências peptídicas deduzidas nesse trabalho, mostrando alta similaridade, o que pode ser explicado pelo fato de serem insetos da mesma ordem (Hymenoptera) e possuírem hábitos sociais e um sistema haplodiploide de determinação genética semelhantes aos de *C. vittatus*.

**MATCH Output- Alignment**

**Maximum similarity position= 180**

```

1 MWDQAVLDKL ETGFSKLSSS DSKSLLKKYL SKDVFDQLKT KKTSFDSTLL DCIQSCIENL
61 DSGWGIYAPD AEAYTLFADL FDPIIEDYHG GFKKTDKHPP KDFGDVDSLG NLDPANEFIIV
121 STRVRCGRSL EGYPFNPCLT EAQYKEMEEK VSSTLSCLEG ELKGTFYPLT GMSKETQQL
181 LIDDHFLFK DRFLQAANAC RFWPTGRGIY HMDDKTFLWW CNEEDHLRII SMQMGGDLGQ
241 VYRRLVHAWN EIEKRLPSH NDILGFLTFC PTNLGTTVRA SVHIKLPKLA ANPAKLEETIA
301 GKFNLQVRCI RCEHTEAEGG IYDISNKRRQ CLTEYQAVIE MHDGIAELIK LEKEL

```

Figura 11 – Alinhamento da proteína Arginina quinase de *A. mellifera* (NP\_001011603) com as seqüências deduzidas da banda C-5 de *C. vittatus*.

O máximo de similaridade foi obtido na posição 180 (Fig. 11), onde a seqüência LIDDHFLFK (Fig. 8) apresentou alinhamento de 100%.

A comparação com a seqüência de *A. mellifera*, permitiu distinguir os isômeros Leu e Ile, além de possibilitar a modificação de alguns peptídeos deduzidos.

A seqüência LxPFSNHDR m/z 493 [M+2H<sup>+</sup>] representa a posição 256-263 de ArgK de *A. mellifera* e a partir dessa informação pode ser corrigida para LPFSHNDR através da série de íons tipo y: 873.3, 775.3, 628.5, 541.8, 404.8, 289.9 e 175.

O peptídeo m/z 561[M+2H<sup>+</sup>] tem a seqüência deduzida como LxGLxTELxGYQK e quando comparada a ArgK de *A. mellifera* pode ter seu espectro ajustado para a seqüência LGLTEYQAVK, correspondente à posição 330-339.

O peptídeo m/z 617 [M+2H<sup>+</sup>], com seqüência deduzida como FLxDDTLxGSHTK, quando procurado na seqüência de ArgK de *A. mellifera* pode ser completamente reformulado para EMNDGIAELIK e pode ser testado para compatibilidade da presença da série de fragmentos do tipo y como sendo: 1103.58, 972.54, 858.49, 743.47, 686.45, 573.36, 502.32, 373.28, 260.20, 147.11.

Após as modificações das seqüências deduzidas, outro alinhamento foi realizado utilizando-se o programa MATCH (Fig. 12 e Tabela 1), onde o máximo de similaridade foi encontrado na posição 340 e a ordem dos peptídeos pode ser conhecida.

**MATCH Output - Alignment**

Maximum similarity is 345.049 at position 340

```

1 MVDQAVLDKL ETGFSKLSSS DSKSLLKKYL SKDVFDQLKT KRTSF DSTLL DCIQSGIENL
61 DSGVG IYAPD AEAYTLFADL FDPII E DYHG GFKKTDKHPP KDFG D VDSL G NLD PANE FIV
121 STRVRCGRSL EGYPFNPCLT EAQYKEMEEK VSSTLSCLEG ELRGT FYPLT CMSKETQQQL
VSSTLSCQVE LK L
181 LDDHFLPK EG DRFLQAA NAC RFWPTGRGIY HMDDKTFLWV CNEEDHLRII SMQMG GDLGQ
LDDHFLPK
241 VYRRLVHAWN EIEKRL L FSH NDR LGFL TFC PTNL GTTVPA SWHKL PKLA ANRAK LEEIA
LPFSH NDR
301 GKFNLQVRGT RGEHT EAEGG IYDISNK RRE GLTEYQAVK E MNDGIAELIK LEKEL
L GLTEYQAVK E MNDGIAELIK

```

↓ MAXIMUM SIMILARITY POSITION= 340

Figura 12 – Alinhamento da proteína Arginina quinase de *A. mellifera* (NP\_001011603) com as seqüências deduzidas e reformuladas da banda C-5 de *C. vittatus*.

Tabela 1 – Alinhamento (MATCH) das seqüências dos peptídeos deduzidos e reformulados da banda C-5 (43kDa) de *C. vittatus* com a seqüência de Arginina Quinase de *A. mellifera* (NP\_001011603).

Peptídeo Deduzido	Massa do Peptídeo Deduzido (kDa)	Alinhamento (Match)*	Massa do Peptídeo de <i>A. mellifera</i> (kDa) **	Posição do Peptídeo Deduzido na Seqüência
VSSTLSCQVELK	1,247	VSSTLSCQVELK EEKVSSTLSCLEGELKGT	1,32	151 – 162
LIDDHFLFK	1,147	LIDDHFLFK QQKLIDDHFLFKEGD	1,15	180 – 188
LPFSHNDR	0,985	LPFSHNDR EKRLLFHSNDRLG	1,0	256 – 263
LGLTEYQAVK	1,121	LGLTEYQAVK KRLGLTEYQAVKEMH	1,12	330 – 339
EMNDGIAELIK	1,233	EMNDGIAELIK AVKEMHDGIAELIKLEK	1,26	340 – 350

\* As cores representam identidade (vermelho) ou similaridade C-terminal (amarelo).

\*\* Obtida pelo programa Protein Molecular Weight.

Através da Tabela 1 percebe-se que quatro peptídeos deduzidos apresentaram alta identidade com a enzima ArgK de *A. mellifera*. Embora não completamente idêntico, o peptídeo m/z 625 [M+2H<sup>+</sup>] de seqüência deduzida como VSSTLxSGQVELxK, compartilha similaridade na porção N-terminal (VSSTLSG...) e C-terminal (...ELK).

