

SOPHIA MOTTA GROSSI

**Isolamento, identificação e desenvolvimento de compostos com potencial
atividade em *Aedes aegypti***

BRASÍLIA, 2021

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

SOPHIA MOTTA GROSSI

**Isolamento, identificação e desenvolvimento de compostos com potencial
atividade em *Aedes aegypti***

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.**

Orientadora: Profa. Dra. Laila Salmen Espindola

BRASÍLIA

2021

Dedico este trabalho aos meus pais, meus maiores incentivadores e amigos.

SOPHIA MOTTA GROSSI

**Isolamento, identificação e desenvolvimento de compostos com potencial
atividade em *Aedes aegypti***

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.**

Aprovado em 16 de julho de 2021

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Laila Salmen Espindola

Presidente

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Ciro Martins Gomes

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Leandro de Santis Ferreira

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Dra. Patrícia Cardoso Cortelo - Suplente

Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades e pessoas que Ele coloca em meu caminho. Por transbordar minha vida de alegria e gratidão.

Aos meus pais, os verdadeiros amores da minha vida, meus maiores incentivadores, minhas pessoas preferidas nesse mundo, obrigada por tudo!

À equipe do Laboratório de Farmacognosia, obrigada por fazerem meus dias mais felizes, leves e cheios de boas memórias. Agradeço imensamente por trabalhar aonde me sinto em casa, acolhida, amada e respeitada.

À Profa. Dra. Laila S. Espindola, que mesmo quando a maioria dos professores da Farmácia não acreditavam em mim, ela sempre acreditou, apoiou e digo mais, apostou em mim! Obrigada professora! Obrigada por me presentear com a oportunidade de fazer parte dessa equipe linda! Obrigada por me ensinar tanto! Obrigada por toda paciência e dedicação! E obrigada por ser essa grande inspiração, por toda paixão e respeito com a educação!

À Profa. Dra. Lorena Albernaz minha primeira mãe nessa caminhada! O jeito que você tocou o meu coração naquele terceiro semestre prof, jamais vou esquecer! Obrigada por ser mãe e amiga! Por ser amor, alegria e cuidado! Obrigada por acreditar em mim! Obrigada por ser inspiração!

À minhas amigas do laboratório, em especial, Laís e Paula, sem vocês nem sei como teria enfrentado essa pandemia ou como aguentaria os dias em que nada dava certo. Minhas amigas do Lab e da vida, obrigada por sempre me darem o colo que eu preciso e por acreditarem em mim quando eu mesma não consigo! Obrigada por tanto! Vocês me dão alegria, conforto e paz! Me ensinam, me apoiam, me encorajam!

À Natalia, por estar sempre disposta a me ajudar, me ouvir e me acalmar. Obrigada por ser um ser de luz na minha vida e uma grande inspiração, além de uma amiga!

Ao Prof. Dr. Sebastião José de Melo, é uma honra aprender com o senhor! Obrigada pelos ensinamentos, paciência, alegria e apoio!

Ao Prof. Dr. João Paulo B. Sousa, obrigada pela paciência, ensinamentos, ajuda e as boas risadas quando tudo parecia que não tinha mais jeito.

Ao Prof. Daniel Demarque que ensina e se preocupa como ninguém! Obrigada por nos enxergar como seres humanos! Nunca vou esquecer das nossas reuniões científicas com terapia.

Aos meus irmãos, por acreditarem em mim e sempre me apoiarem!

Aos meus avós, por terem incentivado meu senso crítico e minha imaginação durante toda minha infância.

À minhas amigas e amigos, que sempre digo que são os melhores desse mundo! Obrigada por me enxergarem muitas vezes melhor do que eu mesma!

Ao meu amor, companheiro e namorado, que viveu isso tudo junto comigo e que topou embarcar em mais uma aventura comigo! Obrigada por essa relação incrível que deixa tudo melhor! Amo como incentivamos e apoiamos um ao outro! Tem sido lindo viver tudo isso com você!

“... Portanto, ser corajoso significa viver com o coração...O caminho do coração é o caminho da coragem. É viver na insegurança, é viver no amor e confiar, é enfrentar o desconhecido. É deixar o passado para trás e deixar o futuro ser. Coragem é seguir trilhas perigosas. A vida é perigosa. E só os covardes podem evitar o perigo – mas aí já estão mortos. A pessoa que está viva, realmente viva, sempre enfrentará o desconhecido...”

Osho

RESUMO

Aedes aegypti é o principal vetor transmissor das arboviroses dengue, chikungunya, Zika e febre amarela urbana. Vacina eficaz e segura existe apenas para febre amarela. Além disso, não existe tratamento específico para essas doenças, o que torna o controle vetorial a principal forma de prevenção. No entanto, a ampla utilização de inseticidas químicos levou ao surgimento de populações de mosquitos resistentes, além desses estarem associados à toxicidade ao meio ambiente e a organismos não-alvo. Visando encontrar novas estratégias para o controle do mosquito *Ae. aegypti*, esta pesquisa iniciou-se com o estudo de *Annona crassiflora* e *Xylopiya aromatica*. Para os extratos de *A. crassiflora* foram utilizadas técnicas quimiométricas para diferenciar quimicamente as amostras ativas e inativas em larvas de *Ae. aegypti*, que juntamente com a desreplicação pela base de dados GNPS identificou a classe dos compostos ativos. Esse resultado foi confirmado por isolamento clássico ao qual foram obtidas acetogeninas ativas em mistura. Para o extrato hexânico das folhas de *X. aromatica* foi utilizado o isolamento clássico, que resultou na obtenção dos compostos terpênicos, ácido isoozico e espatulenol. O ácido isoozico foi larvicida, facilmente isolado em alto rendimento, porém tóxico em embriões de peixe-zebra, mas considerando sua estrutura química torna-se favorável a realização de reações de semissíntese para obtenção de amidas. Estudo computacional de triagem virtual por *docking* molecular avaliou a afinidade de amidas sobre quatro enzimas. Primeiramente, foi realizada triagem sobre a glutationa S-transferase, tendo em vista a importância dessa família de enzimas na desintoxicação e consequentemente na resistência metabólica. As amidas que apresentaram baixa afinidade sobre esta enzima, foram submetidas a triagem em três alvos moleculares, resultando em duas amidas potenciais, que apresentaram interações de hidrogênio com os sítios alvos das enzimas de interesse. Por fim, foi realizado estudo de síntese de composto bisnitrílico, utilizado principalmente como intermediário para obtenção de pirimidinas, que são conhecidas por apresentarem ampla atividade biológica. Foi estabelecido o controle da reação e observada atividade larvicida inédita para esse composto.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; atividade larvicida; Annonaceae; técnicas quimiométricas e desreplicação; *docking* molecular; síntese

ABSTRACT

Aedes aegypti is the main vector of dengue, Zika, chikungunya and urban yellow fever arboviruses. An effective and safe vaccine exists only for yellow fever. In addition, there are no specific treatments for these diseases, which makes vector control the main strategy for preventing them. However, the widespread use of chemical insecticides has led to the emergence of resistant mosquito populations, in addition to environmental and non-target organisms toxicity. Aiming to find new strategies for the control of the *Ae. aegypti*, this research began with the study of *Annona crassiflora* and *Xylopia aromatica*. For *A. crassiflora* extracts, chemometric techniques were used to chemically differentiate active and inactive samples against *Ae. aegypti* larvae. Dereplication of active compounds was carried out using the GNPS database. This result was confirmed by classical isolation, using chromatographic tools, in which active acetogenins were obtained in mixture. The hexane extract of *X. aromatica* leaves was also submitted to chromatographic strategies, which resulted in the obtainment of terpenic compounds, isoozic acid and spathulenol. Isoozic acid was easily isolated from the extract in high yields. It presented larvicidal activity against *Ae. aegypti*, but was toxic to zebrafish embryos (a model that predicts toxicity against non-target organisms). Considering isoozic acid chemical structure, an alternative for obtaining other active amide compounds would be through semisynthesis. In a second part of this project, a computational study of virtual screening by molecular docking evaluated the affinity of amides on four enzymes. First, a screening was performed on glutathione S-transferase, considering the importance of this family of enzymes for insect detoxification and, consequently, in metabolic resistance. The amides that showed low affinity on glutathione S-transferase were screened in three molecular targets, resulting in two potential amides, which showed hydrogen interactions with the target sites of the enzymes of interest. Finally, a study was carried out on the synthesis of bisnitrilic compounds, mainly used as an intermediate to obtain pyrimidines, which are known to have broad biological activity. Control of the reaction was established and unprecedented larvicidal activity was observed for this compound.

Keywords: *Aedes aegypti*; larvicidal activity; Annonaceae; chemometric techniques and dereplication; molecular docking; synthesis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida <i>Aedes aegypti</i> . Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.....	31
Figura 2 - Fluxograma das etapas do fracionamento bioguiado de <i>A. crassiflora</i> utilizando modelo clássico	48
Figura 3 - Fluxograma das etapas do fracionamento bioguiado de <i>X. aromatica</i> utilizando modelo clássico.....	50
Figura 4 - Sala de manutenção da colônia Rockefeller de <i>Ae. aegypti</i> . Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.....	54
Figura 5 - Placas de doze poços contendo larvas L3 de <i>Ae. aegypti</i> , antes da aplicação das amostras. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.....	55
Figura 6 - Cromatogramas de pico de base (BPC) e cromatogramas gerados por DAD (detector por arranjo de diodo), das frações obtidas da partição em SPE-Diol. Verde: inativas; vermelho: ativas. MeOH: metanol; EtOAc: acetato de etila. BPC: observada diferenças entre as amostras ativas e inativas no tempo de retenção de ~ 30 min; DAD: similaridade entre as amostras ativas e inativas (tempo de retenção 20-30 min). Adaptado de Demarque et al., 2020	59
Figura 7 - Gráficos das análises não supervisionadas. A: HCA; B: PCA. Fonte: Demarque et al., 2020	60
Figura 8 - A : sPLS: análise multivariada supervisionada que maximiza a separação entre as amostras. Em vermelho estão as frações ativas e em verde, as inativas. B : VIP SCORE: apresenta os íons importantes para separação dos grupos. Fonte: Demarque et al., 2020.....	61

Figura 9 - Os dois clusters gerados a partir de análise na base de dados dos perfis de fragmentação dos principais compostos ativos. Fonte: Demarque et al., 2020	62
Figura 10 - Cromatograma (212 nm) das acetogeninas em mistura. Adaptado de Demarque et al., 2020.....	63
Figura 11 - Exemplo da estrutura química de uma acetogenina. R=H, subtipo 1a annonacina; R=OH, subtipo 1b esquamocina. Fonte: Demarque et al., 2020.....	64
Figura 12 - Atividade larvicida em <i>Ae. aegypti</i> das frações obtidas na coluna de Sephadex® LH-20 testadas a 125 µg/ mL. Fonte: Grossi SM, 2018.....	68
Figura 13 - Atividade larvicida em <i>Ae. aegypti</i> das frações obtidas na coluna de sílica testadas a 125 µg/mL e o rendimento de cada uma delas. Fonte: Grossi SM, 2018.....	69
Figura 14 - Cromatograma da fração B3.2 obtido em HPLC analítico. Fonte: Grossi SM, 2018	69
Figura 15 - Espectro de massas obtido a partir da infusão direta da fração B3.2. Fonte: Grossi SM, 2018.....	70
Figura 16 - Fórmula molecular composto 1, ácido entlabda-8(17),13(16),14-trien-18-óico (C ₂₀ H ₃₀ O ₂).....	71
Figura 17 - Fórmula molecular composto 2, espatulenol (C ₁₅ H ₂₄ O).....	73
Figura 18 - Curva dose-resposta. A : valores do extrato bruto hexânico das folhas de <i>X. aromatica</i> . B : valores do composto 1. Fonte: Fonte: Grossi SM, 2018.....	75
Figura 19 - Esquema reacional proposto para realização de uma semissíntese a partir do composto 1. Método de semissíntese adaptado de Demarque e Merten, 2017	77

Figura 20 - Sítio de ligação da AaGST do tipo épsilon 2 (AaGSTe2) (Resíduos: PRO56, VAL55, HIS53, SER58, GLU67, PHE108 e ARG112). (Imagem gerada utilizando o software Molegro Virtual Docking) (ID PDB: 5FT3)	85
Figura 21 - Sítio de ligação da AaAChE1 (Resíduos: TYR337, PHE338, TYR341, TRP 86, TYR124, TRP286 e "CYS295"). Imagem gerada utilizando o software Molegro Virtual Docking (ID PDB: 5FUM)	91
Figura 22 - Sítio de ligação da AaFKBP12 (Resíduos: ARG53, ILE57, VAL56, TRP60, TYR27, ASP38, TYR83, GLY84, SER85, ARG86, PRO94). Imagem gerada utilizando o software Molegro Virtual Docking (ID PDB: 3UQI)	92
Figura 23 - Sítio de ligação da AamJHBP (Resíduos: TRP53, VAL51, PHE269, TYR33, TYR64 e TYR129). Imagem gerada utilizando o software Molegro Virtual Docking (ID PDB: 5V13)	93
Figura 24 - Clusters das amidas 1-13 com enzimas AaAChE1 (vermelho), AaFKBP12 (azul) e AamJHBP (verde). Imagem gerada utilizando o software Molegro Virtual Docking.....	94
Figura 25 - Interações de hidrogênio entre 11 e 8 e AaAChE1 (A-B), AaFKBP12 (C-D) e AamJHBP (E-F)	97
Figura 26 - Síntese do composto bisnitrílico. A : reagentes solubilizados em metanol, piperidina adicionada e meio reacional mantido sob agitação magnética constante e temperatura ambiente. B : meio reacional filtrado sob pressão reduzida. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB	102
Figura 27 - Esquema reacional para obtenção de bisnitrila (3) a partir da reação do aldeído <i>Trans-p</i> -Metoxicinamaldeído (1) com Malononitrila (2) em meio básico.....	105
Figura 28 - Análise em UPLC-MS/MS, cromatograma (254nm) e espectrômetro de massas com m/z 211,0853 [M+H] ⁺	107

Figura 29- Estrutura do composto sintetizado 2-(p-metoxiphenilalilidene)malononitrila	107
Figura 30- Atividade larvicida do composto sintetizado e dos reagentes utilizados, testados a 25 µg/mL.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades atribuídas aos extratos de Annonaceae presentes no Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado- Laboratório de Farmacognosia-UnB.....	41
Tabela 2 - Extratos de <i>Annona crassiflora</i> utilizados no estudo	45
Tabela 3 - Extratos de <i>A. crassiflora</i> particionados, sistema eluente utilizado e rendimento de cada pré fração obtida.....	58
Tabela 4 - Frações ao fim do fracionamento do extrato de <i>A. crassiflora</i> , acetogeninas identificadas pelas análises de RMN e valores de LC ₅₀ de cada fração.....	64
Tabela 5 - Extratos de <i>X. aromatica</i> pertencentes ao Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado e seus valores de mortalidade em 24 horas em larvas L3 de <i>Ae. aegypti</i> (testados a 250 µg/ mL).....	66
Tabela 6 - Mortalidade e rendimento de cada pré-fração obtida no fracionamento do extrato hexânico de <i>X. aromatica</i>	67
Tabela 7 - Dados de RMN ¹³ C do composto 1 isolado (B3.2) comparado com dados da literatura.....	71
Tabela 8 - Dados de RMN ¹³ C do composto 2 isolado, comparado com dados da literatura.....	73
Tabela 9 - Atividade larvicida dos compostos 1 e 2 testados a 25 µg/mL, em larvas de <i>Ae. aegypti</i>	74
Tabela 10 - Valores de LC ₅₀ (µg/mL) do extrato bruto hexânico da folha de <i>X. aromatica</i> e do composto 1	75
Tabela 11 - Ordem das amidas que apresentaram a maior média consenso para AaGSTE2.....	86

Tabela 12 - Ordem dos compostos que apresentaram melhor média de consenso para cada enzima.....	94
Tabela 13 - Energias de ligação das amidas 11 e 8 , ligantes co-cristalizados, inseticidas: malation, temefós, DEET e transflutrina com cada uma das enzimas.....	95
Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto sintetizado (CD_3OD ; ^1H 600 MHz; ^{13}C 150 MHz).....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AaAChE1	Glutaciona-s-transferase Epsilon 2 de <i>Ae. aegypti</i>
AaFKBP12	Isomerase FKBP12 de <i>Ae. aegypti</i>
AaGSTE2	Glutaciona-s-transferase Epsilon 2 de <i>Ae. aegypti</i>
AchE	Acetilcolinesterase
AINEs	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
AmJHBP	Proteína de ligação odorante de <i>Ae. aegypti</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis israelenses</i>
BPC	<i>Base Peak Chromatogram</i>
CAIQ	Central Analítica do Instituto de Química da UnB
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCI ₃	Clorofórmio- <i>d</i> deuterado
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
CI50	Concentração Inibitória Média
DAD	<i>Diode array detector</i>
DEET	N,N-Dimetil-meta-toluamida
DDT	Diclorodifeniltricoloetano
DENV	<i>Dengue virus</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
FET	<i>Fish Embryo Toxicity</i>
GNPS	<i>The Global Natural Product Social Molecular Networking</i>
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>

HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High-resolution mass spectrometry</i>
LC	Liquid Chromatography
LC ₅₀	<i>Lethal Concentration 50%</i>
MeOH	Metanol
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MVD	<i>Molegro Virtual Docker</i>
NADH	<i>Ubiquinone Oxidoreductase</i>
OBP	Proteína de ligação odorante
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
sPLS	<i>Partial Least Squares Projection to Latent Structures</i>
TR	Tempo de Retenção
THF	Tetrahidrofurano
UPLC	<i>Ultra High Pressure Liquid Chromatography</i>

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO GERAL	22
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1. DENGUE	24
2.2. ZIKA	25
2.3. CHIKUNGUNYA	27
2.4. FEBRE AMARELA	28
2.5. COVID- 19	29
2.6. <i>Aedes aegypti</i>	30
2.7. CONTROLE DO VETOR E RESISTÊNCIA	32
3- CAPÍTULO 1 – ATIVIDADE LARVICIDA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS DO CERRADO.....	36
3.1 INTRODUÇÃO.....	36
3.2 OBJETIVO GERAL.....	44
3.2.1 Objetivos Específicos.....	44
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.3.1 <i>Annona crassiflora</i> Mart.- análises quimiométricas.....	45
3.3.1.1. Partição dos Extratos em Fase Sólida.....	45
3.3.1.2. Análises Quimiométricas.....	46
3.3.1.3. Fracionamento Bioguiado.....	47
3.3.2. <i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart.- uso de métodos clássicos para isolamento.....	49
3.3.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>HPLC</i>)	51
3.3.2.2 Peso Molecular e Elucidação Estrutural.....	51
3.3.2.3 Avaliação da Toxicidade em Peixe-zebra (<i>zebrafish</i>)	52

3.3.3. Testes Biológicos <i>Aedes aegypti</i>.....	53
3.3.3.1. Manutenção da Colônia de <i>Ae. aegypti</i>	53
3.3.3.2. Teste larvicida.....	54
3.3.3.2.1. Determinação de LC_{50} em larvas de <i>Ae. aegypti</i>	56
3.3.3.3 Avaliação da Atividade Pupicida.....	57
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.4.1 <i>Annona crassiflora</i> Mart.- análises quimiométricas.....	57
3.4.2 <i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart.- uso de métodos clássicos para isolamento.....	66
3.5 CONCLUSÃO.....	78
3.5.1 <i>Annona crassiflora</i> Mart.- análises quimiométricas.....	78
3.5.2 <i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart.- uso de métodos clássicos para isolamento.....	79
4 - CAPÍTULO 2 – DOCKING MOLECULAR NO ESTUDO DE AMIDAS COM POTENCIAL ATIVIDADE EM <i>Ae. aegypti</i>	80
4.1 INTRODUÇÃO.....	80
4.2 OBJETIVO GERAL.....	81
4.2.1 Objetivos específicos	82
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	82
4.3.1 Preparação das amidas.....	82
4.3.2 Preparação dos compostos padrão.....	83
4.3.2.1 Preparação da macromolécula.....	83
4.3.3 Triagem virtual e <i>docking</i> molecular.....	83
4.3.3.1 Análise consenso.....	84
4.3.3.2 Ilustrações.....	84
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
4.5 CONCLUSÃO.....	99

5 - CAPÍTULO 3 – SÍNTESE DE COMPOSTO BISNITRÍLICO COM ATIVIDADE LARVICIDA EM <i>Ae. aegypti</i>	100
5.1	
INTRODUÇÃO.....	100
5.2 OBJETIVO GERAL.....	101
5.2.1 Objetivos específicos	101
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	101
5.3.1 Síntese do composto bisnitrílico	101
5.3.1.1 Síntese escalonada do composto bisnitrílico.....	102
5.3.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massa (UPLC- MS/MS)	103
5.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	103
5.3.4 Testes biológicos em <i>Ae. aegypti</i>	104
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
5.5 CONCLUSÃO	109
6- CONCLUSÃO GERAL	109
7 - REFERÊNCIAS	111
APÊNDICE - A- ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL ACETOGENINAS	127
APÊNDICE - B- ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL ÁCIDO ISOZICO	150
APÊNDICE - C - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL BISNITRILA	151

1 INTRODUÇÃO GERAL

Aedes aegypti é um artrópode hematófago originário da África Subsaariana que devido à globalização e às atividades humanas foi introduzido e domesticado em áreas tropicais e subtropicais (1–3). É o principal vetor das arboviroses, dengue, chikungunya, Zika e febre amarela urbana (4,5). Doenças transmitidas por vetores contribuem com 17% dos casos de doenças infecciosas no mundo (6).

A dengue se destaca por ser a infecção viral mais prevalente, apenas em 2019, foram registrados mais de 2,7 milhões de casos nas Américas (7). A problemática envolvendo o Zika vírus está relacionada a manifestações severas como a microcefalia e a Síndrome de Guillain-Barré, enquanto para a chikungunya, a preocupação se deve devido ao aumento de doenças articulares crônicas (8,9).

A incidência e reincidência dessas doenças em áreas endêmicas geram prejuízos tanto na saúde quanto na economia mundial (10). A febre amarela pode ser prevenida por vacina, disponível desde da década 1930 (11). Considerando as arboviroses, dengue, chikungunya e Zika, apenas para dengue há vacina disponível, porém, sua eficácia é questionada, visto que em populações soronegativas, isto é, que nunca tiveram contato com nenhum dos sorotipos de dengue, foram relatados efeitos adversos graves característicos de dengue grave, quando expostos a uma primeira infecção após a vacinação (12,13). O tratamento para essas infecções baseia-se apenas no alívio dos sintomas, ou seja, não há tratamento específico. Portanto, o controle do vetor e, conseqüentemente, a interrupção do contato deste com os humanos, é a principal forma de prevenção (13,14).

A organização mundial da saúde (OMS) classifica o controle vetorial em três métodos, conhecidos como: controle biológico, controle químico e gestão ambiental (15). A gestão ambiental ou controle físico/mecânico, é dividido em: modificação ambiental, manipulação ambiental e mudanças de hábitos e comportamentos humanos. As medidas adotadas por esse método de controle envolvem desde eliminação de criadouros à

conscientização social (16). O controle biológico consiste na utilização de patógenos ou predadores que podem atacar, parasitar e competir com *Ae. aegypti*, como as bactérias *Wolbachia* e *Bacillus thuringiensis israelenses* (Bti) (17,18). Já o controle químico baseia-se na utilização de inseticidas contra as formas imaturas e a forma adulta do mosquito (19).

Os inseticidas químicos, como organofosforados, piretróides e carbamatos, são amplamente utilizados, principalmente em áreas endêmicas. Porém, a exposição prolongada a essas substâncias resultou no desenvolvimento de cepas resistentes, impossibilitando um controle de vetor efetivo (14,20).

Organofosforados e carbamatos atuam no sistema nervoso central inibindo a acetilcolinesterase (AChE), já os piretróides atuam nos canais de sódio do sistema nervoso central e periférico (20). O mecanismo de resistência em *Ae. aegypti* está fortemente relacionado ao reconhecimento desses inseticidas por enzimas de desintoxicação e alterações no sítio alvo (21). Além disso, esses compostos causam danos ao meio ambiente e a organismos não alvo (22). Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de novos produtos com mecanismos de ação diferentes e/ou múltiplos e ambientalmente seguros.

Pesquisas são desenvolvidas visando a utilização de compostos naturais, advindos do metabolismo secundário de plantas, como novas estratégias de controle do vetor (23,24). Esses compostos são produzidos em resposta a alterações ambientais, relações de competição e ataque de patógenos. São conhecidos como metabólitos secundários ou especializados e apresentam múltiplos mecanismos de ação retardando possíveis mecanismos de resistência (25,26). O desenvolvimento de novos compostos sintéticos, baseados em estruturas de compostos naturais ou não, também representa uma importante estratégia para obtenção de produtos em larga escala e economicamente viáveis (27,28).

Esta dissertação está inserida no âmbito do Projeto ArboControl (financiado pelo Ministério da Saúde para o controle do vetor das arbovirose - o mosquito *Aedes aegypti*)

com parcerias nacionais e internacionais. Portanto, visando o controle do vetor, foram realizados estudos utilizando diferentes linhas de pesquisa, no entanto com o mesmo objetivo, encontrar compostos ativos em larvas de *Ae. aegypti*. No capítulo 1 são abordados os trabalhos envolvendo isolamento e identificação de metabólitos secundários de plantas do bioma Cerrado, no capítulo 2 a utilização de *docking* molecular e no capítulo 3 o desenvolvimento de compostos sintéticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DENGUE

Dengue é uma arbovirose transmitida para os seres humanos por meio do repasto sanguíneo de fêmeas do gênero *Aedes*, principalmente *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, infectadas. Caracteriza-se por ser uma infecção viral causada por 4 sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Indivíduos infectados podem apresentar quadros clínicos assintomáticos, leves e graves (13,29).

Mesmo com vários casos notificados anualmente, a dengue ainda é considerada uma doença subnotificada, devido a casos assintomáticos e leves que não necessitam de assistência médica ou por diagnósticos equivocados. Ainda assim, a incidência de dengue tem crescido bastante nos últimos anos, gerando impactos significativos na saúde e economia mundial. Até 1970 epidemias de dengue tinham ocorrido em apenas 9 países, atualmente é uma doença endêmica em mais de 100 países, com aumento de casos em novas áreas como no continente Europeu (30). Essa expansão em novas áreas pode estar relacionada a mudanças climáticas, já que as características climáticas são indispensáveis para a sobrevivência do vetor (31).

Conforme a gravidade dos sintomas apresentados, a doença é classificada em dois tipos. Dengue: indivíduos assintomáticos ou com sintomas leves, como febre, dor de cabeça, náusea, dores musculares, urticárias e dor atrás dos olhos. Dengue severa, também conhecida como febre hemorrágica da dengue/síndrome de choque da dengue: indivíduos que além de apresentarem os sintomas supracitados, apresentam sintomas mais fortes como, extravasamento do plasma com ou sem sangramentos, queda de pressão, dificuldade respiratória e comprometimento de órgãos. A presença de dengue severa está associada a infecções secundárias, podendo também ocorrer em infecções primárias de crianças cuja a mãe já foi infectada por algum sorotipo. Isso ocorre, devido a uma resposta imunológica conhecida como “Pecado antigênico original”. Uma vez infectado por um sorotipo, o indivíduo adquire imunidade total a este e parcial e temporária aos demais. Em uma infecção secundária, os anticorpos adquiridos da primeira infecção reconhecem o patógeno, porém a infecção não é prevenida, pois a resposta imunológica está voltada a um sorotipo diferente, assim além da infecção pelo vírus da dengue, há grande produção de citocinas inflamatórias, resultando em um processo autoimune danoso (29,32,33).

Não existem medicamentos específicos para o tratamento ou prevenção dessas infecções causadas pelos diferentes sorotipos da dengue (32). Apesar de uma vacina para dengue já ter sido aprovada em alguns países, sua eficácia é questionada, tendo em vista que, em indivíduos soropositivos, isto é, aqueles que já foram infectados por algum sorotipo, uma terceira infecção resultaria em sintomas mais leves. Porém em indivíduos soronegativos, uma infecção posterior a vacinação aumentaria o risco de dengue severa (12,34).

Portanto a prevenção e a redução do número de casos depende fortemente do controle vetorial (13).

2.2 ZIKA

Zika é uma arbovirose identificada pela primeira vez em 1947 em macacos na floresta Zika de Uganda. Já em 1948, o vírus foi detectado em mosquitos do gênero *Aedes*, porém apenas em 1952 foi registrada a primeira infecção em humanos. Em 2007, foi reportado o primeiro grande surto de Zika vírus nas ilhas Yap, um arquipélago dos Estados Federados da Micronésia. Entre 2013 e 2014 foram reportados surtos na Polinésia Francesa e em outras ilhas do Pacífico. Em 2015, o vírus chegou às Américas, ao nordeste do Brasil, onde foram notificados casos leves de erupção cutânea e até então ainda não associados ao Zika vírus. Neste mesmo ano, foi descoberta e identificada a associação da infecção de Zika com a síndrome Guillain-Barré e o desenvolvimento de microcefalia (35–37).

A primeira via de infecção consiste no repasto sanguíneo de fêmeas, principalmente da espécie *Ae. aegypti*, infectadas. Porém, possui ainda outras vias de transmissão, como contato sexual, transfusão sanguínea e transmissão vertical de mães infectadas (38,39).

A grande maioria dos indivíduos são assintomáticos ou apresentam sintomas leves, como febre, conjuntivite, erupção cutânea, mal-estar, dor de cabeça e dores musculares. Portanto, a problemática da infecção pelo Zika vírus está relacionada a complicações na gravidez e a sequelas neurais, microcefalia em neonatais e síndrome de Guillain-Barré em adultos (37,39).

A síndrome de Guillain-Barré é uma doença autoimune potencialmente fatal desencadeada por infecções, como no caso do Zika vírus. Nessa condição, o sistema imune ataca o sistema nervoso periférico, podendo levar à perda de sensibilidade nas pernas e/ou braços. E em casos mais sérios pode resultar em paralisia quase total. O tratamento inclui imunoterapia e monitoramento (40).

Atualmente, cerca de 18 vacinas estão em fase de desenvolvimento. Entretanto, a última epidemia ocorreu em 2016, e até então não foram reportados um número significativo de casos, o que torna a realização de ensaios de eficácia um desafio no

desenvolvimento dessas vacinas. Além disso, a diminuição da incidência também interfere no investimento em pesquisa dessas vacinas, principalmente no setor privado. E muito provavelmente será necessário mais de um tipo de vacina para abranger todo tipo de população de risco (41,42). Adicionalmente, assim como para dengue não há tratamento específico disponível. Logo, controle vetorial permanece sendo a principal forma de prevenção (38).

2.3 CHIKUNGUNYA

Chikungunya é uma arbovirose causada pelo vírus da chikungunya (CHIKV) que foi descrito pela primeira vez em 1952 durante um surto na Tazânia. Na língua nativa, Kimakonde, essa palavra significa “contorcer-se” devido à postura curvada dos indivíduos infectados, que apresentavam fortes dores nas articulações, polialtralgia (43).

Em 1953 esse vírus foi isolado de mosquitos da espécie *Ae. aegypti* (44). Os sintomas aparecem entre 4-7 dias após o repasto sanguíneo de fêmeas infectadas (via de transmissão). São caracterizados por uma febre alta de início rápido e poliartralgia, atingindo principalmente as articulações dos pés, mãos, dedos, cotovelos, tornozelos e pulsos. Essas dores intensas nas articulações podem ser bastante debilitantes podendo evoluir para um estágio crônico com duração de meses e até anos. Além disso, esses dois sintomas característicos são importantes na diferenciação entre chikungunya e dengue, considerando a coexistência dessas infecções em áreas endêmicas como nas Américas. Os indivíduos podem evoluir para uma condição crônica da doença bastante delimitante (45–48). Outros sintomas incluem dores musculares, dor de cabeça, erupções cutâneas, fadiga e náuseas (43). Apesar de não ser uma doença considerada potencialmente fatal, óbitos raros são registrados em indivíduos idosos, neonatais, diabéticos e com distúrbios cardiovasculares (49).

Entre 1960-1990, pequenos surtos foram relatados na África. Em 2004, foi registrada uma grande epidemia no Quênia, que contribuiu para a ampla distribuição de casos na Índia, Sudeste asiático e China. Desde essa época, o vírus se espalhou rapidamente sendo identificado na Ásia, África, Europa e nas Américas, com transmissão local já reportada na Europa e nas Américas e grandes surtos registrados no Brasil (45,46).

Assim como para dengue e Zika, não há tratamento antiviral específico. Os fármacos utilizados são para o manejo e alívio dos sintomas (45). Para a dor e a inflamação das articulações são utilizados anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), após o descarte da possibilidade de dengue. Outras alternativas terapêuticas incluem a utilização de drogas antivirais e anticorpos neutralizantes, porém o alto custo de fabricação e os potenciais riscos de hipersensibilidade, imunossupressão e infecções limitam sua utilização. (49). Uma vacina potencial demonstrou ser segura, porém até o presente momento foram realizados apenas estudos de fase 2 e ainda são necessários estudos que comprovem sua eficácia e segurança a longo prazo (50). Assim, o controle vetorial representa a principal forma de prevenção ao vírus da chikungunya (45).

2.4 FEBRE AMARELA

A febre amarela é uma doença endêmica na África e na América do Sul. A transmissão da febre amarela urbana ocorre principalmente por meio do vetor *Ae. aegypti*. O ciclo zoonótico de transmissão desse vírus envolve mosquitos silvestres do gênero *Haemagogus* e *Aedes* (*Stegomyia*) e primatas. Humanos infectados pela picada desses mosquitos levam o vírus para áreas urbanas e servem de hospedeiros, resultando na transmissão de febre amarela pelo vetor urbano *Ae. aegypti*. O vírus também é transmitido de forma vertical de mosquitos fêmeas infectados e seus ovos (11,51).

A febre amarela é caracterizada por ser uma doença hemorrágica. Os sintomas podem ser divididos em duas fases. A primeira fase correspondente a fase aguda, onde os sintomas incluem: dor muscular, febre, dor de cabeça, náuseas, vômitos, calafrios e perda de apetite. Uma pequena porcentagem de indivíduos podem progredir para a segunda fase com sintomas mais fortes como febre alta, icterícia (responsável pelo nome da doença), dor abdominal, vômitos e sangramentos (51,52).

Assim como para as outras arboviroses supracitadas (dengue, Zika e chikungunya), também não há tratamento antiviral específico para febre amarela, no entanto, diferentemente das demais, para esta arbovirose há vacina eficaz, segura e acessível (53), correspondendo a principal forma de prevenção. No entanto, não é indicada para indivíduos imunocomprometidos, que tenham alergia a ovo e derivados e em idosos maiores de 60 anos deve ser realizada avaliação individual para determinar a necessidade de vacinação (54).

A vacinação para febre amarela está disponível desde a década de 1930, no entanto, ainda no século 21 são observados surtos de febre amarela, como os surtos correlacionados em Luanda e Kinshasa em 2016, que levaram a presença do vírus em regiões como a China, demonstrando o risco mundial causado por essa arbovirose e a necessidade da vacinação mundial (53). No Brasil foi observado aumento de casos entre os anos de 2016 e 2018, além disso foram notificados casos fora da época sazonal de transmissão o que representa risco de contaminação em todas as épocas do ano (54).

A grande problemática envolvendo a presença de surtos de febre amarela nos últimos anos, está relacionada ao aumento do movimento antivacina, o que favorece a transmissão de casos e riscos de óbitos (55,56). Portanto, o controle vetorial também é importante no controle da febre amarela.

2.5 COVID- 19

Em 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou a doença causada pelo coronavírus (COVID-19) como uma emergência de saúde pública de importância internacional, e no mesmo ano foi declarada pandemia mundial (57).

No Brasil, além do grande número de casos e óbitos por COVID-19, foi observado aumento da incidência de casos das arboviroses dengue, chikungunya e Zika no primeiro semestre de 2020 (58). A semelhança dos sintomas entre essas arboviroses e a COVID-19 pode levar a erros de diagnóstico, como observado em resultados falsos positivos no teste rápido para dengue (57). Ou seja, ainda que seja observado aumento de casos de arboviroses, essas infecções são subnotificadas, tendo em vista, o aumento de ações de saúde voltadas ao combate da pandemia COVID-19 (59).

A incidência concomitante dessas infecções pode levar sobrecarga ao sistema de saúde, com aumento da necessidade de leitos de UTI. Sendo assim, medidas tornam-se extremamente necessárias para o controle do vetor *Ae. aegypti* e diminuição dos casos de óbitos (58,60).

2.6 *Aedes aegypti*

Aedes aegypti, também conhecido como o mosquito da dengue é o principal vetor de importantes arboviroses (10). É um mosquito com hábitos domésticos, originário da África subsaariana, que tem como ancestral a forma selvagem - *Ae. aegypti formosus* (1). Está presente, principalmente, em áreas urbanas tropicais e subtropicais devido às condições ambientais (temperatura e umidade) e à alta densidade populacional, características necessárias e favoráveis ao seu desenvolvimento (1,61,62).

A disponibilidade de água é fundamental para seu desenvolvimento, porém sua qualidade não interfere na viabilidade desse vetor. Portanto, existe uma ampla variedade de criadouros e alta incidência de arboviroses em regiões com condições sanitárias precárias (62,63).

O desenvolvimento do *Ae. aegypti* é caracterizado por metamorfose completa com quatro fases de vida: ovo, larva, pupa e adulto (figura 1). Em condições ambientais favoráveis, em 10 dias há formação do mosquito adulto, portanto a eliminação de criadouros deve ser realizada semanalmente para garantir um controle vetorial efetivo (64,65).

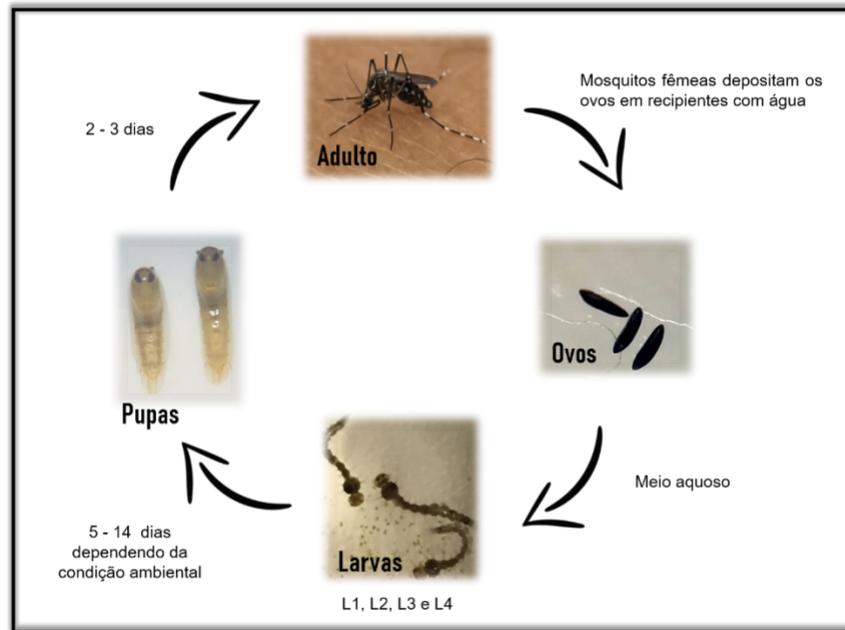


Figura 1 - Ciclo de vida *Aedes aegypti*. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.

Os ovos são brancos, mas em contato com oxigênio tornam-se escuros. São pequenos e resistentes a longos períodos de dessecação, o que possibilita a dispersão passiva desse mosquito a longas distâncias e representam um desafio no controle vetorial (64,65).

A fase larval é caracterizada por ser a fase de crescimento e alimentação. As larvas consomem materiais orgânicos advindos das paredes e fundo dos criadouros. É considerada a fase mais vulnerável, uma vez que sua duração depende da disponibilidade de alimentação, condições ambientais favoráveis e da densidade de larvas. Além disso, as larvas são sensíveis a movimentos bruscos e à luz. Essas

características tornam as larvas um alvo importante no desenvolvimento de medidas de controle. Anatomicamente são compostas de cabeça, tórax e abdômen. A parte posterior e anal do abdômen é composta por um sifão, responsável pela respiração, e estruturas de controle osmótico (64).

Existem quatro estágios larvais: L1, L2, L3 e L4. O último estágio imaturo é a pupa, uma fase de curta duração (2-3 dias) onde não há alimentação e ocorre a metamorfose completa. É formada por cefalotórax e abdômen, conferindo um formato curvo como uma vírgula. Em seu cefalotórax, possui um par de trombetas respiratórias, que, assim como o sifão das larvas, ultrapassa a superfície da água para realizar a respiração. Possui genitálias interna e externa completamente formadas, sendo assim, nessa fase há diferenciação entre macho e fêmea (64,66). Em condições adequadas o tempo entre a eclosão e pupação não excede 5 dias (64).

Nos primeiros dias da fase adulta já ocorre o acasalamento e posteriormente o repasto sanguíneo para desenvolvimento e maturação dos ovos produzidos, que, após um intervalo de 3 dias, são dispostos na parede de criadouros, próximos à superfície da água. Machos e fêmeas se alimentam de fluidos açucarados (64,65). Os mosquitos adultos vivem normalmente entre 30-35 dias. Durante esse período uma fêmea é capaz de gerar 1500 ovos. Além disso, uma fêmea necessita de apenas uma cópula para a produção de todos os ovos de sua vida, já que armazena o esperma na espermateca e a postura não é realizada de uma só vez. Adicionalmente, a transmissão dos vírus pode ocorrer de forma transversal (64,65).

Entre os anos de 1958 e 1973 esse vetor foi considerado erradicado no Brasil, no entanto, devido a falhas na vigilância epidemiológica, crescimento populacional e mudanças ambientais foi reintroduzido no país em 1976 e desde então encontra-se distribuído em todo território (67,68).

2.7 CONTROLE DO VETOR E RESISTÊNCIA

O controle de arboviroses está fortemente ligado ao controle vetorial, uma vez que não existem vacinas nem tratamentos específicos para essas doenças (dengue, Zika e chikungunya) (21). Segundo a organização mundial da saúde (OMS), o controle vetorial deve ser integrado, isto é, utilizar diversas técnicas/estratégias separadas ou reunidas para reduzir ou interromper a transmissão dessas doenças (69). Essas estratégias incluem programas de educação em saúde, gestão ambiental, utilização de inseticidas químicos, eliminação de criadouros, entre outros (21,69).

O controle químico, que consiste na utilização de inseticidas químicos para o combate do vetor nos diferentes estágios de desenvolvimento e a participação da comunidade são os métodos mais utilizados hoje em dia (14,19).

Antes do desenvolvimento de inseticidas químicos eram utilizados produtos naturais para o controle de mosquitos e outros insetos domésticos. Porém com a descoberta do diclorodifeniltricloroetano (DDT) e o desenvolvimento de novas classes de inseticidas químicos, as pesquisas envolvendo produtos naturais perderam destaque (70,71).

O DDT é um inseticida da classe dos organoclorados que possui efeito prolongado e foi desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial. Seu mecanismo de ação não é claro, mas acredita-se que atua em canais de sódio interferindo assim no equilíbrio iônico e conseqüentemente impedindo a propagação do impulso nervoso. Seu uso foi descontinuado em diversos países devido a sua característica lipofílica que permite sua acumulação no tecido adiposo de mamíferos e lenta metabolização. Além disso, é considerado um promotor de tumores. Em alguns países ainda é utilizado para controle de vetor, devido à escassez de recursos financeiros para sua substituição, porém proibidos para uso agrícola (20,72). No Brasil o DDT é proibido para qualquer uso desde 2009 (73).

Sendo assim, foram produzidos os organofosforados para substituição do DDT. São compostos biodegradáveis e instáveis, devendo ser reaplicados periodicamente.

Atuam inibindo irreversivelmente a acetilcolinesterase (AChE), o que impede a interrupção do impulso nervoso. O larvicida temefós e o aduicida malation são exemplos de organofosforados. (20,70).

A ampla utilização do temefós levou a seleção de mosquitos resistentes, tornando seu uso muitas vezes ineficaz (70,74,75). No Brasil, a presença de resistência em vários estados levou a sua substituição, primeiramente pelo *Bacillus thuringiensis israelenses* (bti), um método de controle biológico, porém seu uso foi inviabilizado devido à baixa persistência causada por sua degradação pela luz solar. Portanto, desde 2009, o temefós foi substituído por larvicidas inibidores da síntese de quitina, diflubenzuron e novaluron. Em 2015 iniciou-se o uso do piriproxifeno, um análogo do hormônio juvenil que inibe a emergência de formas adultas do vetor (76–78). Outra estratégia no controle de larvas de *Ae. aegypti* é o bioinseticida espinosade, que atua nos receptores nicotínicos de acetilcolina e em receptores GABA (79,80).

Malation é um aduicida especial com aplicações de Ultra Baixo Volume (UBV), técnica conhecida como fumacê (81). A resistência a esse inseticida já é conhecida em vários países. No Brasil, chegou a ser substituído por piretróides, porém rapidamente foi identificada resistência a essa classe e o malation voltou a ser utilizado (21,77).

Os carbamatos, assim como os organofosforados, atuam na inibição da AChE, porém de forma reversível (20,70). São utilizados como aduicidas residuais, sendo o mais conhecido o bendiocarb (82).