Os alinhamentos das seqüências de ArgK de vários artrópodes com todas as seqüências deduzidas e reformuladas de *C. vittatus*, através de alinhamentos múltiplos pelo programa ClustalW (<http://services.bioasp.nl/blast/cgi-bin/clustal.cgi>), mostraram ser regiões conservadas (Tabela 2, 3, 4, 5 e 6).

Tabela 2 – Alinhamento do peptídeo VSSTLSGQVELK de *C. vittatus* por ClustalW, com seqüências de Arginina quinase de vários artrópodes, mostrando a posição de alinhamento.

ARTRÓPODES	NÚMERO DE ACESSO	SEQÜÊNCIA	POSIÇÃO
Homarus gammarus	CAA48654	MEEKVSSTLSGLEGELKGSY	148-167
Chasmagnathus granulata	AAF43438	MESKVSSTLSNLEGELKGTY	148-167
Bombyx mori	ABD36282	MEDKVSGLSSLEGELKGTF	147-166
Limulus polyphemus	P51541	MEEKVSSTLSSMEDELKGTY	148-167
Schistocerca americana	AAC47830	MEQKVSTTLSSLEGELKGQF	148-167
Apis mellifera	NP_001011603	MEEKVSSTLSGLEGELKGTF	147-166
Oncometopia nigricans	AAU95198	MEEKVSSTLSGLEGELKGAF	148-167
Homalodisca coagulata	AAT01074	MEEKVSSTLSGLEGELKGAF	148-167
Blattella germanica	ABC86902	MEDKVSSTLSGLEGELKGQF	148-167
Drosophila melanogaster	AAA68172	MESKVSSTLSGLEGELKGKF	148-167
Camponotus vittatus		-----VSSTLSG-QVELK---	
<b>CONSENSO</b>		<b>*** *** ***</b>	<b>151-163<sup>1</sup></b>

<sup>1</sup> Posição do peptídeo de *C. vittatus* na seqüência de *A. mellifera*.

Tabela 3 – Alinhamento do peptídeo LIDDHFLFK de *C. vittatus* por ClustalW, com seqüências de Arginina Quinase de vários artrópodes, mostrando a posição de alinhamento.

ARTRÓPODES	NÚMERO DE ACESSO	SEQÜÊNCIA	POSIÇÃO
Apis mellifera	NP_001011603	KETQQQLIDDHFLFKEGDRF	174-193
Bombyx mori	ABD36282	KETQQQLIDDHFLFKEGDRF	174-193
Oncometopia nigricans	AAU95198	KEVQQQLIDDHFLFKEGDRF	175-194
Homalodisca coagulata	AAT01074	KEVQQQLIDDHFLFKEGDRF	175-194
Blattella germanica	ABC86902	KEVQQQLIDDHFLFKEGDRF	175-194
Schistocerca americana	AAC47830	KEVQQQLIDDHFLFKEGDRF	175-194
Drosophila melanogaster	AAA68172	KAVQQQLIDDHFLFKEGDRF	175-194
Homarus gammarus	CAA48654	KEVQQQLIDDHFLFKEGDRF	175-194
Chasmagnathus granulata	AAF43438	KEVQQQLIDDHFLFKEGDRF	175-194
Camponotus vittatus		-----LIDDHFLFK-----	
Limulus polyphemus	P51541	KATQQQLIDDHFLFKEGDRF	175-194
<b>CONSENSO</b>		*****	<b>180-188<sup>1</sup></b>

<sup>1</sup> Posição do peptídeo de *C. vittatus* na seqüência de *A. mellifera*.

Tabela 4 – Alinhamento do peptídeo LPFSHNDR de *C. vittatus* por ClustalW, com seqüências de Arginina Quinase de vários artrópodes, mostrando a posição de alinhamento.

ARTRÓPODES	NÚMERO DE ACESSO	SEQÜÊNCIA	POSIÇÃO
Bombyx mori	ABD36282	VNEIEKKIPFSHHDRLGFLT	248-268
Schistocerca americana	AAC47830	VNEIEKRPFSHDDRLGFLT	249-269
Blattella germanica	ABC86902	VNDIEKRPFSHDDRLGFLT	249-269
Oncometopia nigricans	AAU95198	VNDIEKRPFSHNDRLGFLT	249-269
Homalodisca coagulata	AAT01074	VNDIEKRPFSHNDRLGFLT	249-269
Homarus gammarus	CAA48654	VNDIEKRPFSHHDRLGFLT	249-269
Chasmagnathus granulata	AAF43438	VNDIEKRPFSHHDRLGFLT	249-269
Drosophila melanogaster	AAA68172	VNEIEKRPFSHDDRLGFLT	249-269
Apis mellifera	NP_001011603	VNEIEKRLLFSHNDRLGFLT	248-268
Limulus polyphemus	P51541	VDNIESKLPFSHDDRGFLT	249-269
Camponotus vittatus		-----LPFSHNDR-----	
<b>CONSENSO</b>		*** **	<b>256-263<sup>1</sup></b>

<sup>1</sup> Posição do peptídeo de *C. vittatus* na seqüência de *A. mellifera*.

Tabela 5 – Alinhamento do peptídeo LGLTEYQAVK de *C. vittatus* por ClustalW, com seqüências de Arginina quinase de vários artrópodes, mostrando a posição de alinhamento.

ARTRÓPODES	NÚMERO DE ACESSO	SEQÜÊNCIA	POSIÇÃO
Oncometopia nigricans	AAU95198	SNKRRMGLTEYQAVKEMNDG	326-345
Homalodisca coagulata	AAT01074	SNKRRMGLTEYQAVKEMNDG	326-345
Blattella germanica	ABC86902	SNKRRMGLTEYDAVKGMNDG	326-345
Schistocerca americana	AAC47830	SNKRRMGLTEYDAVKEMNDG	326-345
Drosophila melanogaster	AAA68172	SNKRRMGLTEFEAVKEMYDG	326-345
Bombyx mori	ABD36282	SNKRRMGLTEYDAVKEMYDG	325-344
Homarus gammarus	CAA48654	SNKRRMGLTEFQAVKEMQDG	326-345
Chasmagnathus granulata	AAF43438	SNKRRMGLTEFQAVKEMQDG	326-345
Apis mellifera	NP_001011603	SNKRLGLTEYQAVKEMHDG	325-344
Camponotus vittatus		-----LGLTEYQAVK-----	
Limulus polyphemus	P51541	SNKRLGLTEYQAVREMQDG	326-345
<b>CONSENSO</b>		***** **	<b>330-339<sup>1</sup></b>

<sup>1</sup> Posição do peptídeo de *C. vittatus* na seqüência de *A. mellifera*.

Tabela 6 – Alinhamento do peptídeo EMNDGIAELIK de *C. vittatus* por ClustalW, com seqüências de Arginina quinase de vários artrópodes, mostrando a posição de alinhamento.

ARTRÓPODES	NÚMERO DE ACESSO	SEQÜÊNCIA	POSIÇÃO
Oncometopia nigricans	AAU95198	AVKEMNDGIAELIKIEREL-	338-356
Camponotus vittatus		---EMNDGIAELIK-----	
Homalodisca coagulata	AAT01074	AVKEMNDGIAELIKIEREL-	338-356
Blattella germanica	ABC86902	AVKGMNDGIAELIKIESSL-	338-356
Schistocerca americana	AAC47830	AVKEMNDGILELIKIEGSL-	338-356
Homarus gammarus	CAA48654	AVKEMQDGILELIKIEKEM-	338-356
Chasmagnathus granulata	AAF43438	AVKEMQDGILELIKIEKEMQ	338-357
Drosophila melanogaster	AAA68172	AVKEMYDGITELIKLEKS--	337-354
Apis mellifera	NP_001011603	AVKEMHDGIAELIKLEKEL-	337-355
Bombyx mori	ABD36282	AVKEMYDGIAELIKIEKSL-	337-355
Limulus polyphemus	P51541	AVREMQDGILEMIKMEKAAA	338-357
<b>CONSENSO</b>		* *** * **	<b>340-350<sup>1</sup></b>

<sup>1</sup> Posição do peptídeo de *C. vittatus* na seqüência de *A. mellifera*.

A enzima ArgK é um membro conservado da família das *Phosphagem-kinases* encontrada nos invertebrados, funcionando como um análogo da creatina quinase nos vertebrados (STRONG & ELLINGTON, 1995; ZHOU *et al.*, 1998; AZZI *et al.*, 2004).

A ArgK catalisa a transferência reversível de um fosfato entre o ATP e substratos guanidinos, agindo no tamponamento pelo ATP em células que necessitam de uma rápida resposta energética (ZHOU *et al.*, 1998).

Nos organismos, a molécula de ATP é usada como fonte de energia para realizar as várias reações químicas necessárias das células. Tecidos com alto gasto de ATP, como cérebro e músculos, têm poucos segundos para suprir suas necessidades energéticas e dependem de “reservatórios de energia” que possam funcionar como rápidos repositórios desse ATP. Nos invertebrados, a fosfoarginina possui essa capacidade em presença de ArgK (DUMAS & CAMONIS, 1993).

A fosfoarginina é sintetizada em uma reação reversível entre arginina e ATP, sendo catalisada pela enzima ArgK, presente na maioria dos invertebrados, onde desempenha papel importante na manutenção dos níveis normais de ATP (AZZI *et al.*, 2004). Para alguns autores, a importância fisiológica dessa reação estaria na capacidade metabólica da ArgK de regular os níveis de síntese de ATP em células que alternam entre períodos de baixo e alto consumo energético.

Schneider *et al.* (1989) demonstraram o sistema de tamponamento energético dessa enzima no músculo femoral de gafanhotos. Chamberlin (1997) observou ArgK em intestino de *Manduca sexta* e Kucharski & Maleszka (1998)

relacionaram a alta expressão da ArgK nos olhos compostos de *A. mellifera*, favorecendo a rápida regeneração energética em mudanças de luminosidade, devido ao comportamento de forrageamento das operárias.

Brown e Grossman (2004), em estudos com baratas, analisaram os mecanismos e modos de inibição da ArgK e notaram que nitratos e boratos interferem em sua ação.

Em formigas, ainda não há estudos a respeito dessa enzima, entretanto, a ingestão do ácido bórico por *C. vittatus* mostrou interferência em sua expressão. A supressão da ArgK no grupo Tratado, evidenciada no gel da Fig.1, estaria comprometendo o funcionamento do sistema de homeostase pelo ATP e depletando importante fonte de energia para o trabalho muscular, prejudicando assim, as reações metabólicas fundamentais para a sobrevivência da formiga.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R. & MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. v.422, p.198-207, 2003.

AZZI, A., CLARK, S.A., ELLINGTON, W.R. & CHAPMAN, M.S. The role of phosphagen specificity loops in arginine kinase. *Protein Science*. v.13, p.575-585, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* v.72, p. 248-254, 1976.

BUENO, O. C. & CAMPOS-FARINHA, A. E. C. Formigas Urbanas: comportamento das espécies que invadem as cidades brasileiras. *Vetores & Pragas*. Ano I, n.12, p.13-16, 1998.

CAMPOS-FARINHA, A. E. de C., BUENO, O. C., CAMPOS, M. C. G. & KATO, L. M. As formigas urbanas no Brasil: retrospecto. *Biológico*. São Paulo. v.64, n.2, p.129-133, 2002.

CHAMBERLIN, M.E. Mitochondrial arginine kinase in the midgut of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*). *J. Exper. Biol.* v.200, p.2789-2796, 1997.

CLARK, D. B., GUAYASAMIN, C., PAZAMINO, O., DONOSO, C. & PAEZ DE VILLACIS, Y. The tramp ant *Wasmannia auropunctata*: Autecology and effects on ant diversity and distribution on Santa Cruz Island, Galapagos. *Biotropica*. v.14, p.196-207, 1982.

DAANE, K.M., SIME, K.R., HOGG, B.N., BIANCHI, M.L., COOPER, M.L., RUST, K.M. & KLOTZ, J.H. Effects of liquid insecticide baits on Argentine ants in California's coastal vineyards. *Crop Protection*. p.1-11, 2005.

DAVIES, N.W., WIESE, M.D. & BROWN, S.G.A. Characterization of major peptides in 'jack jumper' ant venom by mass spectrometry. *Toxicon*. v.43, p.173-183, 2004.