Em 2020, o Brasil adquiriu novos aduicidas para utilização em pontos estratégicos, isto é, onde há presença de resistência. São esses Cielo-UVL e Fludora®. Sendo esse último um inseticida de efeito residual para substituição do bendiocarb, composto pela mistura de clotianidina (neonicotinoide) e deltametrina (piretroide). Já o Cielo-UVL para substituição do malation, é composto por imidacloprida (neoniconoide) e praletrina (piretroide) (82–85). A utilização de inseticidas contendo misturas de

compostos com mecanismo de ação distintos pode funcionar como proteção ao rápido desenvolvimento e disseminação da resistência (86).

Os piretroides são derivados sintéticos das piretrinas, compostos produzidos pelo metabolismo secundário de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (20,87). Antes da descoberta e do desenvolvimento de inseticidas químicos, esses compostos eram usados como inseticidas, porém apresentam alta sensibilidade à luz. Assim, foram produzidos derivados sintéticos mais estáveis. São exemplos: cipermetrina, permetrina e deltametrina. Apresentam baixa toxicidade aguda a mamíferos, porém contaminam a água, conferindo alta toxicidade a organismos aquáticos. Assim como o DDT, atuam nos canais de sódio, impedindo a propagação do impulso nervoso (71,87). Apesar de estudos comprovarem a presença de populações de vetores resistentes a essa classe, ainda são bastante utilizados (88).

Alternativas às estratégias para o controle químico do vetor surgiram ao longo dos anos, mas sua implementação é bastante limitada. Portanto, este permanece sendo a principal estratégia de controle de epidemias (88).

A rotação de inseticidas, com mecanismos de ação diferentes e intervenções combinadas que atuem nos diferentes ciclos de vida do mosquito são recomendações da OMS para prevenir ou evitar a resistência (89). Porém já foi observada resistência para todas as principais classes de inseticidas citadas (14).

O mecanismo de resistência em *Ae. aegypti* está fortemente relacionado à resistência metabólica, isto é, superexpressão de enzimas de desintoxicação e resistência do sítio alvo, desenvolvimento de mutações do sítio alvo que o tornam insensível ao inseticida. Esses dois mecanismos estão presentes no processo de resistência aos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides. Além disso, resistência a reguladores do crescimento, como diflubenzuron e piriproxifeno também já foi relatada (14,21).

O mecanismo de ação está fortemente relacionado ao desenvolvimento de resistência, portanto é necessário o desenvolvimento de novos compostos com diferentes mecanismos de ação, que atuem sobre o vetor, mas que sejam inertes ao meio ambiente e as outras formas de vida.

3 CAPÍTULO 1 – ATIVIDADE LARVICIDA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS DO CERRADO

3.1 INTRODUÇÃO

A utilização de compostos naturais para controle de insetos e pragas iniciou-se há 1000 anos antes de Cristo, onde o enxofre inorgânico era utilizado no controle de pediculoses (90). Na China antiga e na Idade Média, eram utilizadas flores secas de *Chrysanthemum roseum* como inseticida. No século 19, iniciou-se a produção comercial em grande escala de piretrinas, composto natural presente nesse gênero. Contudo, devido a sua grande instabilidade à luz solar e ao ar, esses compostos naturais foram substituídos por compostos sintéticos (20,90–92). Uma das primeiras plantas utilizadas foi o tabaco, que levou ao isolamento de nicotina, um alcaloide que atua no receptor de acetilcolina, porém é tóxico em mamíferos (93). Em 1968 a substância azadiractina foi isolada da espécie *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) conhecida popularmente como neem (94).

A azadiractina, o componente ativo do óleo de neem, é um inseticida potencial para o controle de diversas pragas, por apresentar atividade repelente, ovicida, larvicida e atuar na regulação do crescimento e na inibição da alimentação (95–97). Esse amplo mecanismo de ação, dificulta o desenvolvimento de resistência. Esta característica, juntamente com a baixa toxicidade a organismos não-alvo e ao meio ambiente favorecem a sua utilização (97). Atualmente, no Brasil, o óleo de neem é aprovado para uso em

formulações inseticidas com atividade em *Ae. aegypti* (98). As limitações de sua utilização são alto custo e a instabilidade à luz solar (97).

A utilização de produtos naturais representa uma vantagem devido à complexidade desses compostos, que podem apresentar mais de um mecanismo de ação, à baixa toxicidade ao meio ambiente e organismos não-alvo (23,93,99–101).

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, rico em biodiversidade e em espécies nativas, que representam 5% da diversidade mundial (102,103). O bioma é considerado um *hotspot* mundial com mais de 50% da vegetação comprometida, principalmente por ações humanas, para áreas de cultivo e pastagem (103,104). Embora muito se fale sobre sua rica biodiversidade, ainda há poucos estudos das diferentes espécies endêmicas (102,104). A grande biodiversidade da vegetação ocorre devido à composição do solo, ao clima, à incidência de incêndios, à distância entre as disponibilidades de água, à profundidade do solo e o lençol freático (103). Essas características também contribuem com a grande variedade de compostos químicos produzidos pelas plantas, que são amplamente utilizadas na medicina tradicional (104,105).

Nesse contexto, o Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília (UnB) vem construindo há quase 23 anos, o Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado, autorizada pelo CGEN/IBAMA (n. 06/2012 – processo n. 02000.002272/2006-73), composto por 67 famílias e 940 extratos.

Uma dessas famílias é a Annonaceae, que é composta por 135 gêneros e 2500 espécies. No Brasil, são encontrados 30 gêneros e 270 espécies, distribuídos pela Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (106–108). É uma família de importância econômica, na produção de sabão, óleos comestíveis, perfume e alimentos (107,109). Utilizada na medicina popular para tratamento de artrite, reumatismo, úlceras gástricas, quadros inflamatórios, cicatrizante de ferida, manejo da dor, entre outros (110). Considerada uma família com grande diversidade de plantas e conseqüentemente, grande variedade de compostos secundários. São encontrados terpenos, alcaloides, flavonoides,

acetogeninas e ligninas (106,110). As espécies *Annona crassiflora* Mart., *Cardiopetalum calophyllum* Schldl., *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Saff., *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart., *Xylopia emarginata* Mart., *Annona exsuka* DC. ex Dunal e *Annona squamosa* L. estão inseridas no Banco de Extratos de Plantas do bioma Cerrado (Laboratório de Farmacognosia/UnB).

Annona é um importante gênero com importantes atividades relatadas na literatura (111,112).

A árvore frutífera *Annona crassiflora* Mart., conhecida como araticum, produz uma grande variedade de metabólitos secundários, como, compostos fenólicos, alcaloides, acetogeninas, carotenóides, tocóis e fitoesteróis. Esses compostos bioativos apresentam atividade anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, analgésica, cicatrizante, antiparasitária, antidiarreica, inseticida, antimicrobiana, antifúngica, antibacteriana e herbicida. Apesar de apresentar todas as atividades descritas, seu uso ainda se restringe à medicina popular, uma vez que ainda não existem produtos disponíveis e essas atividades ainda não foram avaliadas em estudos pré-clínicos (105).

Em 2007, devido a estudos botânicos, o gênero *Rollinia* foi considerado sinônimo do gênero *Annona*, sendo assim, a espécie *Rollinia exsucca* (DC. Ex Dunal) A. DC. passou a ser conhecida como *Annona exsucca* DC. ex Dunal (113). Essa planta é encontrada na América do Sul e América Central, conhecida popularmente como araticum macho (114,115). Nessa espécie são encontrados sesquiterpenos e, até o presente momento na literatura, foi encontrada apenas atividade antiparasitária nos extratos (114,116).

Annona squamosa L., conhecida como pinha, é encontrada na América do Sul e na Índia Ocidental. Na medicina popular é utilizada para diarreia, disenteria, câncer, parasitismo, úlceras e feridas. Na literatura, são relatadas atividades, antioxidante, antitumoral, antidiabética, anti-inflamatória, analgésica, anti-hipertensiva, antiparasitária, inseticida, citotóxica, antimicrobiana, antifúngica e hepatoprotetora. Os metabólitos secundários são terpenos, alcaloides, acetogeninas, saponinas e flavonoides (117,118).

Cardiopetalum calophyllum Schltdl., conhecida como imbirinha, é uma planta nativa do Cerrado brasileiro (119). Como metabólitos secundários destaca-se a presença de alcaloides isoquinolínicos, mono e sesquiterpenos (120,121). Na literatura, já foram relatados testes da atividade de extratos e óleo essencial extraído das folhas em larvas de *Ae. aegypti*, bactérias e fungos. (121–123).

Duguetia furfuracea (A. St.-Hil.) Saff., conhecida como araticum seco, araticum do Cerrado e ata brava é utilizada na medicina popular para tratamento de pediculoses, cólica renal, reumatismo e como anorexígeno (124,125). Como metabólitos secundários dessa espécie, destaca-se a presença de alcaloides, sesquiterpenos, compostos fenólicos, flavonoides, taninos, xantonas (124–126). Esses compostos já foram avaliados frente às seguintes atividades biológicas: antitumoral, tripanocida, antileishmania, antimalárica, antifúngica, antioxidante, larvicida em *Aedes aegypti* e anti-inflamatória (122,126–129).

Xylopia é um dos gêneros mais importantes da família com mais de 150 espécies (130). A *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart., também conhecida como pimenta de macaco, é a espécie mais comum encontrada no Brasil, utilizada na medicina popular como estimulante/afrodisíaco, diurético e carminativo e utilizada na culinária como tempero de carne (131,132). Os principais metabólitos secundários são acetogeninas, terpenos, alcaloides e amidas (131,133–136). Na literatura já foram relatadas atividade antimicrobiana, antifúngica, tripanocida, antileishmania, antimalárica, citotóxica e larvicida (114,122,129,131,137,138). Ao contrário da *X. aromatica*, que é uma pequena árvore, a *Xylopia emarginata* Mart. é uma árvore alta chegando até 20 metros, conhecida como pindaíba, pindaíba-reta, pindaíba d'água e pindaíba do brejo (131,139,140). Nessa espécie são encontrados alcaloides, terpenos, flavonoides, acetogeninas e esteroides (107,130,141–143). Esses compostos são responsáveis pelas atividades reportadas na literatura, como atividade anti- *Plasmodium falciparum* e anti- *Trypanosoma cruzi* (129,139).

Os extratos de *A. crassiflora*, *C. calophyllum*, *D. furfuracea*, *X. aromatica* e *X. emarginata*, pertencentes ao Banco de Extratos de Plantas do bioma Cerrado do

(Laboratório de Farmacognosia/UnB), foram avaliados em diferentes alvos biológicos, e apresentaram atividade antitumoral, antiparasitária e inseticida, publicadas em periódicos (tabela 1).

<i>Xylopi aromatica</i> Mart./ pimenta de macaco/ (UB) 3699	CR (e)	*	30,4 ± 1,3	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	C ⁷ (h)	*	50,0 ± 1,6	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	C (e)			*	*	*	*	*	*	*	*	*
	F (h)			*	*	*	*	*	*	*	*	*
	F (e)			*	*	*	*	*	*	*	384,37	5
	MC (h)			*	*	*	*	*	*	*	*	*
	MC (e)			*	*	*	*	*	*	*	*	*
	CC (h)			15,3 ± 2,2	*	*	*	*	*	*	*	*
	CC (e)			*	*	*	*	*	*	*	*	*
	MR (h)	*	21,6 ± 6,0	4,7 ± 0,9	14,6	17,1	19,1	5,9	*	*	*	*
	MR (e)				*	*	*	*	*	*	*	*
	CR (h)	*	23,5 ± 4,7	6,8 ± 0,6	*	*	*	*	*	*	*	*
	CR (e)			*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Xylopi emarginata</i> Mart./ pindaíba/ (UB) 3690	F (h)	*	57,6 ± 2,4	*	*	*	*	*	*	*	*
F (e)				*	*	*	*	*	*	*	*	*
MC (h)				10,9 ± 2,4	*	*	*	*	*	*	*	*
CC (h)				5,2 ± 0,4	*	*	*	*	*	*	*	*
CC (e)					*	*	*	*	*	*	*	*
MR (h)				*	*	*	*	*	*	*	*	*
MR (e)				*	*	*	*	*	*	*	*	*
CR (h)				4,9 ± 0,2	*	*	*	*	*	*	*	*
CR (e)			*	*	*	*	*	*	*	*	*	

¹F: extrato da folha; ²MC: extrato da madeira do caule; ³CC: extrato da casca do caule; ⁴MR: extrato da madeira da raiz; ⁵CR: extrato da casca da raiz; ⁶R: extrato da raiz (casca + madeira); ⁷C: extrato do caule (casca + madeira); h: hexano; e: etanol. *L- Leishmania*; *T- Trypanosoma*; *P- Plasmodium*; *Z- Zabrotes*; *A- Acanthoscelides*; *Ae- Aedes*; *D- Dipetalogaster*. HCT-8 (cólono), MDA-MB-435 (melanoma), SF-295 (sistema nervoso central), HL-60 (leucemia). Observação: em *amostras testadas porém sem atividade no alvo biológico.

Atividade antitumoral foi avaliada por ensaios de toxicidade em diferentes linhagens de células cancerígenas: HCT-8 (côlon), MDA-MB-435 (melanoma), SF-295 (sistema nervoso central), HL-60 (leucemia). Os extratos etanólicos da madeira e caule da raiz de *A. crassiflora* e o extrato hexânico da madeira do caule de *X. aromatica* foram ativos e seus valores de CI_{50} (concentração inibitória média) determinados. Essa atividade pode estar relacionada à presença de acetogeninas, que já possuem atividade antitumoral relatada (138).

A atividade antiparasitária foi avaliada *in vitro* frente a três importantes protozoários parasitas, *L. donovani* (promastigotas), *T. cruzi* (amastigota) e *P. falciparum*. A melhor atividade, frente a *L. donovani* foi atribuída ao extrato etanólico da casca da raiz de *A. crassiflora*. Já para *T. cruzi*, o extrato mais ativo foi o extrato hexânico da casca da raiz de *D. furfuracea*. Para *P. falciparum*, a melhor atividade foi atribuída ao gênero *Xylopi*, extratos hexânicos da madeira da raiz de *X. aromatica* e da casca do caule de *X. emarginata* apresentaram melhores valores de CI_{50} (129,139).

A atividade inseticida foi avaliada sobre dois vetores de doenças e duas pragas agrícolas. Nenhum extrato foi ativo contra o vetor da doença de Chagas, *Dipetalogaster máxima* (144). A atividade em larvas L3 de *Ae. aegypti* demonstrou que o extrato mais ativo foi a casca da raiz de *A. crassiflora* com valor de LC_{50} (concentração letal média) igual a 23,06 $\mu\text{g/mL}$ (122). A atividade sobre duas pragas agrícolas, *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus*, foi avaliada através de testes de inibição de α -Amilase, uma enzima digestiva utilizada como alvo no desenvolvimento de métodos de controle, o único extrato ativo foi o extrato etanólico das folhas de *A. crassiflora* (145).

Considerando a ampla atividade desses extratos e que apenas os extratos brutos foram avaliados, foram realizados dois estudos utilizando duas espécies dessa família, com o objetivo de isolar e identificar compostos com atividade larvicida em *Ae. aegypti*

A. crassiflora foi escolhida para identificação de compostos, a partir de um estudo metabolômico. A utilização de técnicas quimiométricas, juntamente com testes

biológicos, permite a identificação de compostos ativos em estruturas complexas sem a necessidade de isolamento. Após isso, as informações adquiridas são utilizadas para execução de um isolamento direcionado e mais rápido comparado ao modelo clássico de isolamento (146). O estudo metabolômico dos extratos de *A. crassiflora* levou ao isolamento de acetogeninas, que resultou em uma publicação no periódico *Scientific Reports* (147).

Embora o estudo publicado pelo grupo de pesquisa em 2006 (122) não tenha relatado atividade larvicida para o extrato hexânico da folha de *X. aromatica*, essa ação foi reavaliada em um outro modelo de teste. Após o novo teste, observou-se mortalidade de 85% de larvas L3 de *Ae. aegypti*, em 24 horas, quando expostas a esse extrato na concentração de 250 µg/mL. Portanto, foi realizado fracionamento bioguiado, utilizando o modelo clássico, que resultou no isolamento de um diterpeno e um sesquiterpeno. Esse resultado foi publicado na Revista Brasileira de Farmacognosia (148).

3.2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo utilizar análises quimiométricas e clássicas para identificar e isolar compostos da família Annonaceae com atividade em larvas de *Ae. aegypti*.

3.2.1 Objetivos Específicos

- Utilizar ferramentas quimiométricas para identificar os extratos ativos de *Annona crassiflora*
- Testar extratos em larvas de *Ae. aegypti*
- Utilizar técnicas cromatográficas para isolamento de compostos ativos

- Identificar e elucidar os compostos ativos
- Determinar a concentração letal média (LC₅₀) de cada composto
- Realizar testes de toxicidade em peixe-zebra

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 *Annona crassiflora* Mart.- análises quimiométricas

Um total de oito extratos de *A. crassiflora* - pertencentes ao Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado (Laboratório de Farmacognosia/UnB), hexânicos e etanólicos de folhas, madeira e casca do caule; e extratos etanólicos de madeira e casca da raiz foram utilizados na realização do estudo quimiométrico (tabela 2).

Tabela 2 - Extratos de *Annona crassiflora* utilizados no estudo

Código da amostra¹	Droga vegetal	Solvente
Arbo0037	Madeira do caule	Etanol
Arbo0038	Madeira do caule	Hexano
Arbo0039	Folha	Etanol
Arbo0040	Folha	Hexano
Arbo0041	Casca da raiz	Etanol
Arbo0042	Madeira da raiz	Etanol
Arbo0043	Casca do caule	Hexano
Arbo0044	Casca do caule	Etanol

¹ Código interno do Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado criado para execução do Projeto ArboControl- Laboratório de Farmacognosia/UnB.

3.3.1.1. Partição dos Extratos em Fase Sólida

Todos os extratos de *A. crassiflora* foram particionados utilizando cartuchos de Diol (SPE-Diol – cartuchos DIO Spe-ed 2 g, 6 mL, Applied Separations, Allentown, PA, USA), em cada cartucho foram adicionadas cerca de 150 mg de cada extrato. Foram utilizadas três fases móveis: hexano, acetato de etila e metanol (6 mL de cada solvente por cartucho), dando origem a amostras denominadas pré-frações. O rendimento das pré-frações foi calculado, e as que tiveram peso ≥ 5 mg foram: (i) testadas em larvas de *Ae. aegypti*, e (ii) solubilizadas em metanol para obtenção de soluções a 1 mg/mL, filtradas em membrana de 0,22 μm e analisadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a detector por arranjo de diodo e a Espectrômetro de Massas - *HPLC-DAD-MS/MS* (147).

3.3.1.2. Análises Quimiométricas

As pré-frações de *A. crassiflora* obtidas por extração em fase sólida foram analisadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu LC-6AD acoplado a Espectrômetro de Massas de alta resolução (Compact, Bruker ESI-qTOF). Para aquisição dos dados, foi utilizada coluna C18 Supelco Ascentis Express (15 cm \times 4.6 mm, tamanho de partícula 2.7 μm) e fase móvel constituída de água ultrapura e metanol, com 0,1% de ácido fórmico (J. T. Baker). O método de eluição começou com 5% de metanol e aumentou até 100% em 30 minutos, com mais 20 minutos para limpeza e estabilização da coluna, com tempo total de corrida de 50 minutos e modo de aquisição positivo. Foi utilizado fluxo de 0,6 mL/min, volume de injeção 20 μL e temperatura do forno a 40 $^{\circ}\text{C}$. Os parâmetros da fonte de ionização foram: voltagem do capilar a 3500V, nebulizador 5,5 bar, gás nebulizador a 10 L/min e temperatura da fonte a 230 $^{\circ}\text{C}$ (147).

Os dados obtidos foram convertidos para o formato mzXML pelo software

MsConvert, os quais foram exportados para processamento no programa MZmine. Os parâmetros de processamento foram:

- Detecção das massas: Tempo de retenção (TR) 2,5 – 35 min, centróide;
- Construção de cromatogramas: MS nível 1; altura mínima 1.0×10^4 ; tempo mínimo de span 0,5 min; m/z tolerância 10 ppm;
- Deconvolução: *Algorithm Savitzky-Golay*;
- Agrupamento de isótopos: m/z tolerância 10 ppm; TR tolerância 0,1 min;
- Dupla filtragem de pico;
- Alisamento;
- Alinhamento: *Join aligner*, m/z tolerância 10 ppm; TR tolerância 0,5 min;
- *Gap-filing*: intensidade tolerância 20%; m/z tolerância 10 ppm, TR tolerância 0,5 min;
- Faixa de filtragem de pico: 0.00 – 0.5 min.

Após processados, os dados de MS1 foram exportados e transferidos para a plataforma online de estatística exploratória, MetaboAnalyst®. Nessa plataforma foram realizadas análises estatísticas não supervisionadas: Análise de Componentes principais - PCA e Análise de Agrupamento Hierárquicos - HCA; e análise supervisionada: Projeção de Mínimos Quadrados Parciais para Estruturas Latentes – sPLS (147). Os dados de LC-MS/MS no formato mzXML, divididos em grupos ativos e inativos, foram analisados pela plataforma GNPS - *Global Natural Products Social Molecular Networking* - Rede global de moléculas sociais de produtos naturais utilizando parâmetro padrão (147).

3.3.1.3. Fracionamento Bioguiado

Foi realizado fracionamento bioguiado do extrato hexânico da madeira do caule de *A. crassiflora* conforme esquematizado na figura 2.