DUMAS, C. & CAMONIS, J. Cloning and sequence analysis of the cDNA for arginine kinase of lobster muscle. *J. Biol. Chem.* v.29, p.21599-21605, 1993.

FOLGRAIT, P.J. Ant biodiversity and its relationship to ecosystem functioning: a review. *Biodivers. Conserv.* v.7, p.1221-1224, 1998.

FURLONG, J., MARTINS, J. R. & PRATA, M. C. A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. *A Hora Veterinária*. v.23, n.137, p.53-56, 2004.

HÖLLDOBLER, B. & WILSON, E. O. *The ants*. Massachusetts: Belknap Press of Harvard University, 1990. 732p.

KLOTZ, J.H., OI, D.H., VAIL, K.M. & WILLIAMS, D. F. Laboratory evaluation of a boric acid liquid bait on colonies of *Tapinoma melanocephalum*, Argentine ants and Pharaoh ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* v.89, p.673-677, 1996.

KLOTZ, J.H., GREENBURG, L., AMRHEIN, C. & RUST, M.K. Toxicity and repellency of borate-sucrose water baits to Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* v.93, p.1256-1258, 2000.

KLOTZ, J.H., RUST, M.K., COSTA, H.S., REIERSON, D.A. & KIDO, K. Strategies for controlling Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae) with sprays and baits. *J. Agric. Urban. Entomol.* v.19, p.85-94, 2002.

KUCHARSKI, R. & MALESZKA, R. Arginine kinase is highly expressed in the compound eye of the honey bee, *Apis mellifera*. *Gene*. v.211, p.343-349, 1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v.227, p.680-685, 1970.

LEONCINI, I., CONTE, Y. L., COSTAGLIOLA, G., PLETTNER, E., TOTH, A. L., WANG, M., HUANG, Z. BECARD, J., CRAUSER, D., SLESSOR, K.N. & ROBINSON, G.E. Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v.101, n.50, p.17559-17564, 2004.

PASSERA, L. Characteristic of tramp species. In: WILLIAMS, D.F. (Ed.) *Exotic ant*. Boulder: Westview Press, 1994. p. 23-43.

SCARSELLI, R., DONADIO, E., GIUFFRIDA, M.G., FORTUNATO, D., CONTI, A., BALESTRERI, E., FELICIOLE, R. PINZAUTI, M., SABATINI, A.G. & FELICIOLE, A. Towards royal jelly proteome. *Proteomics*. v.5, p.769-776, 2005.

SCHNEIDER, A., WIESNER, R.J. & GRIESHABER, M.K. On the role of arginine kinase in insect flight muscle. *Insect Biochem*. v.19, p.471-480, 1989.

STRONG, S.J. & ELLINGTON, W.R. Isolation and sequence analysis of the gene for arginine kinase from the chelicerate arthropod, *Limulus hauser*, Advances in Life Sciences, *Basel*, p.66-74, 1995.

TRIPP, J.M., SUITER, D.R., BENNETT, G.W., KLOTZ, J.H. & REID, B.L. Evaluation of control measures for Black Carpenter Ant (Hymenoptera: Formicidae). *Jour. Econ. Entomol.* v.93, p.1493-1497, 2000.

ZHOU, G., SOMASUNDARAM, T., BLANC, E., PARTHASARATHY, G., ELLINGTON, W.R. & CHAPMAN, M.S. Transition state structure of arginine kinase: implications for catalysis of biomolecular reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.95, p.8449-8454, 1998.

---

## CAPÍTULO II

PERFIL ESTERÁSICO DE *Camponotus vittatus*  
(HYMENOPTERA: FORMICINAE) TRATADAS COM  
ISCAS LÍQUIDAS DE ÁCIDO BÓRICO

---

## RESUMO

O ácido bórico, um tipo de inseticida inorgânico, está sendo bastante utilizado no controle das formigas. Iscas líquidas, em baixas concentrações, têm se mostrado eficientes, pois agem lentamente e não são repelidas pelas formigas. As esterases pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam preferencialmente ésteres de ácidos carboxílicos. São classificadas pela especificidade a substratos e sensibilidade a inibidores. Nos insetos, estão relacionadas com a regulação dos níveis de Hormônio Juvenil, processos digestivos e degradação de inseticidas. Esse trabalho analisou os efeitos do ácido bórico, utilizado como método de controle em *Camponotus vittatus*, na atividade esterásica dessas formigas. As esterases foram coradas com  $\alpha$  e  $\beta$  naftil acetato e classificadas por testes de inibição. Foram detectadas seis regiões com atividade esterásica, denominadas de EST1 a EST6 e identificadas como  $\alpha$  e  $\beta$  esterases. EST1, EST2 e EST3 foram classificadas como acetilcolinesterases e EST4, EST5 e EST6, classificadas como acetilesterases. A EST3 foi detectada somente no grupo Tratado com ácido bórico. EST1 e EST2 apresentaram aumento de intensidade de expressão no grupo Tratado quando comparado ao Controle. A EST3, presente somente no grupo Tratado, e o aumento da expressão de EST1 e EST2 nesse grupo, colocam essas enzimas como candidatas a esterases-resistência específicas, utilizadas pelas formigas na tentativa de detoxificação e/ou resistência ao ácido bórico.

PALAVRAS – CHAVE: esterase, ácido bórico, *Camponotus vittatus*

## ABSTRACT

The boric acid, a type of inorganic insecticide, has been largely used in ant control. Aqueous baits, in lower concentrations, have been very efficient because they act slowly and aren't repelled by the ants. Esterases belong to an enzyme group that preferentially hydrolyzes carboxyl acid esters. They are classified by their substrate and inhibitor specificity. In insects they are related with the Juvenile Hormone levels, digestive processes and insecticide degradation. This work analyzed the esterase activity of *Camponotus vittatus* treated with boric acid. The esterases were stained with  $\alpha$  and  $\beta$ -naphthyl acetate and classified by inhibition tests. Six regions with esterase activity were detected, denominated EST1 to EST6 and identified as  $\alpha$ - $\beta$  esterases. EST1, EST2 and EST3 were classified as acetylcolinesterases, whereas EST4, EST5 and EST6 were classified as acetylesterases. EST3 was detected just in the acid boric Treated group. EST1 and EST2 showed an increasing expression in Treated group when compared with the Control Group. The presence of EST3 in the Treated group as well as EST1 and EST2 increased expression in this group place this enzymes as candidates of specific resistance esterases, utilized by ants in a detoxification trial and/or an acid boric resistance.