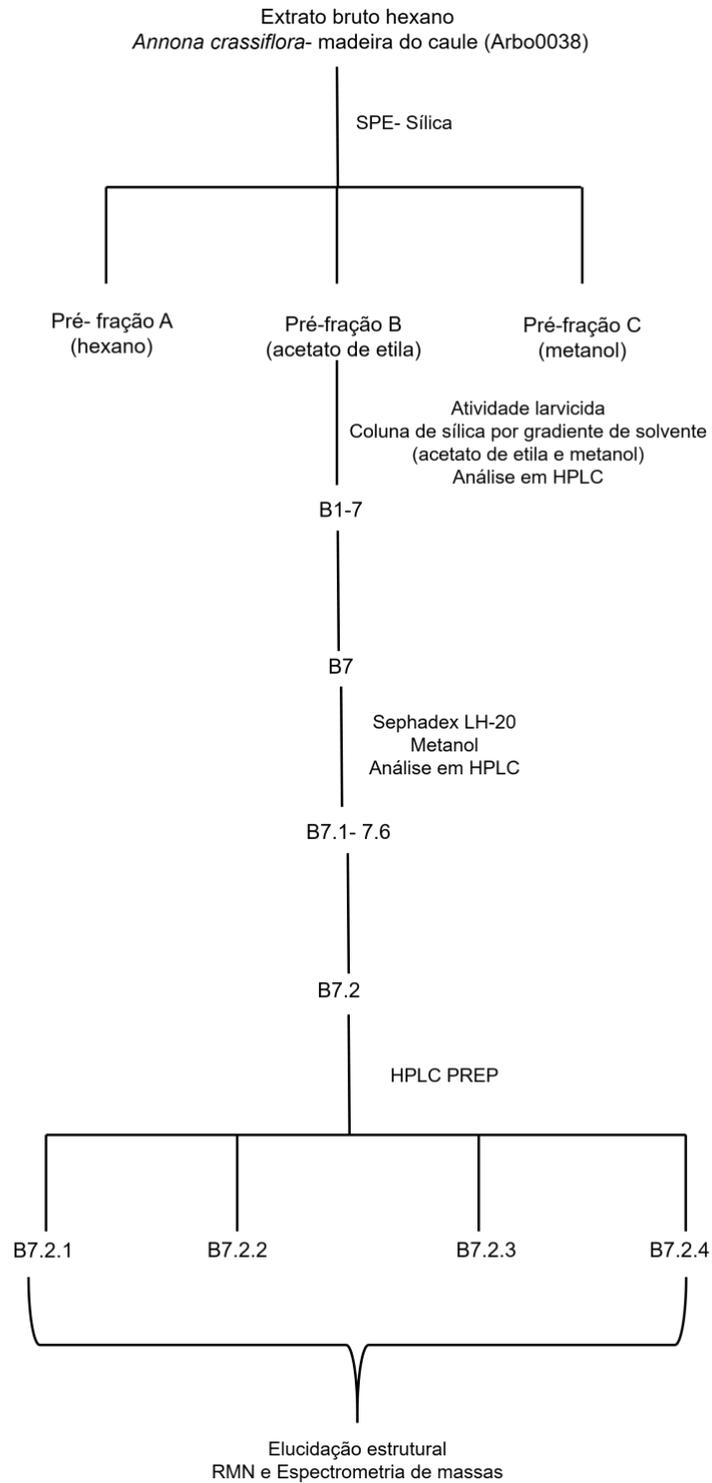


Figura 2 - Fluxograma das etapas do fracionamento bioguiado de *A. crassiflora* utilizando modelo clássico.

O extrato (8,7 g) foi pré-fracionado em cartucho de sílica (174 g) eluído com hexano (**A**), acetato de etila (**B**) e metanol (**C**) (800 mL de cada solvente). Foi calculado o rendimento das pré-frações (**A** - 10%; **B** - 21%; **C** - 69%) e realizado o teste larvicida a 125 µg/mL. A pré-fração **B** apresentou maior atividade e foi fracionada em cromatografia em coluna aberta de sílica eluída com acetato de etila e metanol. As frações obtidas foram agrupadas através de análises realizadas em HPLC Waters Breeze™ (coluna C18 Sunfire 4,6 x 150 mm; tamanho de partícula= 5 µm; fluxo 1 mL/min; volume de injeção= 15 µL; bomba A= água ultrapura e bomba B= metanol 0,1 % (v/v) ác. Fórmico), método gradiente iniciado com 20% de B, em dois minutos aumentou para 60% de B, em 10 minutos para 80% de B e gradiente suave entre 80-85% até 80 min. Por meio do agrupamento foram obtidas 7 novas frações (rendimentos: **B1** - 7,4%; **B2** - 0,8%; **B3** - 1,0%; **B4** - 1,6%; **B5** - 10,1%; **B6** - 5,4%; **B7** - 73,7%). A fração **B7** (996 mg) foi submetida à purificação em coluna de Sephadex® LH-20 eluída em metanol, resultando em 6 frações novamente avaliadas por HPLC e com rendimento calculado (**B1.1** - 36%; **B1.2** - 22%; **B1.3** - 1,5%; **B1.4** - 1,3%; **B1.5** - 1,2%; **B1.6** - 0,8%). A fração **B7.2** derivada desta coluna foi fracionada em HPLC- preparativo (*Varian ProStar*; coluna C18 *Varian Dynamex* 250x21.4 mm; fluxo 20 mL/min). As pré-frações (**B7.2.1**, **B7.2.2**, **B7.2.3** e **B7.2.4**) foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl₃) para análise de elucidção estrutural em Ressonância Magnética Nuclear (RMN; *NMR*; Bruker Fourier 600 MHz ¹H e 150 MHz ¹³C) e solubilizadas em metanol para análise em Espectrometria de massas (*HRMS*; ESI-Qtof; AB Sciex TripleTOF5600+) (147).

3.3.2. *Xylopiá aromática* (Lam.) Mart.- uso de métodos clássicos para isolamento

Os extratos de *X. aromática* foram reavaliados em larvas L3 de *Ae. aegypti*, e o extrato hexânico das folhas foi submetido ao fracionamento bioguiado utilizando técnicas de cromatografia clássica conforme demonstrado no figura 3 (148,149).

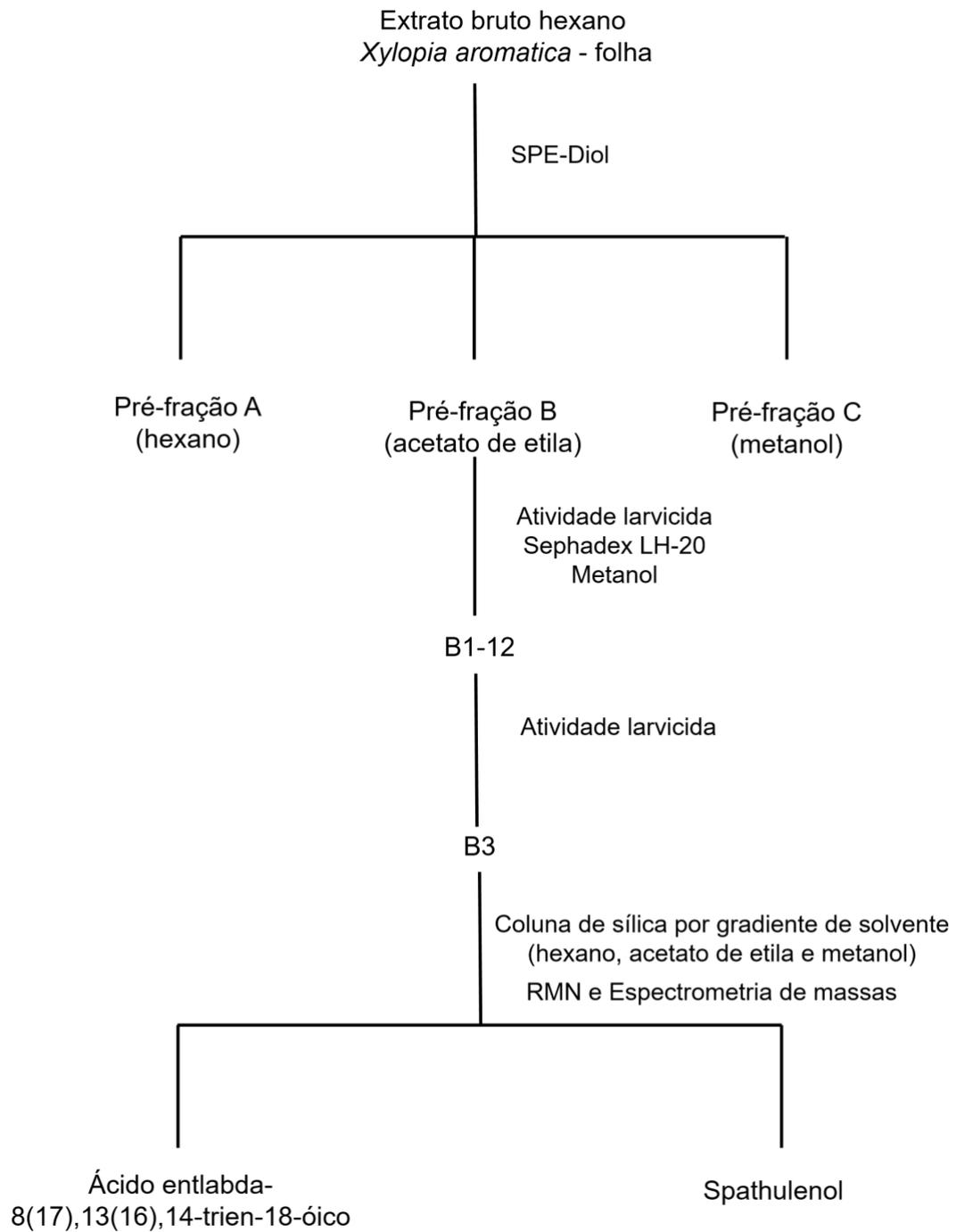


Figura 3 - Fluxograma das etapas do fracionamento bioguiado de *X. aromatica* utilizando modelo clássico.

O extrato hexânico da folha de *X. aromatica* (1,5 g) foi pré-fracionado em cartuchos SPE-Diol (10 cartuchos com cerca de 150 mg de extrato em cada), eluídos com hexano

(**A**), acetato de etila (**B**) e metanol (**C**) (6 mL de cada solvente). A pré-fração ativa **B** (1,23 g) foi fracionada utilizando cromatografia de coluna aberta com fase estacionária Sephadex® LH-20 e metanol como fase móvel, foram obtidas 12 frações (rendimentos: **B1** - 5,1%; **B2** - 13,5%; **B3** - 46,9%; **B4** - 12,7%; **B5** - 0,7%; **B6** - 0,5%; **B7** - 0,1%; **B8** - 1,3%; **B9** - 0,6%; **B10** - 0,6%; **B11** - 2,4%; **B12** - 13,4%) conforme agrupamento por comparação do perfil cromatográfico em cromatografia em camada delgada (CCD). A fração **B3** foi fracionada em cromatografia aberta de sílica utilizando um gradiente de solventes: hexano, acetato de etila e metanol; as alíquotas obtidas foram reunidas em 7 novas frações (rendimentos: **B3.1** - 15,6%; **B3.2** - 29%; **B3.3** - 2,0%; **B3.4** - 2,6%; **B3.5** - 0,6%; **B3.6** - 5,5%; **B3.7** - 3,1%). A fração **B3.2** foi submetida a análise analítica em cromatografia líquida de alta eficiência e elucidção estrutural em RMN e HRMS. Esse fracionamento bioguiado pelo teste larvicida permitiu o isolamento de um diterpeno. A realização do isolamento bioguiado escalonado permitiu também, o isolamento de um sesquiterpeno (148,149).

3.3.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para análise do perfil cromatográfico foi utilizado HPLC Waters Breeze™, com as seguintes especificações: coluna C18 SunFire™, 4,6 x 150 mm; fluxo= 1 mL/min; volume de injeção= 15 µL; tamanho de partícula= 5 µm; bomba A= água ultrapura e bomba B= metanol 0,1% (v/v) ác. fórmico. O método foi iniciado a 5% de B, mantendo-se isocrático por 2 minutos, depois foi realizado gradiente até 100% de B em 30 minutos. A corrida teve duração total de 40 minutos, uma vez que foram adicionados 10 minutos para lavagem e estabilização da coluna (149).

3.3.2.2 Massa Molecular e Elucidção Estrutural

Foi preparada uma alíquota de 1 mg/mL da fração **B3.2** solubilizada em metanol para análise em Espectrometria de Massas de Alta Resolução (*HRMS*; ESI-Qtof; AB Sciex TripleTOF5600+) por infusão direta e modo de aquisição negativo. Foi calculada a fórmula molecular utilizando o software online *Molecular Weight Calculator*[®] com tolerância de 5 ppm (erro). Para elucidação estrutural as amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e analisadas em Ressonância Magnética Nuclear (*Bruker Fourier* 600 MHz ^1H e 150 MHz ^{13}C) (149).

3.3.2.3 Avaliação da Toxicidade em Peixe-zebra (*zebrafish*)

Foi realizado ensaio piloto de embriotoxicidade para avaliação de ecotoxicidade, do diterpeno isolado, em peixe-zebra (*Danio rerio*). O teste foi realizado no Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília (UnB) e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, sob número de protocolo n.100226/2014.

Os peixes-zebra foram mantidos em aquários com água filtrada por osmose reversa e carvão ativado, em sala climatizada com foto período de 12:12 horas (claro e escuro). Os ovos foram coletados logo após a desova, lavados, distribuídos individualmente em placas de 96 poços (um por poço) contendo a solução teste (250 μL) para exposição nos estágios iniciais de desenvolvimento. Para garantir a viabilidade de cada ovo, esses foram analisados individualmente em estereoscópio (Stereoscopic Zoom Microscope – SMZ 1500, Nikon Corporation) descartando os não fertilizados e com danos.

O teste foi baseado no protocolo n. 236 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Co-operation and Development - OECD*), “*Fish Embryo Toxicity (FET) test*” (150). As soluções foram preparadas utilizando água de cultivo a partir de uma solução estoque em

dimetilsulfóxido (DMSO), e utilizadas em sete concentrações baseadas no valor de LC_{50} do diterpeno em larvas de *Ae. aegypti* (10, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 mg/L). Todas as concentrações foram testadas na mesma placa e para cada concentração foram utilizados 10 ovos. Como controle negativo foi utilizada água do sistema (n = 12), controle interno de placa, água do sistema e embrião (n = 12) e controle de solvente solução DMSO 1% (n = 12). As placas foram mantidas em câmara climática. O tempo total de teste foi de 96 horas com leitura a cada 24 horas.

3.3.3. TESTES BIOLÓGICOS *Aedes aegypti*

3.3.3.1. Manutenção da Colônia de *Ae. aegypti*

A colônia de *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller) foi mantida no Insetário ArboControl - Laboratório Prof. José Elias de Paula/ Anexo do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília em condições controladas de temperatura e umidade relativa ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$; $80\% \pm 10\%$) com fotoperíodo de 12 horas claro e escuro (figura 4).



Figura 4. Sala de manutenção da colônia Rockefeller de *Ae. aegypti*. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB

Os ovos foram eclodidos utilizando câmara a vácuo. As larvas eclodidas foram transferidas para bandejas de plástico contendo água e alimentadas com ração de peixe. As pupas foram separadas (machos e fêmeas) utilizando estereomicroscópio e as gaiolas foram montadas na proporção de 3 fêmeas para 1 macho. Os adultos foram alimentados com solução açucarada (10% v/v) e as fêmeas também com sangue de égua para maturação dos ovos.

3.3.3.2. Teste larvicida

Para os testes larvicidas foram utilizadas placas de 12 poços, em cada poço foram adicionadas 10 larvas no terceiro estágio (larvas L3), 3 mL de água e 50 μ L de amostra (figura 5). As amostras foram diluídas em DMSO e a concentração de teste variou entre

extrato bruto, testados a 250 µg/mL; pré-frações e frações, testadas a 125 µg/mL; e composto isolado a 25 µg/mL. A mortalidade foi avaliada e registrada em 24, 48 e 72 horas. Foram consideradas larvas mortas aquelas que não se movimentavam e não reagem a estímulos. Os testes foram realizados em quadruplicata e como controle negativo foi utilizado DMSO (50 µL por poço).



Figura 5. Placas de doze poços contendo larvas L3 de *Ae. aegypti*, antes da aplicação das amostras. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.

As salas de teste foram mantidas nas mesmas condições controladas da sala de manutenção das colônias. Se 20% das larvas se transformassem em pupa durante as primeiras 24 horas, o experimento era descartado e repetido. Se a mortalidade do controle estivesse entre 5% e 20%, a mortalidade dos grupos tratados era corrigida conforme a fórmula de Abbott:

$$Mortalidade (\%) = \frac{X - Y}{X} 100$$

Sendo X a porcentagem de sobreviventes no controle e Y a porcentagem de sobreviventes tratados (151).

3.3.3.2.1. Determinação de LC_{50} em larvas de *Ae. aegypti*

Foram determinados os valores de LC_{50} , isto é, concentração necessária para causar mortalidade em metade dos indivíduos expostos, do extrato hexânico das folhas de *X. aromatica*, do composto ativo isolado (Ácido entlabda-8(17),13(16),14-trien-18-óico) e das frações obtidas no estudo de *A. crassiflora*. Em todos os testes de LC_{50} foram aplicadas em cada replicata 50 μ L de amostra solubilizada em DMSO, também utilizado como controle negativo.

Os testes para avaliação da LC_{50} do extrato e do composto isolado de *X. aromatica* foram realizados três vezes em quadruplicata, utilizando lotes diferentes de larvas (151). As leituras foram realizadas em 24, 48 e 72 horas. Para o extrato, foram testadas 8 concentrações (300, 250, 200, 150, 100, 75, 50 e 25 μ g/mL) em placas de 12 poços contendo 10 larvas L3 e 3 mL de água em cada poço. Para o ácido, foram testadas 5 concentrações (125, 100, 75, 50 e 25 μ g/mL) em copos de 50 mL contendo 20 mL de água e 25 larvas L3.

A avaliação da LC_{50} das frações **B7.2.1**, **B7.2.2**, **B7.2.3** e **B7.2.4** foi realizada em um único teste, devido a baixa quantidade de amostra. As concentrações testadas foram: 100, 75, 50, 25, 10 e 1 μ g/mL. O teste foi realizado utilizando placas de 12 poços, contendo 10 larvas L3 e 3 mL de água em cada, e a leitura foi realizada após 48 horas de exposição.

A curva de dose-resposta e os valores de LC_{50} foram obtidos por análises em GraphPad Prism 7[®].

3.3.3.3 Avaliação da Atividade Pupicida

A atividade pupicida foi avaliada apenas para compostos isolados, testados a 25 µg/mL. A atividade pupicida do composto sintético (capítulo 3) foi avaliada em placas de 12 poços, em quadruplicata, com 10 pupas por poço. Para o diterpeno isolado de *X. aromatica*, foram utilizadas 5 pupas por poço. Em ambos os testes, foram utilizadas pupas com no máximo um dia de vida e as leituras foram realizadas em 24 e 48 horas.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 *Annona crassiflora* Mart.- análises quimiométricas

A espécie *A. crassiflora* foi escolhida para realização de um estudo modelo por meio da utilização de técnicas quimiométricas, que possibilita a identificação dos compostos de interesse antes do isolamento. Essa medida favorece a execução de pesquisas direcionadas para o isolamento somente de compostos ativos no alvo estudado. No âmbito do projeto ArboControl, o desenho desse modelo foi essencial, pois somente no Banco de Extratos de Plantas do bioma Cerrado (Laboratório de Farmacognosia, UnB) foram encontrados mais de uma centena de extratos ativos em *Ae. aegypti* (147).

O fracionamento em fase sólida dos extratos de *A. crassiflora*, resultou na obtenção de 16 pré-frações, sendo as pré-frações Arbo0038 - metanol, Arbo0039 - acetato de etila e Arbo0040 - metanol desconsideradas já que apresentaram massa inferior a 5 mg (tabela 3). Adicionalmente, as pré-frações hexânicas foram desconsideradas, tendo em vista, o baixo rendimento da maioria das frações e a necessidade de um número maior de amostras para a robustez da análise estatística.

Portanto, somente as 13 outras pré frações resultantes foram testadas em larvas de *Ae. aegypti* e submetidas a análise em HPLC-DAD- MS/MS (147).

Tabela 3 - Extratos de *A. crassiflora* particionados, sistema eluente utilizado e rendimento de cada pré fração obtida.

Código da amostra	Sistema eluente	Rendimento (%)	Mortalidade (%)
Arbo0037	Hexano		45
Arbo0037	Acetato de etila	35,8	45
Arbo0037	Metanol	47,2	0
Arbo0038	Hexano	31,9	-
Arbo0038	Acetato de etila	46,1	12,5
Arbo0038	Metanol	0 ¹	-
Arbo0039	Hexano	1,6	-
Arbo0039	Acetato de etila	8,6 ¹	-
Arbo0039	Metanol	64,5	0
Arbo0040	Hexano	31,1	-
Arbo0040	Acetato de etila	62,8	0
Arbo0040	Metanol	3,9 ¹	-
Arbo0041	Hexano	1,2	-
Arbo0041	Acetato de etila	29,4	70
Arbo0041	Metanol	44,5	0
Arbo0042	Hexano	1,4	-
Arbo0042	Acetato de etila	37,4	50
Arbo0042	Metanol	43,1	2,5
Arbo0043	Hexano	9,5	-
Arbo0043	Acetato de etila	25,7	35
Arbo0043	Metanol	19,3	0
Arbo0044	Hexano	1,1	-
Arbo0044	Acetato de etila	32,9	32,5
Arbo0044	Metanol	36,9	0

¹Frações desconsideradas, massa < 5 mg. Frações hexânicas desconsideradas.

Das 13 amostras testadas, 6 foram ativas em larvas, uma vez, que apresentaram mortalidade > 10% em 48 horas. As análises dos cromatogramas gerados por DAD (detector por arranjo de diodo) e dos cromatogramas de pico base (BPC) permitiram observar a complexidade dessas frações e pequenas diferenças entre as frações ativas e inativas, no entanto, essas diferenças foram insuficientes para determinar com precisão o tempo de retenção (TR) dos compostos ativos (figura 6). Sendo assim, essa única aquisição de dados foi utilizada para realizar as análises quimiométricas (147).

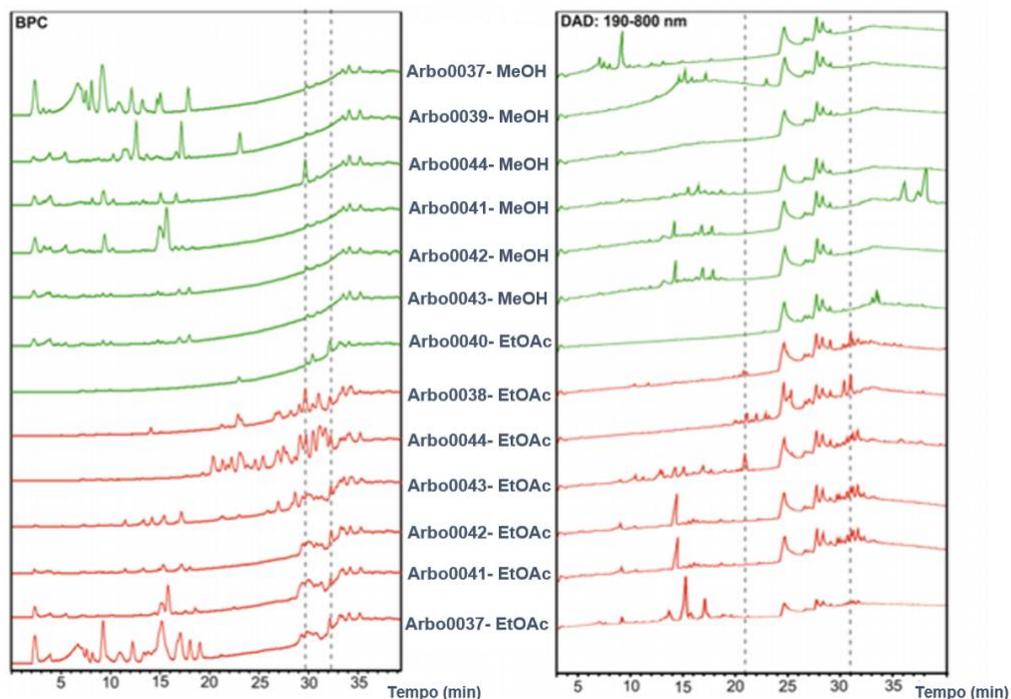


Figura 6- Cromatogramas de pico de base (BPC) e cromatogramas gerados por DAD (detector por arranjo de diodo), das frações obtidas da partição em SPE-Diol. Verde: inativas; vermelho: ativas. MeOH: metanol; EtOAc: acetato de etila. BPC: observada diferenças entre as amostras ativas e inativas no tempo de retenção de ~ 30 min; DAD: similaridade entre as amostras ativas e inativas (tempo de retenção 20-30 min). Adaptado de Demarque et al., 2020 (147).

As análises estatísticas supervisionadas e não supervisionadas utilizaram apenas dados de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) pré-processados, isto é, sem fragmentação, na plataforma MetaboAnalyst[®]. Foram realizadas duas análises multivariadas não supervisionadas, análise de componentes principais

(PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (HCA); e uma análise supervisionada, projeção de mínimos quadrados parciais para estruturas latentes (sPLS) (147).

Nas análises não supervisionadas, a atividade das frações foi desconsiderada. Uma vez que essas amostras foram submetidas à apenas uma etapa de partição, por SPE, e são amostras de uma mesma espécie, a semelhança química entre elas era esperada, como observado nos cromatogramas (figura 6). No entanto, foi possível observar a diferenciação química dessas amostras utilizando as análises não supervisionadas (figura 7). Na HCA (análise hierárquica de agrupamentos) houve diferenciação entre os grupos, com exceção da fração acetato de etila Arbo0044, que foi agrupada às frações inativas. No gráfico da PCA (análise de componentes principais) foi possível observar que embora as frações ativas estivessem mais dispersas no plano, ainda estavam restritas a uma área diferente; e as frações inativas estavam próximas e concentradas na porção direita do gráfico, com os dois componentes sendo responsáveis por 55% dessa variância (147).

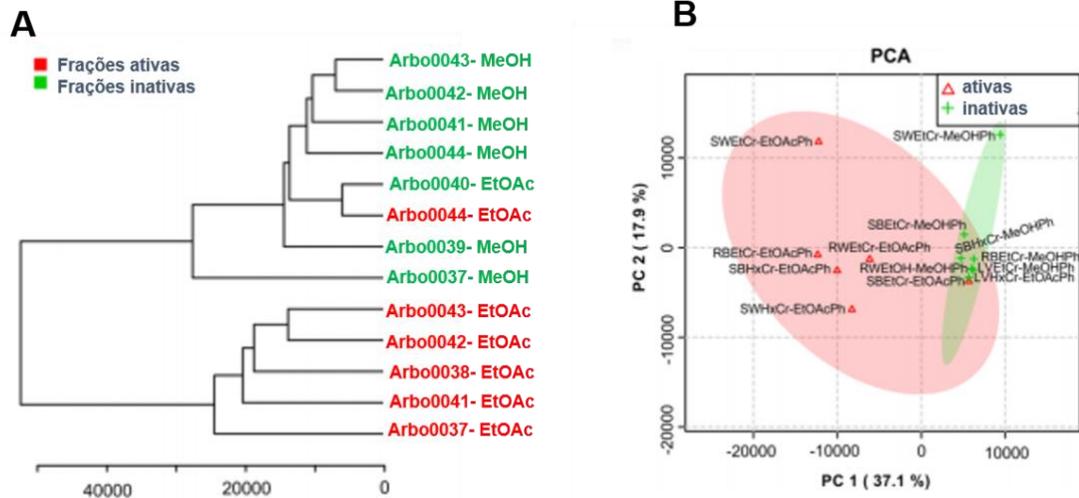


Figura 7- Gráficos das análises não supervisionadas. **A**: HCA; **B**: PCA. Fonte: Demarque et al., 2020 (147).

A análise multivariada e supervisionada, conhecida como projeção de mínimos quadrados parciais para estruturas latentes (sPLS) foi fundamental na eficiência da

separação dos grupos, uma vez que esta considera a atividade biológica das amostras para realização do agrupamento, maximizando as diferenças entre os grupos e indicando os principais componentes (m/z e TR) responsáveis por essa diferenciação definidos no *VIP SCORE* (figura 8). Essa técnica tornou-se importante na separação de amostras complexas e semelhantes, como essas amostras aqui testadas (147).

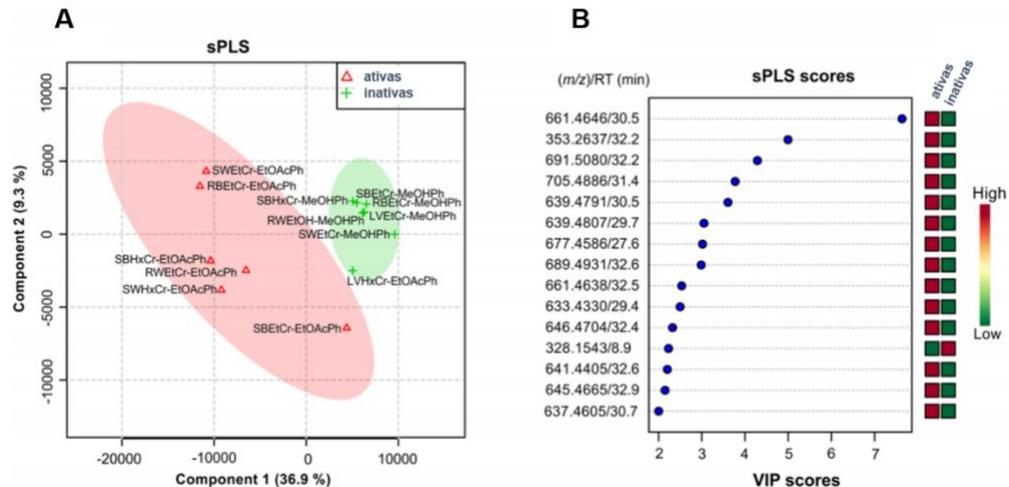


Figura 8 – **A**: sPLS: análise multivariada supervisionada que maximiza a separação entre as amostras. Em vermelho estão as frações ativas e em verde, as inativas. **B**: *VIP SCORE*: apresenta os íons importantes para separação dos grupos. Fonte: Demarque et al., 2020 (147).

A separação entre os grupos apresentada pela técnica supervisionada (figura 8) foi visivelmente maior comparada com o gráfico gerado pela análise de PCA (figura 7). Além disso, o resultado dessa técnica foi importante para determinar o intervalo do tempo de retenção (TR) dos compostos responsáveis pela diferenciação dos grupos (29 - 32 min). O composto com m/z 661,4646 (30,5 min) (primeiro composto indicado na figura 8B) foi determinante na separação entre os grupos e presente em maior intensidade nas amostras ativas (147).

Os dados de LC-MS/MS foram utilizados para análise em GNPS que resultou na formação de dois clusters conforme similaridade dos perfis de fragmentação dos íons percussores (figura 9). As fórmulas moleculares foram calculadas com erro máximo de 7 ppm e comparadas com a base de dados, que juntamente com as informações

observadas nas outras análises, confirmaram que os compostos ativos pertenciam a classe das acetogeninas (C₃₅-C₃₉) (147).

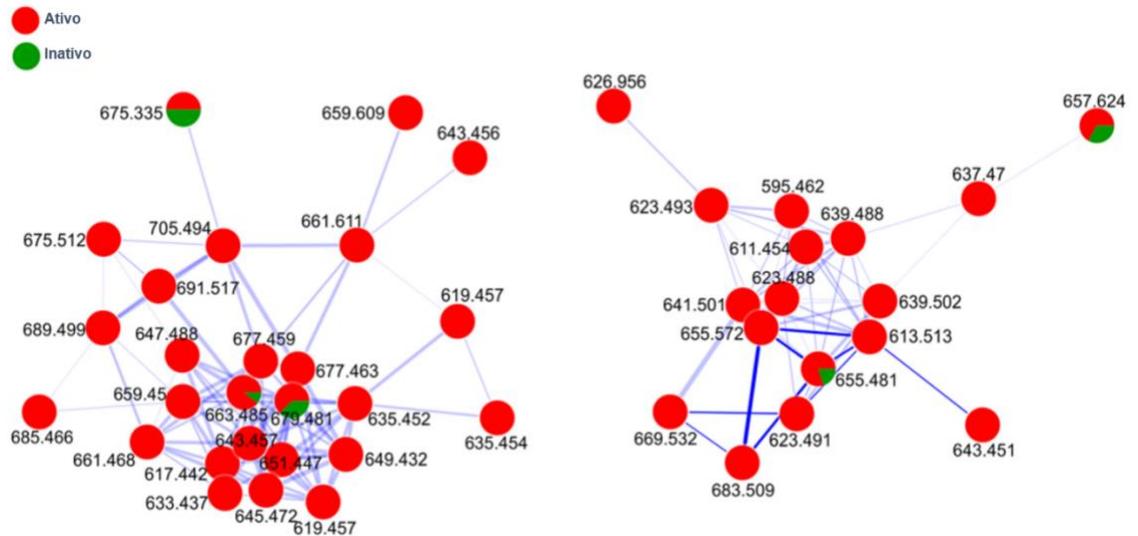


Figura 9 - Os dois clusters gerados a partir de análise na base de dados dos perfis de fragmentação dos principais compostos ativos. Fonte: Demarque et al., 2020 (147).

Em um estudo realizado e publicado anteriormente a este trabalho, 34 extratos da família Annonaceae, incluindo o utilizado na realização deste trabalho, foram submetidos a análise em HPLC-MS/MS, formatados e processados na plataforma GNPS para desreplicação, onde foram reveladas as principais classes dos compostos ativos presentes em extratos dessa família, com destaque a classe dos diterpenos. Esse estudo demonstrou mais uma vez a vantagem da utilização desses recursos para determinar os extratos mais promissores para obtenção de compostos inéditos e/ou com atividade inédita (148).

Tendo em vista os resultados supracitados, o extrato hexânico da madeira do caule de *A. crassiflora* foi submetido ao isolamento bioguiado para confirmar a classe dos compostos ativos indicados pelas análises quimiométricas. Primeiramente, o extrato foi particionado em fase sólida utilizando cartuchos de sílica (SPE-sílica) e três sistemas

eluentes (hexano-**A**, acetato de etila-**B** e metanol-**C**), essas duas últimas pré-frações foram testadas (125 µg/ mL) e a fração acetato de etila (**B**) apresentou a maior atividade (92,5% de mortalidade em 48 horas). A fração **B** foi submetida a purificação em coluna cromatográfica de sílica, e as frações obtidas foram analisadas por HPLC analítico, resultando, segundo perfis químicos observados, em 7 novas frações (**B1-7**). A fração **B7** apresentou a maior atividade larvicida (92,5% de mortalidade em 48 horas) e foi submetida a purificação por Sephadex® LH-20 (Metanol) resultando em 6 novas frações (**B7.1 - 7.6**), testadas em larvas e analisadas em HPLC analítico. A fração **B7.2** (97,5% de mortalidade em 48 horas) foi submetida a separação em HPLC-preparativo resultando em 4 frações (**B7.2.1; B7.2.2; B7.2.3; B7.2.4**). Devido à alta complexidade dessas frações não foi possível realizar o isolamento (Figura 10), no entanto, foi possível identificar os compostos presentes nessas misturas através de análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (*HRMS*) (apêndice A) e como indicado pelas análises quimiométricas, tratavam-se de acetogeninas. Essas frações foram testadas em larvas e os valores de LC_{50} estabelecidos (tabela 4) (147).

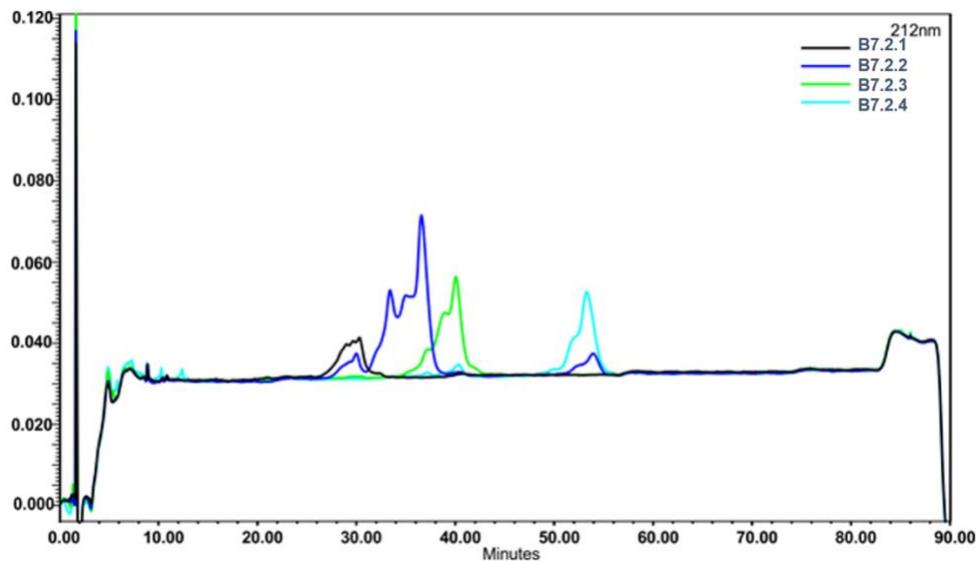


Figura 10 - Cromatograma (212 nm) das acetogeninas em mistura. Adaptado de Dermaque et al., 2020 (147).

As acetogeninas são compostos secundários derivados de ácidos graxos de cadeia longa, de origem policetídica, presentes em plantas da família Annonaceae e encontrados em diversos gêneros como: *Annona*, *Asimina*, *Uvaria*, *Rollinia* e *Goniothalamus* (Figura 11). São compostos de cadeia longa (C35-39) que possuem anel gama- lactônico terminal saturado ou insaturado, além de anéis de tetrahydrofurano (THF) e grupos funcionais oxigenados (147,152,153). As acetogeninas são classificadas de acordo com a quantidade e o tipo de anel; e conforme a natureza do anel lactônico terminal (152). Neste estudo, foram encontradas acetogeninas com anel lactônico terminal do tipo γ - lactona α,β -insaturada, do tipo A- mono THF, B- bis THF com subtipo 1a- sem substituição em C4 e 1b- grupo hidroxila em C4 (147,154).

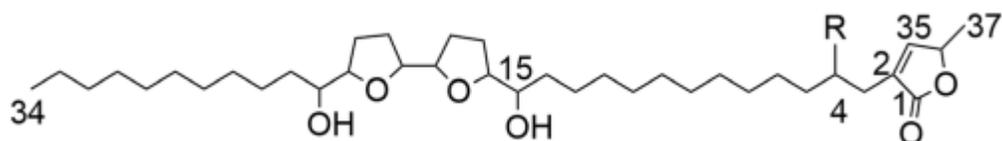


Figura 11 - Exemplo da estrutura química de uma acetogenina. R=H, subtipo 1a annonacina; R=OH, subtipo 1b esquamocina. Fonte: Dermaque et al., 2020 (147).

Tabela 4 – Frações ao fim do fracionamento do extrato de *A. crassiflora*, acetogeninas identificadas pelas análises de RMN e valores de LC₅₀ de cada fração.

Frações	Acetogeninas Dados de massas			LC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	Fórmula	m/z	Erro (ppm)	
B7.2.1	C ₃₇ H ₆₆ O ₈ +Na ⁺	661,4636	2,9	10,4
	C ₃₇ H ₆₆ O ₉ +Na ⁺	677,4570	5,1	
	C ₃₇ H ₆₆ O ₈ +Na ⁺	661,4631	3,6	
B7.2.2	C ₃₅ H ₆₄ O ₈ +Na ⁺	635,4476	3,6	9
	C ₃₇ H ₆₈ O ₉ +Na ⁺	679,4760	0,1	

	$C_{35}H_{64}O_8+Na^+$	635,4493	0,9	
	$C_{37}H_{66}O_7+Na^+$	645,4695	1,7	
B7.2.3	$C_{35}H_{62}O_7+Na^+$	617,4386	1,1	3,7
	$C_{37}H_{66}O_8+Na^+$	663,4792	3,0	
	$C_{39}H_{70}O_9+Na^+$	705,4895	3,2	
B7.2.4	$C_{37}H_{66}O_8+Na^+$	663,4788	3,6	6,4

A acetogenina $C_{37}H_{66}O_8+Na^+$ indicada como o composto mais importante na diferenciação entre os grupos (*VIP SCORE*) (figura 8) foi identificada nas frações, juntamente com com outros dois compostos indicados por essa mesma análise, $C_{37}H_{66}O_9+Na^+$ e $C_{39}H_{70}O_9+Na^+$. Portanto, a utilização das técnicas quimiométricas, além de estabelecer informações importantes sobre a classe dos compostos ativos, pode ser utilizada como estudo antecedente ao isolamento clássico fornecendo informações químicas relevantes sobre os componentes ativos, como *m/z* e tempo de retenção (147).

A atividade larvívica de acetogeninas de Annonaceae em *Ae. aegypti* já foi relatada na literatura. Essa atividade foi atribuída à capacidade desses compostos de inibirem a respiração celular no complexo I (NADH: *ubiquinona oxidoreductase*), resultando em apoptose (152,153,155).

A esquamocina, uma acetogenina bis-THF, apresentou atividade larvívica em *Ae. aegypti* provocando alterações morfológicas e fisiológicas em diferentes células do intestino e nas papilas anais de larvas L3. Esses diferentes mecanismos de ação favorecem a utilização desse composto, uma vez que retarda o surgimento de mecanismos de resistência (156,157). E quando avaliada a atividade desse composto em predadores não-alvo e leucócitos humanos, foi observada atividade seletiva em larvas de *Ae. aegypti* (153). Uma outra acetogenina, annonacina (mono-THF hidroxila em C4) também apresentou atividade larvívica em *Ae. aegypti* (158).

Embora as acetogeninas apresentem potencial atividade larvicida, essas são também conhecidas pela citotoxicidade em linhagens neoplásicas, e com mecanismo de ação desconhecido, representando desafio em sua utilização para possível desenvolvimento de drogas antitumorais (152,159,160). A literatura relata ainda que, o alto consumo de chás e frutas de espécies de Annonacea pode estar ligado a distúrbios neurodegenerativos por inibição do complexo mitocondrial I (159). Portanto, a utilização desses compostos no controle do vetor deve ser bem avaliada e diferentes testes toxicológicos devem ser realizados.

No entanto, os resultados descritos corroboram com o objetivo principal estabelecido de identificar compostos da família Annonaceae com atividade em larvas de *Ae. aegypti*. Além disso, esse trabalho serviu de modelo para outras pesquisas realizadas pelo grupo de trabalho com a utilização de técnicas estatísticas para observar a diferenciação química de amostras ativas e inativas, e determinar os principais compostos responsáveis por essa diferenciação, para então realizar o isolamento desses compostos utilizando técnicas clássicas. Esse modelo publicado em 2020 (147) tem atualmente 12 citações.

3.4.2 *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart.- uso de métodos clássicos para isolamento

A atividade larvicida dos extratos de *X. aromatica* pertencentes ao Banco de Extratos de Plantas do bioma Cerrado (Laboratório de Farmacognosia, UnB), foi avaliada, resultando na seleção de dois extratos ativos: etanólico da madeira da raiz (Arbo0064) e hexânico das folhas (Arbo0071) (tabela 5).

Tabela 5 - Extratos de *X. aromatica* pertencentes ao Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado e seus valores de mortalidade em 24 horas em larvas L3 de *Ae. aegypti* (testados a 250 µg/ mL).

Código da amostra	Droga vegetal	Solvente	Mortalidade (%) ¹
Arbo0063	Madeira da raiz	Hexano	0

Arbo0064	Madeira da raiz	Etanol	85
Arbo0065	Casca da raiz	Hexano	0
Arbo0066	Casca da raiz	Etanol	0
Arbo0067	Madeira do caule	Etanol	2,5
Arbo0068	Madeira do caule	Etanol	0
Arbo0069	Madeira do caule	Hexano	0
Arbo0070	Folha	Etanol	5
Arbo0071	Folha	Hexano	85

¹Dados de mortalidade em 24 horas.

O extrato hexânico da folha de *X. aromatica* (Arbo0071) foi escolhido para realização desse estudo, tendo em vista a maior disponibilidade em massa desse extrato. O extrato foi particionado em cartuchos de SPE-Diol utilizando três sistemas eluentes, hexano (**A**), acetato de etila (**B**) e metanol (**C**). Foi realizado o teste larvicida dessas pré-frações na concentração de 125 µg/mL e avaliado os rendimentos. A pré-fração **B**, apresentou o maior rendimento e foi a única pré-fração ativa (tabela 6) (149).

Tabela 6 - Mortalidade e rendimento de cada pré-fração obtida no fracionamento do extrato hexânico de *X. aromatica*.

Pré-fração	Mortalidade (%; 24 horas)	Rendimento (%)
A	2,5	7,6
B	25	80,4
C	2,5	2,4

A= pré-fração hexano, **B**= pré-fração acetato de etila, **C**= pré-fração metanol. Fonte: Grossi SM, 2018 (149).

A pré-fração **B** foi submetida a fracionamento em coluna Sephadex[®] LH-20, onde foram coletadas 357 frações, posteriormente combinadas em 12 frações (**B1-B12**) de acordo com perfil apresentado em Cromatografia em Camada Delgada (CCD). O teste larvicida indicou que as frações **B2** e **B3** foram as mais ativas, no entanto apenas a fração

B3 foi escolhida para dar continuidade ao fracionamento, uma vez que foi mais ativa e apresentou maior rendimento (figura 12) (149).