KEY-WORDS: esterases, boric acid, *Camponotus vittatus*

## INTRODUÇÃO

O ácido bórico é um tipo de inseticida inorgânico que tem sido utilizado no controle de formigas e baratas há muito tempo (RUST, 1986).

Iscas líquidas com ácido bórico, em pequenas concentrações, estão sendo utilizadas no combate às formigas e tem sido demonstrada sua eficiência no controle, pois agem lentamente e não são repelidas por elas (KLOTZ *et al.*, 1996, 1997, 1998, 2000, 2002; HOOPER-BUI & RUST, 2000).

As esterases pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam, preferencialmente, ésteres de ácidos carboxílicos, podendo atuar também sobre outros substratos que contenham ligações amida. Podem ser classificadas por meio de sua especificidade a substratos e sensibilidade a inibidores (OAKESHOTT *et al.*, 1993). A atividade dessas enzimas é demonstrada utilizando métodos histoquímicos de coloração com substratos sintéticos, como por exemplo, ésteres de naftol (BREWER, 1970), sendo o  $\alpha$ - e o  $\beta$ - naftil acetatos os mais utilizados. Devonshire (1975) classificou essas enzimas com base na sua mobilidade em géis de eletroforese e Vaughan & Hemingway (1995) usaram como critério, a preferência pelos substratos  $\alpha$  e  $\beta$ -naftil acetatos.

Outra classificação bastante utilizada baseia-se na sensibilidade a diferentes inibidores, dividindo as esterases em quatro classes (HOLMES & MASTERS, 1967; OAKESHOTT *et al.*, 1993): arilesterases, carboxilesterases, acetilesterases e colinesterases. Os testes de inibição para caracterização

bioquímica de esterases têm sido importantes para o entendimento dos diferentes processos fisiológicos nos quais essas enzimas atuam.

Inseticidas, principalmente carbamatos e organofosforados atuam como inibidores da AChE. Alterações da AChE para uma forma insensível tem sido demonstradas como importante mecanismo de resistência em vários artrópodes-praga (Li *et al.*, 2004).

Acetilcolinesterase é uma enzima que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, finalizando a transmissão do impulso nervoso e permitindo a repolarização da membrana pós-sináptica. Os efeitos biológicos, causados pelo excesso desse neurotransmissor são hiperatividade das fibras musculares, fadiga, paralisia muscular e morte (SPINOSA *et al.*, 2002).

Nos insetos, as esterases são sintetizadas pelo corpo gorduroso e são encontradas na hemolinfa e em outros tecidos.

Essas enzimas podem, também, estar relacionadas com outras atividades fisiológicas, como a regulação dos níveis de Hormônio Juvenil (HIDAYAT & GOODMAN, 1994); processos digestivos (ARGENTINE & JAMES, 1995); comportamento reprodutivo (LABATE *et al.*, 1990); metabolismo de agrotóxicos e fármacos e na resistência a inseticidas (WHEELOCK *et al.*, 2005). Recentemente, as esterases estão sendo utilizadas como bioindicadores de poluição em organismos expostos a agroquímicos (RICKWOOD & GALLOWAY, 2004).

Os dados de literatura mostram que as esterases têm sido detectadas em todas as fases do desenvolvimento e em muitos tecidos dos insetos, o que

demonstra a importância desta classe de enzimas no desenvolvimento normal desses organismos e reforça a relevância de novos estudos nesta área (MARTINS & CONTEL, 2001).

Com a utilização do ácido bórico como um método de controle entre formigas urbanas, esse trabalho investigou o perfil esterásico de *C. vittatus* tratadas com isca líquida dessa substância, a fim de acrescentar dados sobre seus efeitos no metabolismo e na eficiência ao combate desses insetos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Biológico

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética do Comportamento do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, onde são mantidas colônias de *C. vittatus* (Fig. 1) capturadas em diversas residências de Uberlândia-MG.



Figura 1: Formigas *C. vittatus* mantidas no Laboratório de Genética do Comportamento.

Para o teste foram coletadas operárias com uniformidade de tamanho, divididas em bandejas plásticas de 20x28cm, separadas em dois grupos de 15 indivíduos cada: Controle e Tratado, sendo os experimentos conduzidos em triplicata. As formigas foram mantidas sob condições naturais de temperatura e umidade e desprovidas de alimento nas primeiras 24h. Após esse período, as

formigas foram tratadas com isca de ácido bórico 0,1M ([Al] 99% Sigma-Aldrich USA) dissolvido em solução de sacarose (água deionizada a 10% de sacarose) e o Controle, igualmente manipulado, recebeu apenas solução de sacarose 10%. Ambos os grupos receberam como fonte protéica larva de besouro *Tenebrio* e um suprimento de água em tubo de ensaio com algodão na extremidade livre.

Durante 30 dias sucessivos, as operárias mortas do grupo Tratado e, vivas do grupo Controle, foram coletadas e armazenadas a – 80°C para posterior análise do perfil esterásico.

### **Preparo das Amostras**

Foram maceradas cinco formigas do grupo Tratado e cinco do Controle em nitrogênio líquido, sendo solubilizadas em Tampão Fosfato de Sódio 0,01M pH 6,5 (glicerol a 10%, azul de bromofenol a 0,001%, sacarose a 20%, EDTA 0,001M e Triton X-100 a 0,5%) e submetidas à centrifugação a 15.000g por 10min a 4°C.

A dosagem de proteínas foi realizada com base no princípio proteína-corada, de acordo com Bradford (1976). Nesse método, utilizou-se soro albumina bovina (BSA) como proteína padrão (Anexo I).

A cada um dos tubos foi adicionado 3ml de reagente de Bradford. A leitura em espectrofotômetro (HITACHI U-2000 Spectrophotometer) a 595nm, foi feita depois de, no mínimo, 2min, tempo suficiente para o reagente de Bradford sensibilizar as amostras.