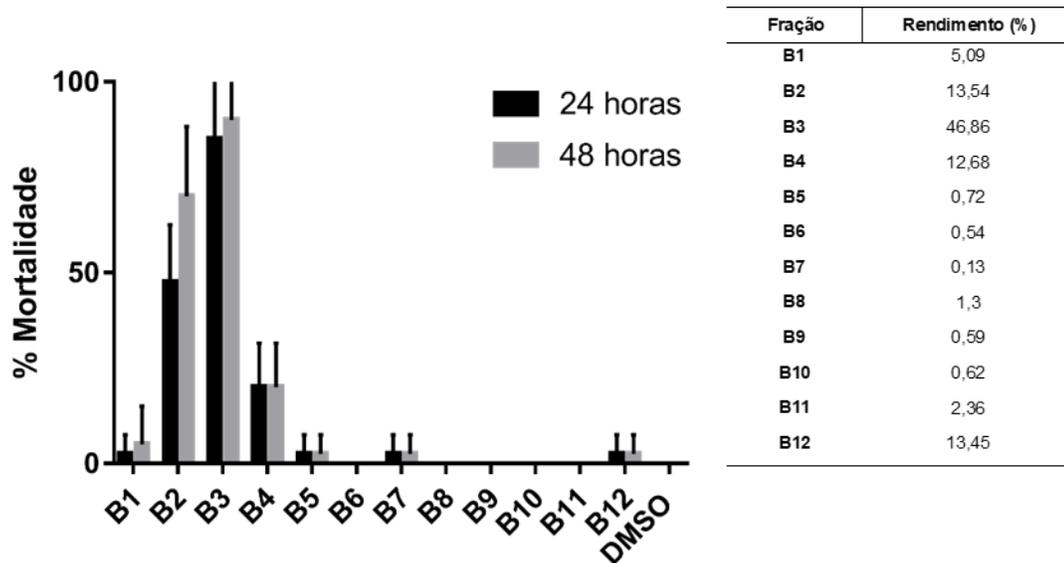


Figura 12 - Atividade larvicida em *Ae. aegypti* das frações obtidas na coluna de Sephadex® LH-20 testadas a 125 µg/ mL. Fonte: Grossi SM, 2018 (149).

Foi realizada coluna de sílica para fracionamento da fração **B3**, este procedimento resultou na obtenção de outras 7 frações, **B3.1**, **B3.2**, **B3.3**, **B3.4**, **B3.5**, **B3.6** e **B3.7**, sendo a fração **B3.2** mais ativa e com maior rendimento (figura 13). Portanto, seu perfil cromatográfico foi avaliado em HPLC analítico que revelou a presença de um único pico (figura 14) (149).

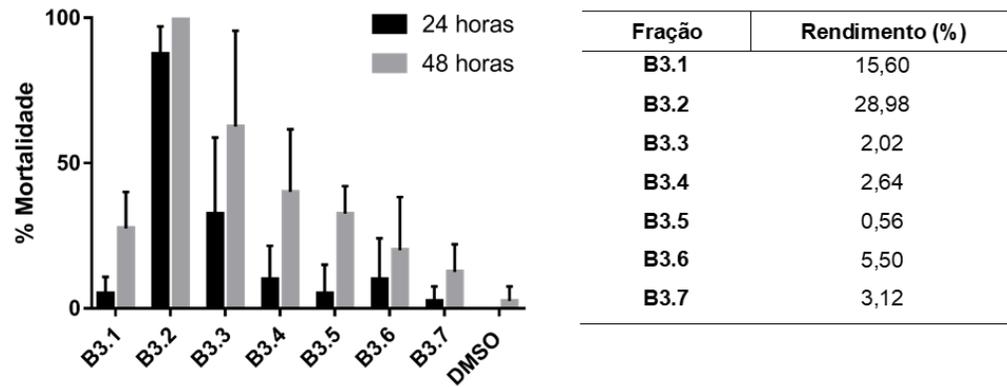


Figura 13 - Atividade larvicida em *Ae. aegypti* das frações obtidas na coluna de sílica testadas a 125 µg/mL e o rendimento de cada uma delas. Fonte: Grossi SM, 2018 (149).

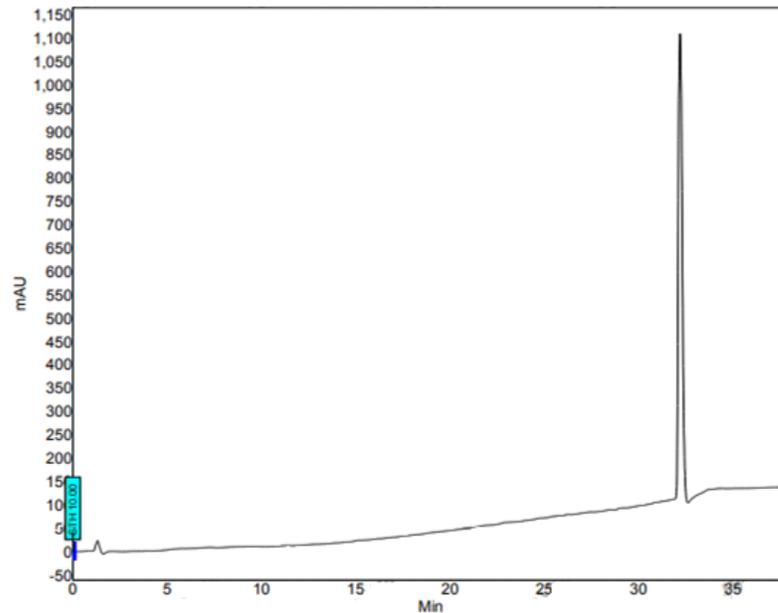


Figura 14 - Cromatograma da fração **B3.2** obtido em HPLC analítico. Fonte: Grossi SM, 2018 (149).

Tendo em vista o perfil cromatográfico da fração **B3.2**, esta foi preparada e analisada em espectrometria de massas no modo negativo de ionização resultando em

uma m/z de 301,2157 ($\pm 3,5$ ppm) compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{29}O_2$ [M-H]⁻ (Figura 15) (149).

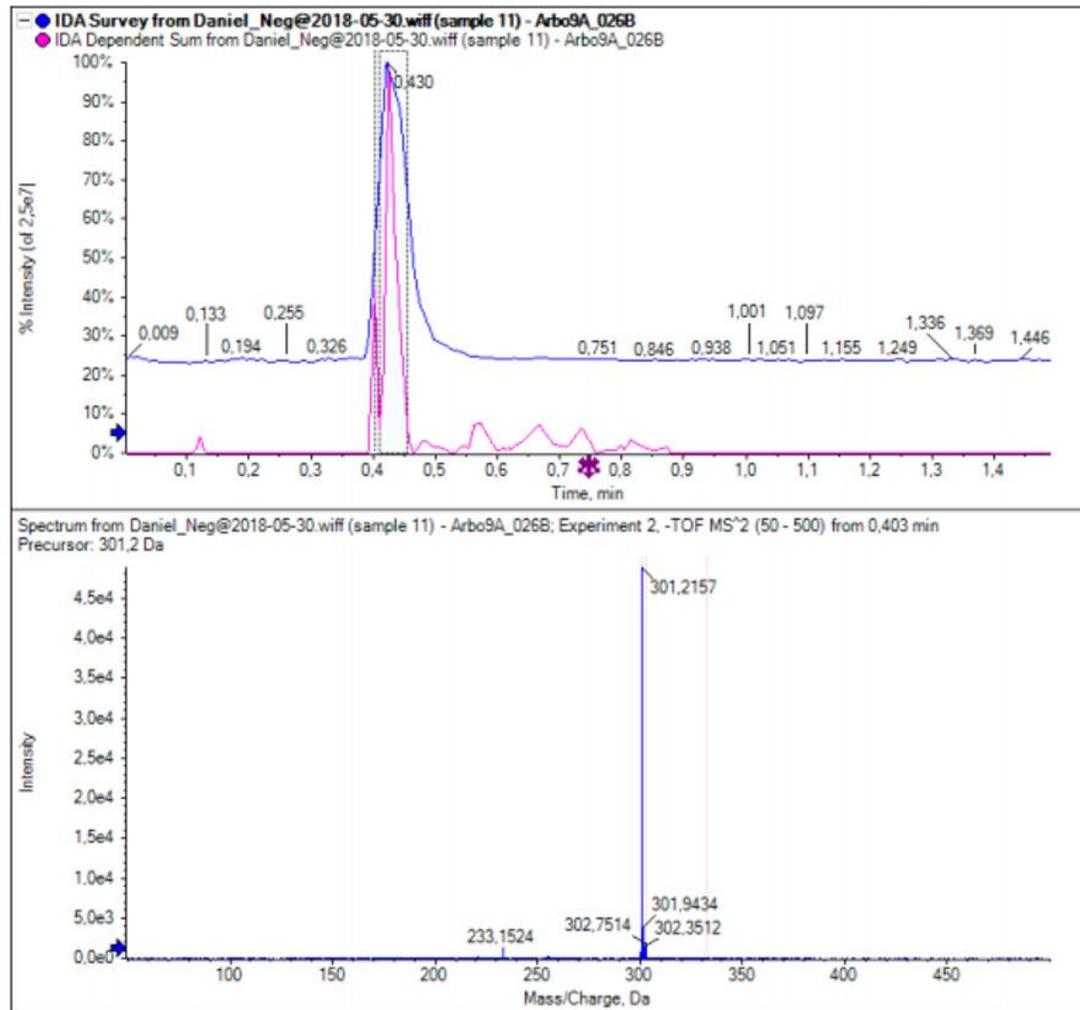


Figura 15 – Espectro de massas obtido a partir da infusão direta da fração **B3.2**. Fonte: Grossi SM, 2018 (149).

Obtida a massa e a provável fórmula molecular da substância com atividade larvídica presente no extrato de *X. aromatica*, foram realizadas análises de RMN (1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC, DEPT135Q), que juntamente com dados da literatura foi possível constatar que o composto ativo e isolado era um diterpeno labdano conhecido como

Ácido entlabda-8(17),13(16),14-trien-18-óico (Ácido Isoóxico), composto **1** (figura 16, tabela 7 e apêndice B) (134,149).

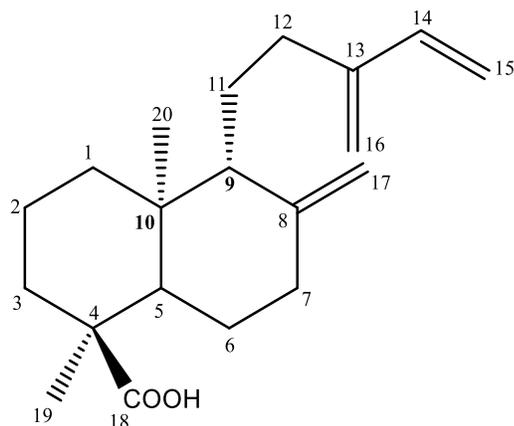


Figura 16 - Fórmula molecular composto **1**, ácido entlabda-8(17),13(16),14-trien-18-óico (C₂₀H₃₀O₂).

Tabela 7 - Dados de RMN ¹³C do composto **1** isolado (**B3.2**) comparado com dados da literatura.

C	Composto 1* δ (150 MHz)	Ácido entlabda-8(17),13(16),14-trien-18-óico* (134) δ (50 MHz)
1	37,8	37,8
2	18,4	18,4
3	37,1	37,1
4	47,5	47,5
5	49,5	49,5
6	26,8	26,8
7	37,9	37,8
8	147,8	147,8
9	56,4	56,4

10	38,8	38,8
11	22,1	22,1
12	30,1	30,1
13	146,9	146,9
14	139,0	139,0
15	113,2	113,2
16	115,6	115,6
17	107,0	107,0
18	185,3	185,3
19	16,3	16,3
20	14,8	14,7

*Os experimentos foram realizados utilizando o solvente CDCl_3 . **C**= carbono; δ = deslocamento químico. Fonte: Grossi SM, 2018 (149).

Foram obtidos 156 mg do ácido isolado (149) Visando obter maior quantidade do composto para realização dos testes biológicos (LC_{50} e toxicidade) foi realizado escalonamento que resultou na obtenção de 655,4 mg do mesmo composto e no isolamento de um sesquiterpeno conhecido como Espatuleno (composto **2**), porém em menor quantidade 13,3 mg (figura 17 e tabela 8) (161).

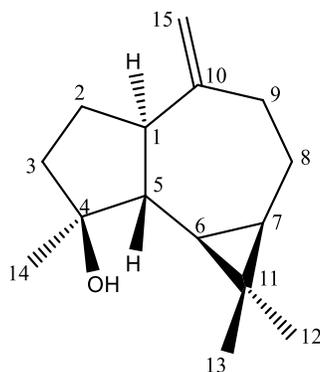


Figura 17 - Fórmula molecular composto **2**, espatulenol (C₁₅H₂₄O).

Tabela 8 - Dados de RMN ¹³C do composto **2** isolado, comparado com dados da literatura

C	Composto 2* δ (150 MHz)	Espatulenol* (161) δ (50 MHz)
1	54,3	54,3
2	26,7	26,7
3	41,7	41,7
4	81,0	80,9
5	53,4	53,3
6	29,7	29,9
7	27,4	27,4
8	24,7	24,8
9	38,8	38,8
10	153,4	153,4
11	20,2	20,2
12	28,6	28,6

13	16,3	16,2
14	26,0	26,0
15	106,2	106,2

* Os experimentos foram realizados utilizando o solvente CDCl₃. **C**= carbono; **δ** = deslocamento químico

A atividade larvicida desses compostos foi avaliada na concentração de 25 µg/mL, no entanto apenas o composto **1** foi ativo (tabela 9). Assim, também foi avaliada a atividade pupicida, porém em todas as leituras realizadas, 24 e 48 horas, não foi observada nenhuma mortalidade.

Tabela 9 -. Atividade larvicida dos compostos **1** e **2** testados a 25 µg/mL, em larvas de *Ae. aegypti*.

Composto	Mortalidade (média em %; 24 horas)	Mortalidade (média em %; 48 horas)
Ácido entlabda-8(17),13(16),14-trien-18-óico	10	10
Espatuleno	0	0

Considerando a atividade larvicida apresentada pelo extrato (tabela 5) e pelo composto **1** (tabela 9), foram determinados os valores de LC₅₀ (figura 18 e tabela 10).

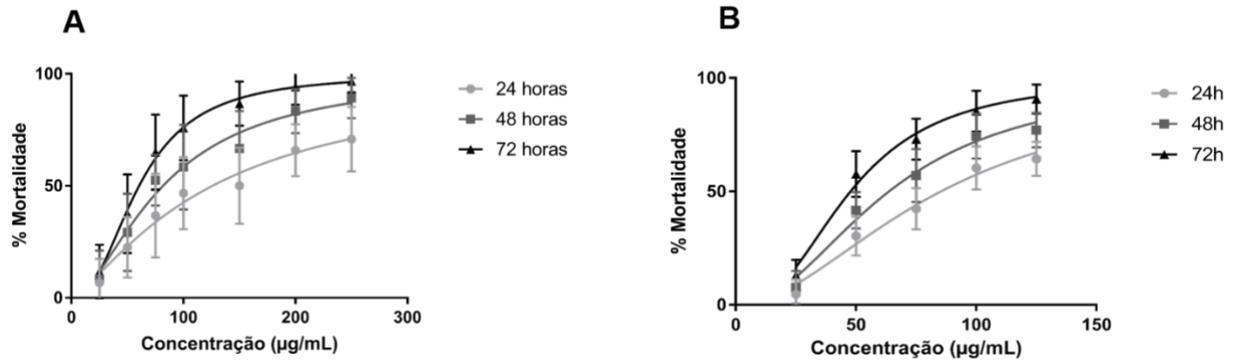


Figura 18 - Curva dose-resposta. **A**: valores do extrato bruto hexânico das folhas de *X. aromatica*. **B**: valores do composto 1. Fonte: Fonte: Grossi SM, 2018 (149).

Tabela 10 - Valores de LC₅₀ (µg/mL) do extrato bruto hexânico da folha de *X. aromatica* e do composto 1.

Amostras	LC ₅₀ (24 horas)	LC ₅₀ (48 horas)	LC ₅₀ (72 horas)
Arbo0071 ¹	125,9	81,8	60,46
Composto 1	85,3	63,68	47,7

¹ Extrato bruto hexânico da folha de *X. aromatica*.

A partir dos valores de LC₅₀ do extrato e do composto 1, pode-se observar que ambos são dose e tempo de exposição dependente. Além disso, a comparação dos resultados indica que o composto isolado é responsável pela atividade larvicida do extrato, uma vez que quando isolado a taxa de mortalidade é superior (148).

Tendo em vista a atividade do composto 1 e seu valor de LC₅₀, foi realizado teste para avaliação da toxicidade em peixe-zebra. A realização de testes de toxicidade utilizando peixe-zebra representa uma vantagem, uma vez que esses organismos apresentam rápido desenvolvimento embrionário, são transparentes, o que permite fácil observação sem necessidade de utilização de técnicas invasivas. São testes facilmente reproduzíveis, de fácil manutenção e de fácil reprodutibilidade, e principalmente, são organismos que possuem cerca de 70% de homologia com genoma humano (162). O

composto **1** apresentou alta atividade tóxica, com 100% de mortalidade em todas concentrações testadas.

O composto **1**, também conhecido como Ácido Isoozico, é um diterpeno com esqueleto labdano encontrado como metabólito secundário em outras espécies e família de plantas, como na família Fabaceae em diferentes espécies de *Hymenaea*, *H. courbaril* L. (163) e *H. Stigonocarpa* Mart. ex Hayne (164), na família Cupressaceae, *Callitris endlicheri* (Parl.) F.M. Bailey (165). Para o extrato da cascas *H. courbaril* foi realizado teste tripanocida *in vitro*, que revelou atividade potencial desse composto (166).

O primeiro relato da presença desse ácido em *X. aromatica* ocorreu em 1999 (134) e até o momento não foi relatada atividade em *Ae. aegypti*. Portanto, esse estudo representa a primeira avaliação da atividade larvicida do Ácido Isoozico e a primeira avaliação da toxicidade em organismos não-alvo. Os resultados aqui apresentados revelaram que devido à toxicidade observada em peixes-zebra, atividade larvicida não é seletiva, o que torna a utilização desse composto no combate ao vetor uma desvantagem, uma vez que apresenta riscos.

Embora, a atividade tóxica apresentada por esse composto represente uma desvantagem em sua utilização, a alta quantidade isolada, a facilidade na extração e a presença de um grupamento carboxila tornam favorável a realização de novas pesquisas visando o desenvolvimento de compostos semissintéticos a partir do ácido isoozico (composto **1**), buscando proporcionar maior atividade e seletividade aos compostos gerados. Portanto, torna-se interessante a obtenção de uma amida a partir da condensação com uma amina, tendo em vista a ampla atividade biológica apresentada por essa classe de compostos (167–169) (figura 19).

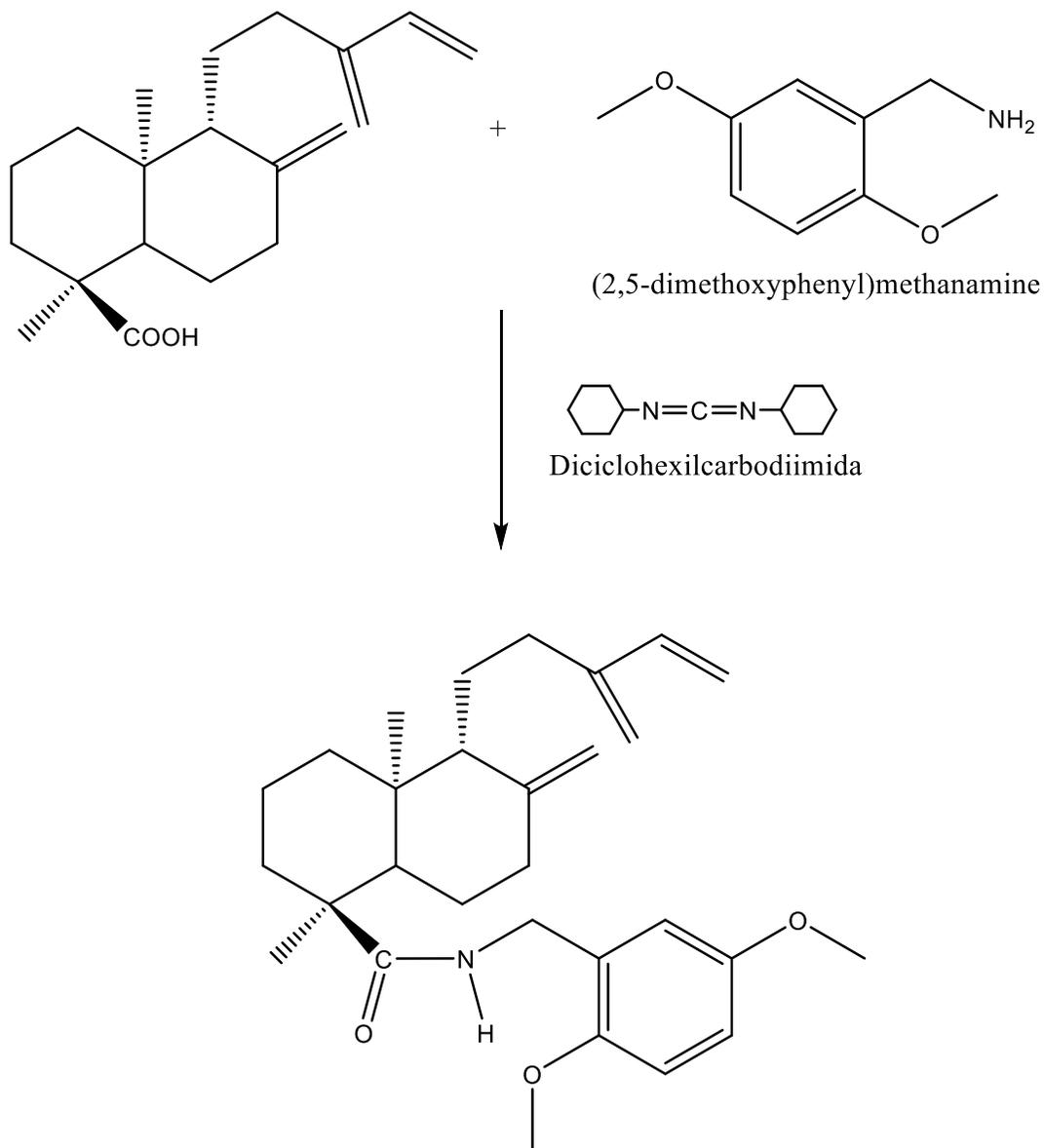


Figura 19- Esquema reacional proposto para realização de uma semissíntese a partir do composto 1. Método de semissíntese adaptado de Demarque e Merten, 2017 (170).

O composto 2, conhecido como Espatulenol é um sesquiterpeno presente em óleos essenciais de diversas espécies (164,171,172). A presença desse composto em óleos essenciais de *X. aromatica* já foi relatada e o óleo da folhas apresentou potencial atividade antimicrobiana (131). Estudos de óleos essenciais contendo alta quantidade desse composto revelaram diferentes atividades biológicas, como anti-inflamatória, antimicrobiana, antiproliferativa e até mesmo repelente contra *Ae. aegypti* e *Anopheles*

stephensi. Ainda, quando isolado o Espatulenol, apresentou atividade antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa e antimicobacteriana (173). Embora em muitos estudos a atividade larvívica de óleos essenciais seja relacionada à alta concentração desse composto (163,174–176), nosso estudo permitiu evidenciar que isoladamente o Espatulenol (composto **2**) testado a 25 µg/mL não apresentou atividade em larvas L3 de *Ae. aegypti*. No entanto, a baixa quantidade obtida, não permitiu a realização de outros testes em concentrações maiores.

3.5 CONCLUSÃO

3.5.1 *Annona crassiflora* Mart.- análises quimiométricas

Este trabalho representa o primeiro estudo encontrado na literatura utilizando técnicas quimiométricas baseadas em dados de HPLC-MS/MS, para identificar os compostos responsáveis pela atividade larvívica de extratos de *A. crassiflora*. Para esse estudo, uma única aquisição de dados foi realizada e analisada em diferentes plataformas (MetaboAnalyst e GNPS).

As técnicas quimiométricas empregadas foram importantes na identificação dos compostos diferenciadores das pré-frações com atividade larvívica em *Ae. aegypti*, embora as amostras apresentassem perfil químico complexo. As análises estatísticas quimiométricas, associadas ao processo de desreplicação utilizando o banco de dados GNPS, revelaram que esses compostos diferenciadores pertenciam à classe das acetogeninas. Esse resultado foi confirmado pelo isolamento clássico, onde cinco dos compostos anotados a partir do GNPS foram isolados em forma de mistura.

A atividade larvívica de acetogeninas em *Ae. aegypti* não representa um resultado inovador, uma vez que são encontrados estudos na literatura. Todavia, comprovada a

eficácia da utilização de técnicas quimiométricas, essa linha de trabalho inspirou o desenvolvimento de outros projetos do laboratório (177,178), que utilizaram essas técnicas para aprimorar e acelerar a identificação de compostos com atividade em *Ae. aegypti*. Além disso, esse modelo publicado em 2020 parece inspirar outras pesquisas (12 citações em 1 ano). A realização de estudos de compostos naturais utilizando essas técnicas torna-se vantajosa uma vez que acelera o processo de identificação, determina os extratos de maior interesse de pesquisa, reduz custos, além de evitar a realização de trabalhos exaustivos e já conhecidos.

3.5.2 *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart.- uso de métodos clássicos para isolamento

O isolamento bioguiado do extrato hexânico da folha de *X. aromatica* utilizando métodos clássicos resultou na obtenção de dois compostos terpênicos, Ácido Isoozico e Espatuleno.

Este estudo representa a primeira identificação da atividade do Ácido Isoozico em larvas L3 de *Ae. aegypti* e o primeiro relato da atividade tóxica em peixes-zebra. Embora a atividade tóxica inviabilize a utilização desse composto no combate ao vetor, a realização de semissínteses é favorecida tendo em vista a alta quantidade de composto isolado, facilidade do isolamento e características estruturais. Portanto, novas pesquisas a partir desse ácido devem ser desenvolvidas para encontrar compostos ativos no organismo-alvo e ambientalmente seguros.

Na literatura são relatadas atividades em *Ae. aegypti* de óleos essenciais ricos em Espatuleno. No entanto, este estudo representa a primeira avaliação deste composto em larvas L3 de *Ae. aegypti*, apesar deste não ter apresentado atividade larvicida na concentração testada. Ressalta-se que quantidade insuficiente obtida do composto não permitiu a realização de testes em concentrações maiores, portanto a possível atividade não deve ser descartada e novos testes devem ser realizados.

4 CAPÍTULO 2 – DOCKING MOLECULAR NO ESTUDO DE AMIDAS COM POTENCIAL ATIVIDADE EM *Ae. aegypti*

4.1 INTRODUÇÃO

O controle de arboviroses, como dengue, Zika e chikungunya, é realizado principalmente por inseticidas químicos, no entanto, a alta prevalência de populações de mosquitos resistentes a esses produtos representa um desafio ao controle dessas doenças (14). Os dois principais mecanismos de resistência são resistência metabólica e resistência do sítio-alvo (10).

A resistência do sítio-alvo ocorre devido a mutações nos sítios de ligação das proteínas alvo, resultando na diminuição da afinidade do receptor pelo inseticida e consequentemente levando à resistência (21,179). Esse tipo de resistência ocorre nos canais de sódio dependentes de voltagem e é conhecida como resistência de knockdown. Exemplos desse mecanismo de resistência é o que ocorre com os inseticidas DDT e piretroides (21). A resistência metabólica ocorre devido ao aumento da atividade de enzimas de desintoxicação, que podem atuar no metabolismo, no sequestro e na excreção de inseticidas. Esse mecanismo é responsável pela resistência a organofosforados, piretróides e organoclorados (14,21).

A glutathione S-transferase é uma importante família de enzimas de desintoxicação, são capazes de catalisar a conjugação da glutathione com compostos lipofílicos, o que altera sua solubilidade, facilitando sua excreção (180). A desintoxicação do DDT, gerada por enzimas dessa família, ocorre devido a reações de desidrocloração, que geram metabólitos menos tóxicos (181). Reações de conjugação da glutathione com organofosforados catalisadas por essas enzimas também são responsáveis pela desintoxicação desses inseticidas pelos insetos. Em relação aos piretróides, essas enzimas não atuam diretamente no seu metabolismo, mas por desintoxicação de

produtos de peroxidação lipídica induzida por esses inseticidas, e também por sequestro desses compostos (181,182).

Essas enzimas são classificadas em três grupos principais conforme sua localização dentro da célula: citosólicas, microssomais e mitocondriais. Nos mosquitos, são encontradas apenas enzimas citosólicas e microssomais (183). No entanto, as enzimas microssomais não interferem no metabolismo de inseticidas (181). Existem seis classes de enzimas citosólicas encontradas em insetos: Sigma, Delta, Theta, Omega, Zeta e Epsilon (180,184). Sendo Delta e Epsilon específicas de artrópodes (180). As enzimas Epsilon desempenham um importante papel na desintoxicação desses insetos (185).

Tendo em vista que a resistência impacta diretamente no controle das arboviroses (21), diferentes pesquisas envolvendo compostos naturais e sintéticos visam desenvolver novos inseticidas que sejam capazes de superar esses mecanismos de resistência (186–188). Neste sentido, a utilização de técnicas computacionais para triagem virtual de potenciais compostos utilizando *docking* molecular representa uma importante ferramenta no desenvolvimento de novos inseticidas, uma vez que permite prever as possíveis interações entre diferentes compostos e receptores do inseto (189,190).

Sendo assim, foi realizado um estudo de triagem virtual por *docking* molecular utilizando amidas sintéticas e naturais, considerando a ampla atividade pesticida apresentada por essa família de compostos (167–169,191,192). Primeiramente foi avaliada a afinidade desses compostos frente a uma importante enzima de desintoxicação relacionada à resistência a inseticidas químicos, a glutathione S-transferase Epsilon 2 de *Ae. aegypti* (*AaGSTE2*) (193). As amidas que apresentaram baixa afinidade a esta enzima foram avaliadas frente a três outros alvos moleculares de *Ae. aegypti*, utilizando novamente o *docking* molecular.

4.2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo utilizar o *docking* molecular como ferramenta para determinar as amidas promissoras no controle do vetor *Aedes aegypti*.

4.2.1 Objetivos específicos

- Realizar triagem das amidas obtidas por avaliação da afinidade pelo sítio de ligação da AaGSTE2
- Avaliar a afinidade das amidas restantes nos sítios das enzimas alvo: AaAChE1, AaFKBP12 e AamJHBP
- Avaliar a afinidade a AaGSTE2, AaAChE1, AaFKBP12 e AamJHBP dos inseticidas sintéticos: Malation, Temefós, DEET e Transflutrina
- Determinar as amidas mais promissoras para o controle do mosquito
- Destacar a interação intermolecular entre as amidas promissoras (aquelas que apresentaram baixa afinidade a enzima de desintoxicação AaGSTE2 e alta afinidade aos demais alvos avaliados) e o sítio alvo das três enzimas

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Preparação das amidas

Para determinar as amidas utilizadas no presente estudo, foi realizada pesquisa no Banco de dados ChemBL, utilizando a palavra-chave "Amide". Todos os SMILES de amidas encontradas foram baixados e utilizados para desenho das estruturas químicas no software Standardizer da ChemAxon®, adicionando-se os hidrogênios explícitos,

aromaticidade, retirando-se os sais e realizando-se clean 2D e 3D. As estruturas desenhadas foram salvas em um diretório no formato .sdf*.

4.3.2 Preparação dos compostos padrão

No banco de dados de química PubChem foram obtidas as estruturas químicas dos compostos utilizados como padrão (inseticidas comerciais: Malation, Temefós, DEET e Transflutrina). As energias de todos os compostos foram minimizadas utilizando o software BIOVIA Discovery Studio[®] e, posteriormente, salvas no formato .sdf*.

4.3.2.1 Preparação da macromolécula

As enzimas glutathione S-transferase (AaGSTE2) (ID PDB: 5FT3), Acetilcolinesterase 1 de *Ae. aegypti* (AaAChE1) (ID PDB: 5FUM), isomerase FKBP12 de *Ae. aegypti* (AaFKBP12) (ID PDB: 3UQI) e a proteína de ligação odorante (OBP) de *Ae. aegypti* (AmJHBP) (ID PDB: 5V13) foram recuperadas no *Protein Data Bank* – PDB. Todos os ligantes, íons e moléculas de água foram removidos por meio do software BIOVIA Discovery Studio[®].

4.3.3 Triagem virtual e *docking* molecular

A primeira etapa da triagem virtual foi realizada na enzima glutathione S-transferase (AaGSTE2), como estratégia de triagem de amidas que possam escapar do mecanismo de resistência inseticida atribuído a essa enzima. A triagem foi realizada utilizando o

software *Molegro Virtual Docker*[®] versão 6.0.1 (MVD). O sítio de ligação da enzima foi definido através das interações moleculares entre o ligante co-cristalizado (Glutathione) e os resíduos de aminoácidos. O *grid* foi ajustado de modo a englobar todo o sítio ativo. Os resultados obtidos em valores de energia de ligação (KJ.mol^{-1}) passaram por consenso e as amidas foram selecionadas de acordo com as poses de consenso acima de 10, o que caracteriza pouca ou nenhuma afinidade.

As amidas que apresentaram a menor afinidade com a enzima *AaGSTE2* foram submetidas então a novo *docking* molecular com as enzimas de interesse: *AaAChE1*, *AaFKBP12* e *AmJHBP*. Todo o processo de definição de sítio ativo e *grid* foi análogo ao anterior. As amidas selecionadas nessa etapa foram as que apresentaram melhor média de consenso (menor que zero).

4.3.3.1 Análise consenso

A análise de consenso foi realizada através do método da média das pontuações em escala automática (AASS) (194), onde todos os valores de energias de ligação obtidos para cada enzima foram normalizados dividindo-se os valores de energia de ligação de cada molécula ancorada pelo menor valor de energia presente entre eles. Após a normalização, foi realizada a média entre os valores de energia obtidos em três funções de pontuação distintas do MVD (GPU score, Moldock score e Rerank score) e multiplicado por -1 para gerar valores de consenso positivo em caso de afinidade ruim e valores negativos em caso de boa afinidade. Os compostos foram triados, selecionados e ranqueados em função da média consenso.

4.3.3.2 Ilustrações

As ilustrações das interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos foram realizadas através do MVD.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na pesquisa realizada no Banco de dados ChemBL foram encontradas 28.691 SMILES de amidas, que foram desenhadas e avaliadas primeiramente pela afinidade à enzima *AaGSTe2* (figura 20). O intuito desta avaliação foi descartar aqueles que apresentaram afinidade a essa enzima e que portanto, conseqüentemente, não seriam eficientes no controle do vetor, uma vez que são enzimas envolvidas no desenvolvimento de resistência metabólica e poderiam levar à rápida resistência cruzada (181,195).

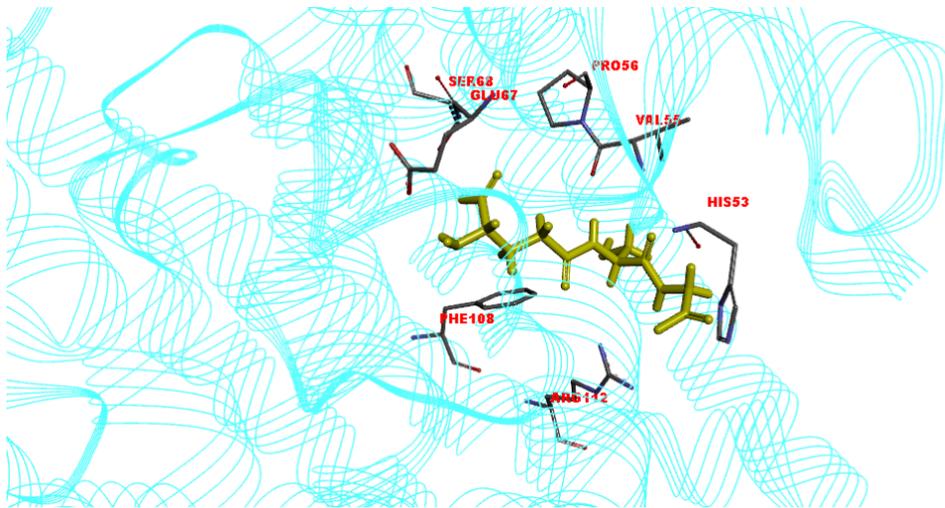
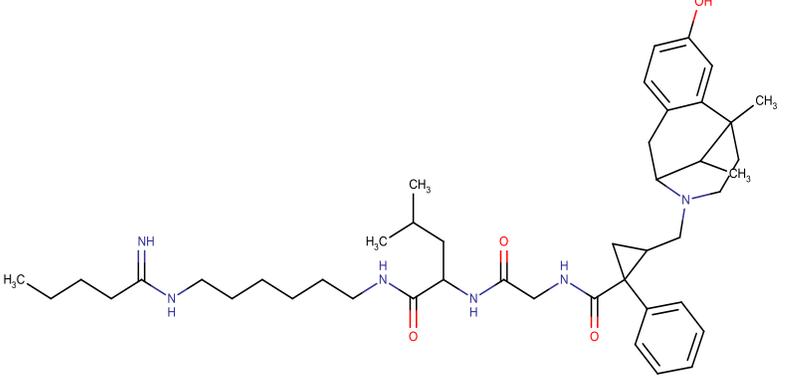
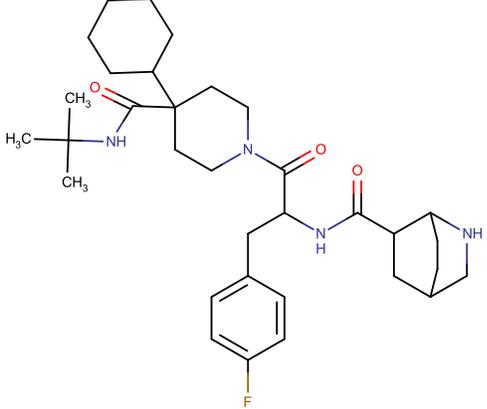
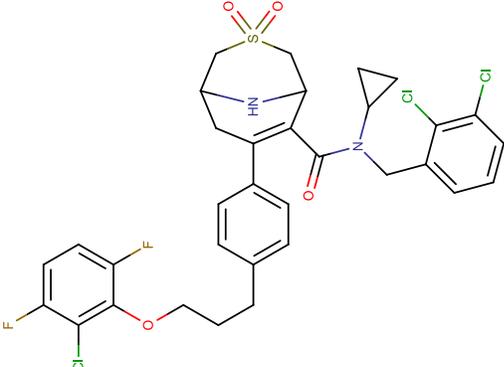


Figura 20 - Sítio de ligação da AaGST do tipo épsilon 2 (*AaGSTe2*) (Resíduos: PRO56, VAL55, HIS53, SER58, GLU67, PHE108 e ARG112). (Imagem gerada utilizando o software Molegro Virtual Docking) (ID PDB: 5FT3).

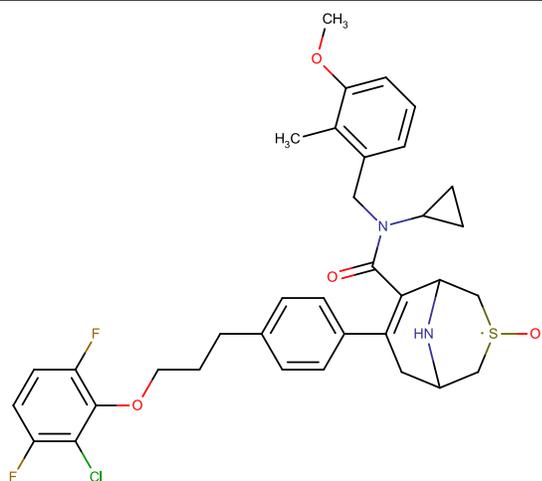
Dentre as 28.691 amidas triadas, 968 apresentaram energias de ligação positiva, mesmo após *docking* consenso entre as três funções de *score* geradas. Dentre essas

968 amidas, 13 tiveram médias de consenso acima de 10, o que indica energias muito altas e uma baixa afinidade de ligação com o sítio ativo da AaGSTE2 (tabela 11).

Tabela 11- Ordem das amidas que apresentaram a maior média consenso para AaGSTE2

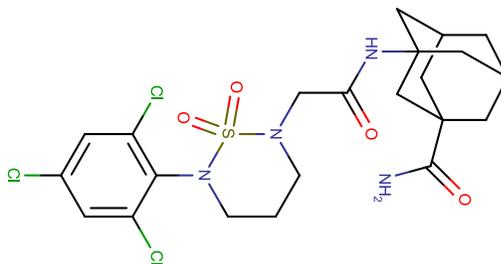
Ordem/ identificação	Estruturas	Consenso
1		84.60393679
2		82.65935447
3		81.82578838

4



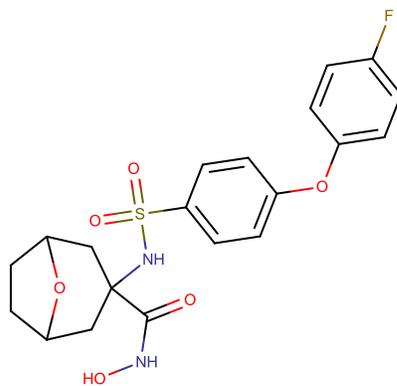
79.45783004

5



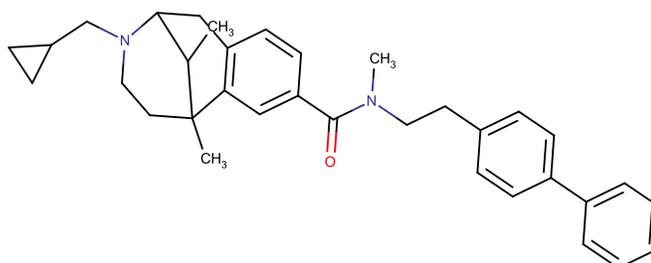
77.61680989

6



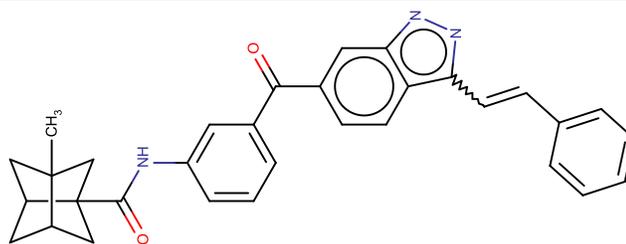
64.1965094

7



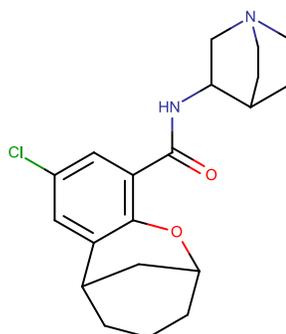
62.18756848

8



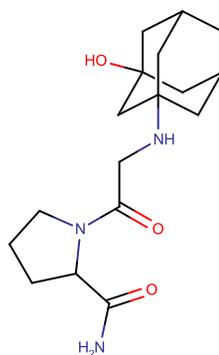
53.59693539

9



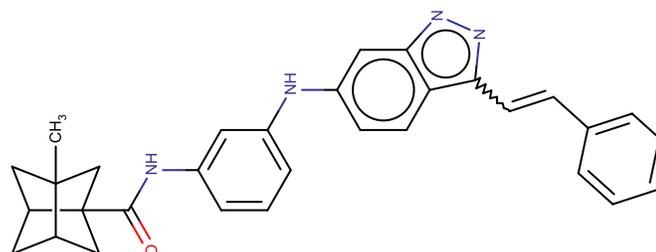
49.34559301

10



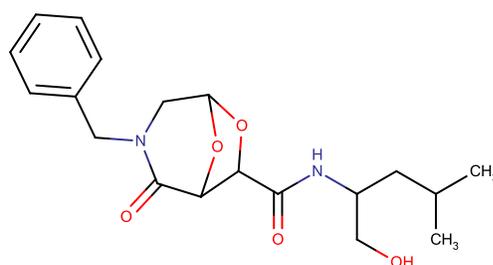
48.51985262

11



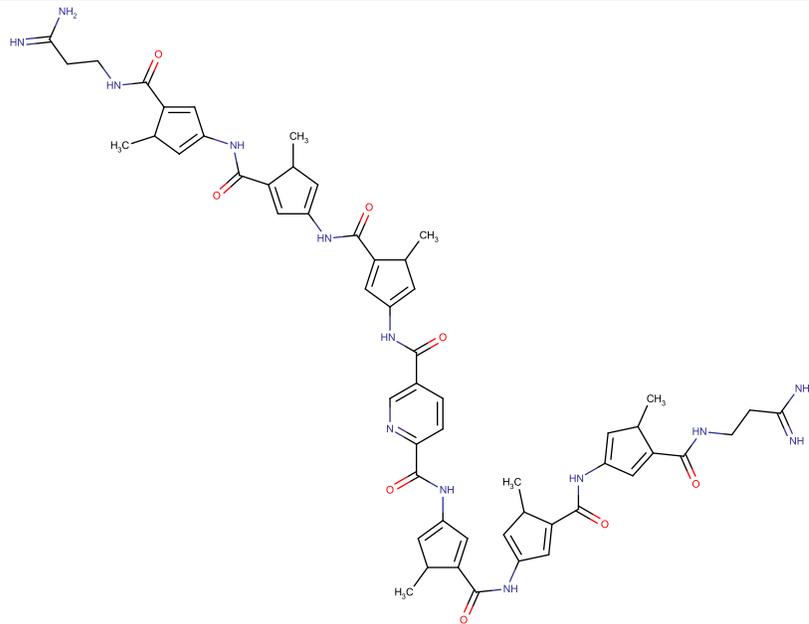
46.39113523

12



42.64300865

13



10.10974906

Como controle e para comprovar mais uma vez a resistência encontrada para os inseticidas comerciais, a afinidade de Malation, Temefós, DEET e Transflutrina sobre essa enzima também foi avaliada e diferentemente das 13 amidas, apresentaram baixa energia (-77,1, -82,4, -68,6 e -92,9 respectivamente), isto é, alta afinidade de ligação ao sítio ativo.