Todas as amostras, incluindo a curva padrão, foram processadas em duplicatas e utilizou-se os valores das médias aritméticas das amostras.

A equação da reta foi obtida utilizando-se o programa EXCEL (MICROSOFT OFFICE 2000) e as médias das leituras foram substituídas, nessa equação, para se obter a concentração de proteína de cada amostra. A partir da quantificação, padronizou-se as concentrações a serem utilizadas. Foram aplicados 100 $\mu$ g de cada amostra em gel de poliacrilamida nativo para análise.

### **Teste Eletroforético**

O sobrenadante de ambos os grupos foram aplicados em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes, de acordo com o método de Laemmli (1970) com algumas modificações, utilizando-se gel de separação a 12% e empilhamento a 4% preparados com Tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8 e Tris-HCl 0,5M pH 6,8, respectivamente (Anexo II). Foram aplicados 100 $\mu$ g de proteína total por amostra. A eletroforese foi conduzida a uma voltagem constante de 120V em Tampão de corrida Tris (0,087M) - Glicina (0,013M) pH 8,3 por 5h.

### **Identificação das Esterases**

A identificação das bandas com atividade esterásica, nos géis, baseou-se no método de coloração de acordo com Steiner & Johnson (1973), com pequenas modificações. Os géis foram pré-incubados à temperatura ambiente em 100ml de tampão fosfato 0,1M pH 6,2 por 20min. Após esse período, foram submetidos à

coloração por 45min à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. A solução de coloração foi preparada com 50mg de  $\beta$ -naftil acetato e/ou 50mg de  $\alpha$ -naftil acetato, dissolvidos em 1ml de acetona e misturados com uma solução recém-preparada e filtrada, contendo 100ml de tampão fosfato 0,1M pH 6,5 e 100mg de

*Fast Blue RR Salt.*

As atividades das  $\alpha$  e  $\beta$  esterases foram visualizadas nos géis como bandas de coloração preta e vermelha, indicando a hidrólise preferencial do  $\alpha$  ou do  $\beta$  naftil-acetato, respectivamente, ou ambos. As bandas com atividade esterásica foram numeradas a partir da extremidade anódica do gel.

Após a coloração, os géis foram tratados com 100ml de solução de descoloração contendo álcool etílico comercial: ácido acético: glicerol (5:2:0,3) diluídos em 1L de água, por 24 a 48h.

### **Teste com inibidores**

Para a caracterização bioquímica das esterases foram realizados testes com os inibidores: sulfato de cobre 1mM, malation 0,4mM e sulfato de eserina 1mM. Todos os compostos foram utilizados separadamente na pré-incubação e nas soluções de coloração. Os géis foram pré-incubados por 30min, no escuro, em tampão fosfato de sódio (0,1M pH 6,5) contendo o inibidor e então foram corados para atividade esterásica em presença do inibidor.

Seguindo a classificação de Oakeshott et al., (1993), as esterases inibidas pelo malation (organofosforado) e pelo sulfato de eserina (carbamato) foram

classificadas como acetilcolinesterases. Esterases inibidas apenas pelo malation foram consideradas carboxilesterases. Sulfato de cobre foi utilizado como inibidor de arilesterase e finalmente aquelas que não são afetadas por nenhum dos inibidores foram consideradas acetilesterases.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise do padrão de bandas esterásicas obtido quando os géis foram submetidos à coloração utilizando os dois substratos simultaneamente, foram detectadas seis regiões com atividade esterásica, denominadas de EST1 a EST6, a partir da extremidade anódica do gel (Fig. 2). O mesmo padrão foi observado nos géis submetidos à coloração com o  $\beta$ -naftil acetato e  $\alpha$ -naftil acetato, separadamente e os resultados gerais são apresentados na Figura 3.

Todas as esterases foram identificadas como  $\alpha$  e  $\beta$  esterases (Fig. 3). Situação semelhante à encontrada em algumas espécies de *Drosophila*, por exemplo, *D. mulleri* e *D. arizonensis* (CERON, 1988; NANYA, 1993); *D. serido* (LAPENTA, 1992) e *D. melanogaster* (WRIGHT & McINTYRE, 1963), cujas regiões esterásicas apresentam afinidade pelo  $\alpha$  e  $\beta$  naftil-acetatos e, portanto, são consideradas  $\alpha$ - $\beta$  esterases (RUIZ, 1995).

A EST3 mostrou ser exclusiva do grupo Tratado, em todas as colorações. Essa esterase pode estar relacionada a mecanismos de degradação do ácido bórico.

É possível levantar duas hipóteses: a primeira é de que essa esterase está sendo produzida pelo organismo na tentativa de degradar o ácido bórico ao qual está sendo submetido; a segunda hipótese é de que a ingestão do ácido bórico induziu uma via alternativa no metabolismo da formiga que, não necessariamente, está associada à degradação do veneno. O ácido bórico ou um

subproduto dele pode estar atuando em um promotor específico e ativando o gene que codifica para EST3.

Oppenoorth (1985) verificou em vários insetos, que a resistência a organofosforados deve-se a dois mecanismos resultantes da modificação estrutural das enzimas detoxificantes ou do aumento da síntese das mesmas.

EST1 e EST2 apresentaram um aumento de intensidade de atividade no grupo Tratado quando comparadas ao Controle. O aumento na expressão destas esterases também pode estar ocorrendo para neutralizar o ácido bórico. Flores *et al.* (2005) verificaram que a superprodução de esterases pode resultar na detoxificação metabólica de ésteres pesticidas por meio de seu seqüestramento e sua hidrólise.

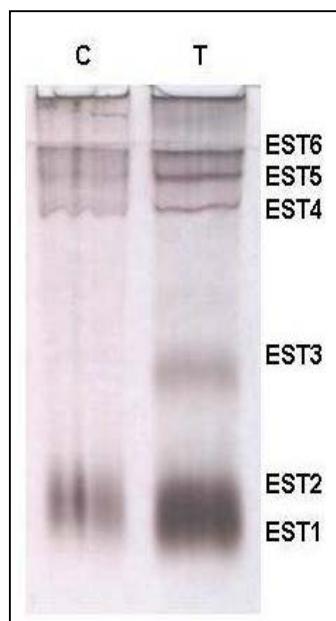


Figura 2 - Perfil esterásico de *C. vittatus* submetidos à coloração com  $\alpha$  naftil-acetato e  $\beta$  naftil-acetato. C-grupo Controle e T-grupo Tratado. Gel de poliacrilamida 10% não desnaturante.

Regiões	$\alpha$ - $\beta$ esterases		$\beta$ esterases		$\alpha$ esterases	
	C	T	C	T	C	T
EST6	—	—	—	—	—	—
EST5	—	—	—	—	—	—
EST4	—	—	—	—	—	—
EST3	—	—	—	—	—	—
EST2	—	—	—	—	—	—
EST1	—	—	—	—	—	—

Figura 3 - Zimograma representativo de presença e ausência das regiões esterásicas dos indivíduos de *C. vittatus* submetidos à coloração com  $\alpha$  naftil-acetato e/ou  $\beta$  naftil-acetato. C-grupo Controle e T-grupo Tratado.

Os testes de inibição para caracterização bioquímica de esterases têm sido importantes para o entendimento dos diferentes processos fisiológicos nos quais essas enzimas atuam.

Os resultados dos testes com inibidores para a caracterização bioquímica das esterases detectadas em *C. vittatus*, no grupo Controle e no grupo Tratado com ácido bórico, estão representados na Tabela 1. Os graus de inibição apresentados estão classificados de acordo com a intensidade das bandas (OAKESHOTT *et al.*, 1993).

Os testes de inibição indicaram que as EST1, EST2 e EST3 foram muito pouco afetadas pelo sulfato de cobre. Sulfato de eserina inibiu completamente essas esterases, que também foram inibidas pelo malation, sendo classificadas como acetilcolinesterases. As enzimas (EST4, EST5 e EST6) não foram afetadas

ou fracamente afetadas pelos inibidores malation e sulfato de cobre, e, portanto, foram classificadas como acetilesterases .

Tabela 1 – Efeito de inibidores sobre as esterases de *C. vittatus* detectadas no grupo Controle e no grupo Tratado com ácido bórico.

(-) ausência de inibição;

(+,++,++) níveis crescentes de inibição.

Esterases	Malation	Cobre	Eserina	Classificação
EST-1	++	+	+++	Acetilcolinesterases
EST-2	++	+	+++	Acetilcolinesterases
EST-3	-	+	+++	Acetilcolinesterases
EST-4	-	-	-	Acetilesterases
EST-5	+	+	-	Acetilesterases
EST-6	-	+	-	Acetilesterases

Em muitos artrópodes-praga, a resistência a pesticidas tem sido atribuída a um aumento na produção e atividade de enzimas detoxificativas, incluindo CaEs e AChEs (NEWCOMB *et al.*, 1997, HEMINGWAY, 1998). O aumento na produção ou na atividade de esterases pode ser devido a processos de amplificação gênica, ou a eventos de modificações pós-traducionais da molécula. AChEs alteradas, com detoxificação metabólica aumentada, já foram identificadas como o mecanismo primário em populações mexicanas e australianas de *B. microplus*

para o desenvolvimento de resistência a organofosforados (WRIGHT & AHRENS, 1988; BAXTER & BARKER, 1999; HERNANDEZ *et al.*, 2002; BAFFI, 2006).

Apesar de o ácido bórico ser um inseticida inorgânico, as esterases EST1, EST2 e EST3 podem estar sendo expressas numa tentativa de detoxificação desse veneno, o que pode, futuramente, transformar-se em um mecanismo de resistência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARGENTINE, J. A., JAMES, A. A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* v.25, p.621-630, 1995.

BAFFI, M.A. *Esterases e resistência a carrapaticidas no carapato bovino Boophilus microplus* (Acari, Ixodidae). 2006. 108p. [Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais].

BAXTER G.D. & BARKER, S.C. Comparison of acetylcholinesterase genes from cattle ticks. *Int. J. Parasitol.* v. 29, p. 1765-1774, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* v.72, p. 248-254, 1976.

BREWER, G. J. An introduction to isozyme techniques: Academic press, New York and London, 1970, 186 pp.

CERON, C. R. *Padrão de esterases no desenvolvimento de Drosophila mulleri, D. arizonensi e seus híbridos*. 1988. 142p. [Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo-USP, São Paulo].

DEVONSHIRE, A. L. Studies of the acetylcholinesterase from houseflies (*Musca domestica* L.) resistant and susceptible to organophosphorous insecticides. *Biochem. J.* v.149, p.463-469, 1975.

FLORES, A. E., ALBELDANO-VAZQUEZ, W., FERNANDEZ SALAS, I., BADI, M.H., BECERRA, H.L., GARCIA, G.P., FUENTES, S. L., BROGDON, W. G., BLACK IV, W. C. & BEATY, B. Elevated  $\alpha$ -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. *Pestic. Biochem. Physiol.* v.82, p. 66–78, 2005.

HEMINGWAY, J. & KARUNARATNE, S. H. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med. Vet. Entomol.* v.12, p.1-12, 1998.

HERNANDEZ, R., GUERRERO, F. D., GEORGE, J. E. & WAGNER, G. G. Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase-encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* v.32, p.1009-1016, 2002.

HIDAYAT, P. & GOODMAN, W. G. Juvenile hormone and hemolymph juvenile hormone binding protein titers and their interaction in the hemolymph of fourth stadium *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* v.24, n.7, p.709-715, 1994.

HOLMES, R.S. & MASTERS, C.J. The developmental multiplicity and isoenzyme status of cavian esterases. *Biochem. Biophys. Acta.* v.132, p.379-399, 1967.

HOOPER-BUI, L.M. & RUST, M.K. Oral toxicity of abamectin, boric acid, fipronil, and hydramethylnon to laboratory colonies of Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* v.93, p.858-864, 2000.

KLOTZ, J.H., OI, D.H., VAIL, K.M. & WILLIAMS, D. F. Laboratory evaluation of a boric acid liquid bait on colonies of *Tapinoma melanocephalum*, Argentine ants and Pharaoh ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* v.89, p.673-677, 1996.

KLOTZ, J.H., VAIL, K.M. & WILLIAMS, D. Toxicity of a boric acid-sucrose water bait to *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* v.90, p.488-491, 1997.

KLOTZ, J.H., GREENBURG, L. & VENN, E. C. Liquid boric acid bait for control of the Argentine ant (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* v.91, p. 910-914, 1998.

KLOTZ, J.H., GREENBURG, L., AMRHEIN, C. & RUST, M.K. Toxicity and repellency of borate-sucrose water baits to Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* v.93, p.1256-1258, 2000.

KLOTZ, J.H., RUST, M.K., COSTA, H.S., REIERSON, D.A. & KIDO, K. Strategies for controlling Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae) with sprays and baits. *J. Agric. Urban. Entomol.* v.19, p.85-94, 2002.

LABATE, B., GAME, Y., COOKE, H. & OAKESHOTT, J.G. The number and distribution of esterase 6 alleles in populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*. v.63, p.203-208, 1990.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v.227, p.680-685, 1970.

LAPENTA, A. S. Padrões de esterases na superespécie *Drosophila serido* e *D. buzzatii*. 1992. 123p. [Dissertação (Mestrado) - UNESP, Univ. do Estado de São Paulo].

LI, A. Y., DAVEY, R. B., MILLER, R. J. & GEORGE, J. E. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick *Boophilus microplus* (Acari, ixodidae). *J. Med. Entomol.* v.41, p.193-200, 2004.

MARTINS, E. & CONTEL, E.P.B. African dung beetle *Onthophagus gazella* (Coleoptera: Scarabaeidae) esterase isozymes. *Braz. J. Biol.* v.61, p.645-650, 2001.

NANYA, O.S. Estudo de cromossomos politênicos e de síntese protéica sob efeito de choques de temperatura em *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e híbridos. 1993. 130p. [Tese (Doutorado) - UNESP, Univ. do Estado de São Paulo].

NEWCOMB, R.D., CAMPBELL, P.M., OLLIS, D.L., CHEAH, E., RUSSELL, R.J. & OAKESHOT, J.G. A single aminoacid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.94, p.7464-7468, 1997.

OAKESHOTT, J.G., VAN PAPENRECHT, E.A., BOYCE, T.M., HEALY, M.J. & RUSSEL, R.J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetics*. v.90, p.239-268, 1993.

OPPENOORTH, F.J. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In: G. A. KERKUT & L.I. GILBERT (Eds.) *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon, Oxford. 1985, p.731-773.

RICKWOOD, C. J. & GALLOWAY, T. S. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect: A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquatic Toxicology*. v.67, p.45-56, 2004.

RUIZ, L. C. Estudo do Padrão de Esterases em quatro populações de *Haematobia irritans* (mosca-do-chifre). 1995. 107p. [Dissertação (Mestrado) - UNESP, Univ. do Estado de São Paulo].

RUST, M. K. Managing household pests. In: G. W. Bennent and J. M. Owens (eds.), *Advances in urban pest management*. Van Nostrand Reinhold, New York, NY., p. 335-368, 1986.

SPINOSA, H.S., GORNIAK, S.L. & BERNADI, M.M. *Farmacologia aplicada a medicina veterinária*. Ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2002. 768p.

STEINER, W. W. M. & JOHNSON, W. E. Techniques for electrophoreses of Hawaiian *Drosophila*. Us International Biological Program. Island Ecosystems IRP. *Tech. Report*, v.30, p.1-21, 1973.

VAUGHAN, A. & HEMINGWAY, J. Mosquito carboxylesterase Esta21 (A2): cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J. Biol. Chem.* v.270, n.28, p.1744-1749, 1995.

WHEELOCK, C.E., SHAN, G. & OTTEA, J. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *J. Pestic. Sci.* v.30, n.2, p.75-83, 2005.

WRIGHT, F.C. & AHRENS, E.H. Cholinesterase insensitivity: a mechanism of resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* against coumaphos. *J. Med. Entomol.* v.25, p.234-239, 1988.

WRIGHT, T.R.F. & McINTYRE, R.A. A homologous gene-enzyme system. Esterase-6 in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Genetics*. v.48, p.1717-1726, 1963.

---

## **CONCLUSÕES GERAIS**

---

- A análise do perfil de Proteína Total e de esterases em *C. vittatus* permitiu concluir que o ácido bórico altera a expressão de várias proteínas.
- As seqüências deduzidas por espectrometria de massa da proteína correspondente a banda 5 mostraram similaridade com a enzima Arginina quinase de invertebrados.
- Foram detectadas seis regiões com atividade esterásica, denominadas de EST1 a EST6, todas identificadas como  $\alpha$ - $\beta$  esterases.
- As EST1, EST2 e EST3 foram classificadas como acetilcolinesterases, e as EST4, EST5 e EST6 foram classificadas como acetilesterases.
- A EST3 foi exclusiva do grupo Tratado com ácido bórico e as EST1 e EST2 apresentaram aumento de intensidade no grupo Tratado quando comparadas ao Controle.
- A presença de EST3 no Grupo Tratado, bem como o aumento da expressão de EST1 e EST2 sugerem que tais esterases possam estar relacionadas a uma tentativa de detoxificação e/ou resistência ao ácido bórico.

---

## **ANEXOS**

---

**ANEXO I****Preparação da curva padrão BSA**

Tubos	Volume BSA (μl)	Volume H <sub>2</sub> O (μl)	Volume Final (μl)
1	0	100	100
2	5	95	100
3	10	90	100
4	15	85	100
5	20	80	100
6	25	75	100
7	30	70	100

**ANEXO II****Gel de Separação não desnaturante (10%)**

SOLUÇÕES	VOLUME (mL)
Água deionizada	5,87
Acrilamida – Bis-acrilamida (30:0,8)	4,33
TampãoTRIS-HCL 1,5M pH 8,8	2,6
Persulfato de amônia 10%	0,15
Temed	0,020

**Gel de Empilhamento não desnaturante (4%)**

SOLUÇÕES	VOLUME (mL)
Água deionizada	3,0
Acrilamida–Bis-acrilamida (30:1,6)	0,675
Tris-HCL 0,5M (pH 6,8)	1,25
Persulfato de amônio 10%.	0,050
Temed	0,020