Malation e Temefós são organofosforados utilizados no controle de larvas e adultos, respectivamente. A alta atividade de *AaGSTE2* foi associada a resistência ao larvicida Temefós, de diferentes populações de *Ae. aegypti* (183,185). No entanto, para o adulticida Malation foram encontrados baixos níveis de resistência, relatados em algumas regiões (21,196–198). Essa alteração pode estar relacionada ao estágio de vida do mosquito em que esse inseticida atua, demonstrando que embora esses inseticidas apresentem o mesmo mecanismo de ação não existe resistência cruzada entre eles (199). Ainda, nosso estudo demonstrou que o Malation é capaz de interagir com a enzima *AaGSTE2* e portanto, o aumento do seu uso pode levar tanto ao aumento do nível de resistência quanto ao aumento da distribuição desta resistência (200).

Transflutrina é um piretroide de curta duração, que em baixas doses é utilizado como repelente e inseticida. Porém, a resistência cruzada entre populações de mosquitos resistentes aos demais inseticidas dessa mesma classe (piretroides) já é conhecida (201), e essa resistência aos piretroides é distribuída mundialmente. Em algumas populações, o mecanismo de resistência metabólica relacionada à alta atividade de GST está associada à resistência cruzada dessa classe com o DDT (202–204).

DEET (*N,N-Diethyl-3-methylbenzamide*) é o repelente tópico conhecido como “padrão ouro” até hoje, mesmo sendo comercializado há muitos anos (205). Na literatura, um estudo realizado utilizando células clonais de larvas neonatais (C7-10) de *Aedes albopictus* revelou que a nível celular, o tratamento com DEET levou ao aumento da atividade das enzimas GST (206). No entanto, este estudo representa a primeira relação direta entre esse inseticida e AaGSTE2.

Ainda que mais mecanismos estejam envolvidos no desenvolvimento de resistência (207), a triagem realizada utilizando a AaGSTE2 representa uma vantagem no desenvolvimento de novos inseticidas. Assim, os treze compostos que apresentaram baixa afinidade a essa enzima, e portanto, potencial atividade para o controle do mosquito *Ae. aegypti*, foram submetidos a nova triagem virtual frente às enzimas AaAChE1 (figura 21), AaFKBP12 (figura 22) e AamJHBP (figura 23). Lembrando, que essas enzimas representam potenciais alvos no desenvolvimento de novos inseticidas.

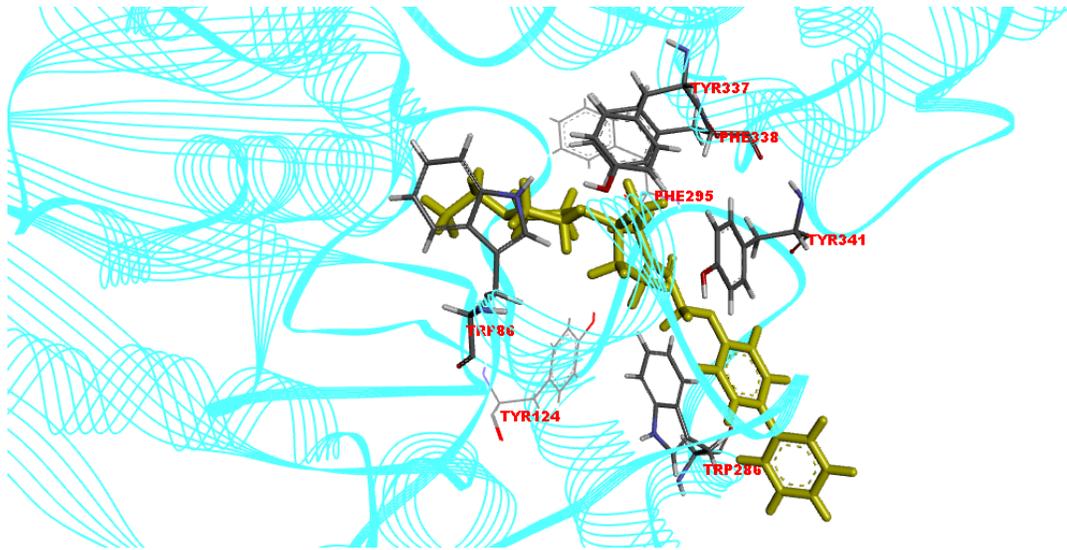


Figura 21- Sítio de ligação da AaAChE1 (Resíduos: TYR337, PHE338, TYR341, TRP 86, TYR124, TRP286 e “CYS295”). Imagem gerada utilizando o software Molegro Virtual Docking (ID PDB: 5FUM).

A acetilcolinesterase 1 (AaAChE1) é o principal alvo dos inseticidas organofosforados e carbamatos. Ainda que esses inseticidas sejam amplamente utilizados, até hoje não foram encontradas mutações nessas enzimas de *Ae. aegypti* que estejam associadas ao desenvolvimento de resistência (199). Embora essas enzimas sejam encontradas tanto em insetos quanto em mamíferos, a presença de um resíduo, conhecido como resíduo de cisteína específico de insetos, torna esse alvo importante para o desenvolvimento de inseticidas seletivos e seguros (208).

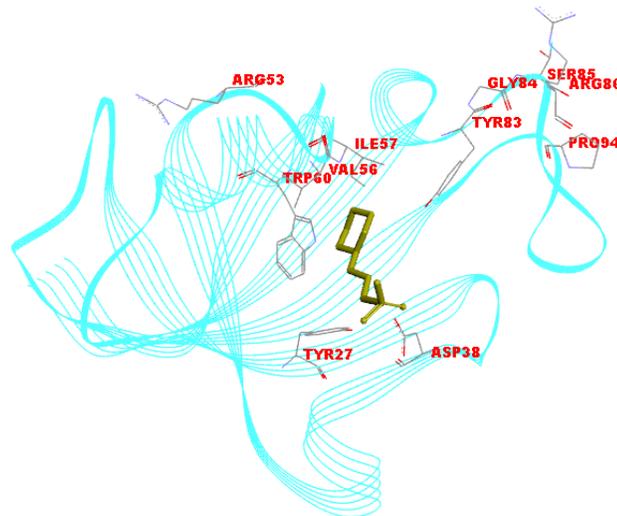


Figura 22 - Sítio de ligação da AaFKBP12 (Resíduos: ARG53, ILE57, VAL56, TRP60, TYR27, ASP38, TYR83, GLY84, SER85, ARG86, PRO94). Imagem gerada utilizando o software Molegro Virtual *Docking* (ID PDB: 3UQI).

As proteínas FKBP desempenham papel importante na sinalização biológica, como sinalização de cálcio, apoptose e proteção neuronal, portanto representam um importante alvo no desenvolvimento de drogas (209). A isomerase FKBP12 identificada em *Ae. aegypti* possui 71% de similaridade com a FKBP12 de humanos (*HsFKBP12*), que regula funções importantes como o dobramento de proteínas, estabilidade, atividades neuroprotetoras, atividade chaperônica, homeostase do cálcio, atividades neurotróficas, entre outras. Isso a torna um alvo para medicamentos imunossupressores (210). Estudo realizado por Rajan et al. (210) destacou importantes diferenças entre a FKBP12 de humanos (*HsFKBP12*) e do vetor (*AaFKBP12*). Os autores demonstraram: (i) a presença de um resíduo adicional de metionina no N-terminal da *AaFKBP12*; e que (ii) na região do sítio alvo, o resíduo ILE76 (em humanos) na proteína é substituído pelo resíduo CYS77 (no vetor). Essas diferenças tornam a *AaFKBP12* um alvo potencial para o controle do vetor (209,210).

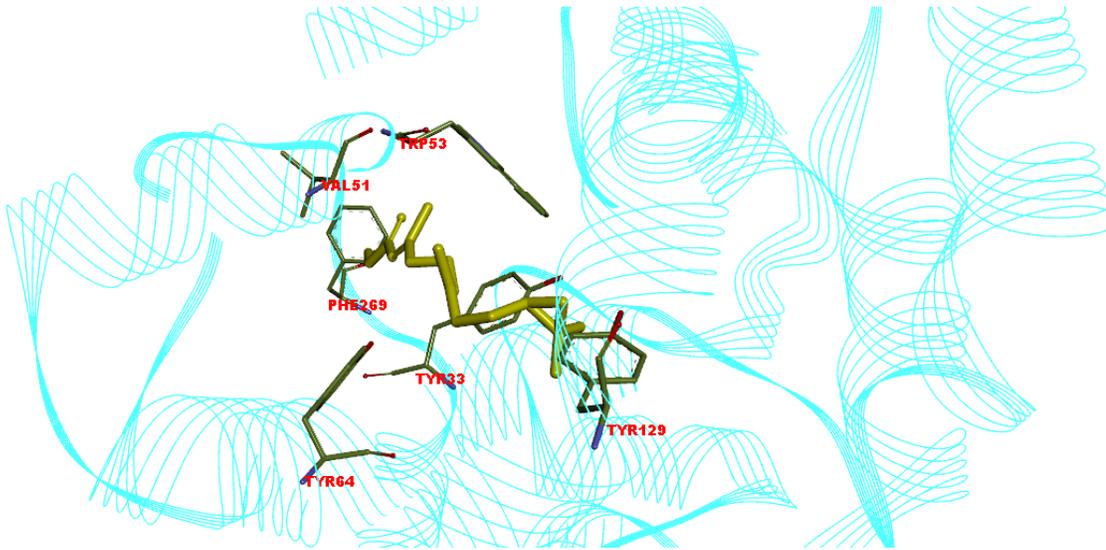


Figura 23 - Sítio de ligação da AamJHBP (Resíduos: TRP53, VAL51, PHE269, TYR33, TYR64 e TYR129). Imagem gerada utilizando o software Molegro Virtual Docking (ID PDB: 5V13).

Um outro alvo molecular de *Ae. aegypti*, também de grande relevância para o desenvolvimento de inseticidas, são as proteínas de ligação odorante (OBPs) encontradas nos tecidos quimiossensoriais do vetor, que desempenham importantes funções envolvendo os receptores odorantes, como, a realização do transporte dos ligantes, modulação da sensibilidade e encerramento da transmissão do sinal (211). Esses receptores são importantes para comportamentos de alimentação, sobrevivência e reprodução (212). A proteína 22 (AeOBP22) exerce função importante relacionada a comportamentos de localização e seleção do hospedeiro sanguíneo, sendo expressa nas antenas, glândula salivar e tecidos reprodutivos masculinos (213).

Outra proteína importante, pertencente a essa família, é a proteína de ligação ao hormônio juvenil (mJHBP). Essa proteína é semelhante à proteína salivar D7 que também é uma OBP. A proteína D7 previne a rápida resposta inflamatória do hospedeiro, o que é essencial na alimentação de sangue (214,215). A proteína de ligação ao hormônio juvenil de *Ae. aegypti* (AamJHBP) foi encontrada na hemolinfa de pupas e mosquitos adultos. É um ligante específico do hormônio juvenil, que por sua vez é essencial para maturação dos ovários e na regulação da estado nutricional e desenvolvimento reprodutivo do mosquito (215,216).

A partir do acoplamento das amidas com o sítio de ligação dessas três enzimas alvo (*AaAChE1*, *AaFKBP12* e *AamJHBP*) foi observado que todas as amidas, exceto a **13**, que apresentou valores de energia muito altos, foram capazes de acoplar com os sítios alvos dessas três enzimas, conforme exemplificado na figura 24.

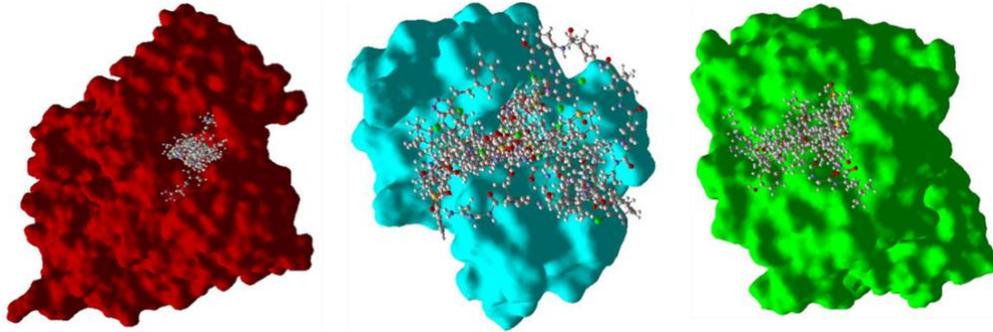


Figura 24 - Clusters das amidas **1-13** com enzimas *AaAChE1* (vermelho), *AaFKBP12* (azul) e *AamJHBP* (verde). Imagem gerada utilizando o software Molegro Virtual *Docking*.

Foi observada a média de consenso do acoplamento de cada amida com cada uma das enzimas. Os dez compostos que apresentaram a melhor média de consenso foram agrupados em ordem para cada enzima, como observado na tabela 12.

Tabela 12 – Ordem dos compostos que apresentaram melhor média de consenso para cada enzima.

<i>AaAChE1</i>	<i>AaFKBP12</i>	<i>AamJHBP</i>
11	11	11
8	8	8
4	6	12
3	3	6
7	2	4
6	4	5
5	12	10
2	5	3
12	10	7
9	9	9

As amidas **11** e **8** obtiveram os melhores valores de média de consenso para as três enzimas alvos. O que sugere uma possível atividade multialvo, uma vantagem no controle do vetor, uma vez que seriam mais eficientes (217), e já demonstraram serem capazes de superar a resistência mediada pela atividade da enzima GST. Além disso, a afinidade com essas três enzimas torna-se vantajosa quando considerada a resistência ao sítio alvo, uma vez que, seria necessário o desenvolvimento de resistência nos três diferentes sítios.

Foram obtidos os valores das energias de ligação das amidas **11** e **8**, dos compostos padrão (malation, temefós, DEET e transflutrina) e dos ligantes co-cristalizados para cada alvo de acordo com a função Moldock Score (tabela 13).

Tabela 13- Energias de ligação das amidas **11** e **8**, ligantes co-cristalizados, inseticidas: malation, temefós, DEET e transflutrina com cada uma das enzimas.

Identificação	Energia de ligação (KJ/mol)			
	AaAChE1	AaFKBP12	AamJHBP	GST
11	-183.9	-146.8	-195.2	-
8	-183.7	-140.0	-194.7	-
Ligantes co-cristalizados	-134.9	-46.5	-118.5	-
Malation	-74.6	-58.2	-79.0	-77.1
Temefós	-105.2	-65.02	-120.758	-82.4
DEET	-84.2	-67.3	-86.6	-68.6
Transflutrina	-124.4	-64.8	-118.50	-92.9

Acetilcolinestarese 1(AaAChE1); isomerase AaFKBP12; proteína de ligação ao hormônio juvenil (AamJHBP); Glutaciona-s-transferase (GST) de *Ae. aegypti*.

Os compostos **11** e **8** apresentaram as menores energias de ligação dentre os treze compostos testados frente as três enzimas alvo (AaAChE1, AaFKBP12 e AamJHBP). As diferenças energéticas entre os acoplamentos de **11** e **8** e os ligantes co-cristalizados também enfatizaram a alta afinidade das referidas amidas pelos sítios de ligação das três enzimas de interesse. Além disso, diferentemente das amidas, todos os

inseticidas sintéticos apresentaram afinidade à GST e afinidades menores pelas enzimas de interesse para atividade inseticida (*AaAChE1*, *AaFKBP12* e *AamJHBP*).

Os tipos de interações intermoleculares envolvidos no processo de acoplamento entre os ligantes **11** e **8** e os resíduos de aminoácidos dos sítios de ligação das enzimas alvo podem ser observados da figura 25.

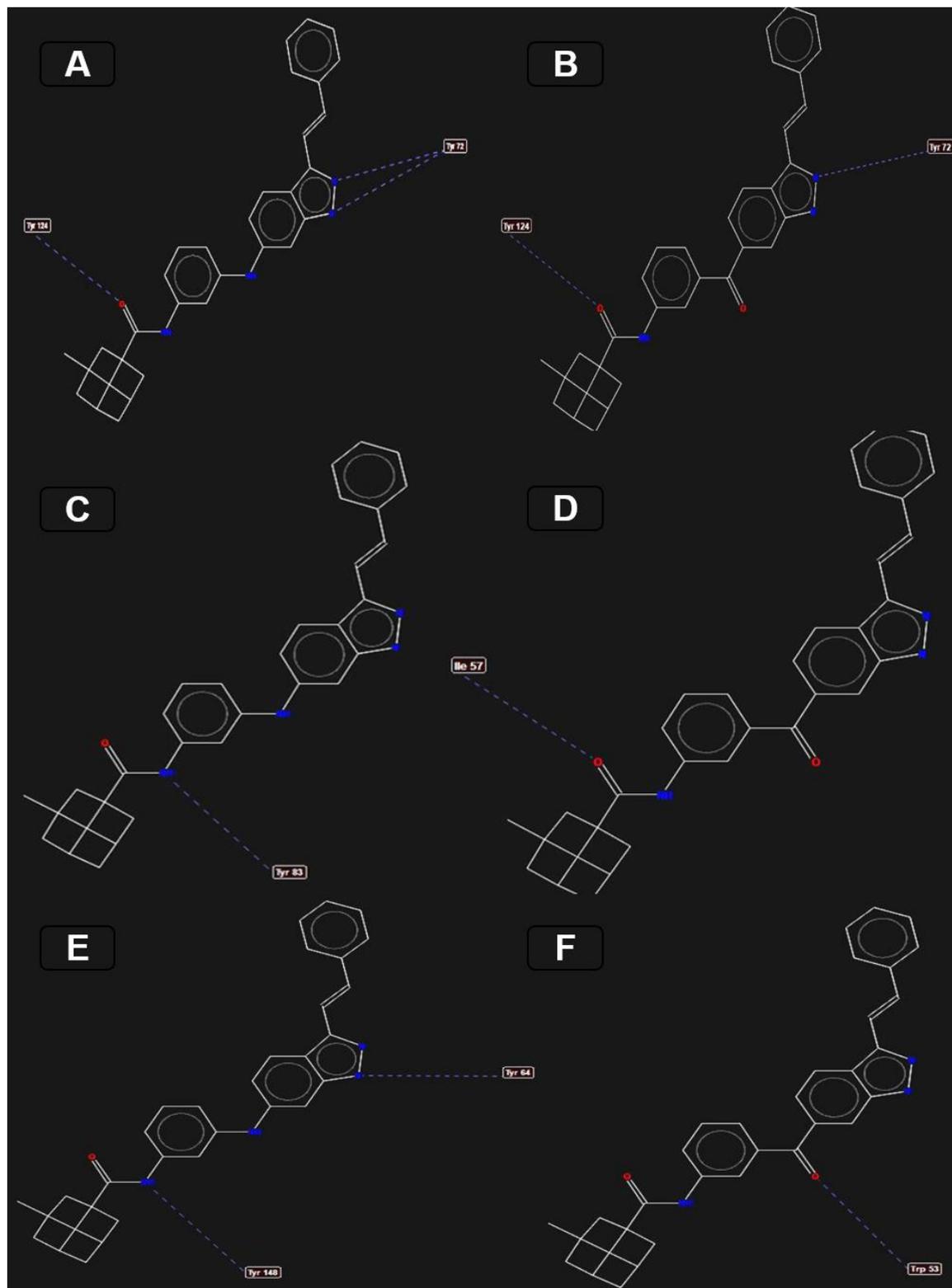


Figura 25 - Interações de hidrogênio entre 11 e 8 e AaAChE1 (A-B), AaFKBP12 (C-D) e AamJHBP (E-F).

Foram observadas interações de hidrogênio entre as amidas e as enzimas avaliadas. Para obtenção desse tipo de interação, observa-se a importância da carbonila, da função amida e do anel pirazol. Considerando as interações dos compostos com a enzima AaAChE1, foram observadas interações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos TYR124 e TRY72, tanto para a amida **11** quanto para a amida **8**. No entanto, apenas o resíduo TYR124 foi observado no sítio ativo quando realizado o acoplamento com o ligante co-cristalizado. O mesmo foi observado na interação da amida **11** com a enzima AamJHBP, onde o composto foi capaz de interagir com dois resíduos, TYR 64 e TYR148, sendo apenas o primeiro encontrado no sítio ativo. Para a mesma enzima, foi observada interação da amida **8** com o resíduo TRP 53. Finalmente, para a enzima AaFKBP12 foram observadas interações com dois resíduos de aminoácidos pertencentes ao sítio ativo, TYR83 para amida **11** e ILE 57 para amida **8**.

Embora esses compostos sejam capazes de interagir com poucos resíduos de aminoácidos encontrados no sítio alvo, a energia de ligação necessária é muito menor do que a energia necessária para ligação com o ligante co-cristalizado, portanto, teoricamente, esses ligantes apresentariam maior estabilidade e em uma competição pelo sítio ativo, poderiam apresentar maior afinidade e finalmente melhor atividade biológica (218).

Estudos computacionais são importantes no desenvolvimento de novos fármacos, no entendimento do mecanismo de ação e na compreensão da relação estrutura-atividade. A alta quantidade de estudos que descrevem diversos compostos com atividades biológicas e a definição dos alvos moleculares permite a elaboração de estudos de triagem considerando toda uma família de moléculas, como aqui apresentado (189). No entanto, o *docking* molecular apresenta vantagens por ser um estudo rápido, que permite obter resultados predizendo o modo e a energia (intensidade) de interação entre o receptor e o ligante, e ainda, indicando onde há a flexibilização do ligante (219,220).

Para a continuidade da pesquisa torna-se interessante a realização de mais um estudo computacional conhecido como dinâmica molecular. Este permitirá, observar as

interações dinâmicas intra e intermoleculares, considerando diferentes escalas de tempo, onde o dobramento da proteína é observado. Assim, teremos, a descrição mais precisa sobre as energias envolvidas. Ainda, a realização de estudos biológicos contribuiria na determinação da relação da estrutura-atividade, determinando as estruturas moleculares mais importantes utilizadas como base para síntese de novos compostos de menor complexidade e finalmente obtenção de *hits*. (190,219–221).

4.5 CONCLUSÃO

Neste estudo, foram realizadas triagens virtuais para avaliação da afinidade de amidas sintéticas e naturais em quatro alvos moleculares. Primeiramente, considerando a alta prevalência de populações resistentes de *Ae. aegypti* e a necessidade da obtenção de novos inseticidas, a afinidade desses compostos foi avaliada em uma importante enzima de desintoxicação, a glutathione S-transferase Epsilon 2 (*AaGSTE2*), e posteriormente em outros três alvos, acetilcolinesterase 1 (*AaAChE1*), a isomerase *AaFKBP12* e proteína de ligação ao hormônio juvenil (*AamJHBP*).

A metodologia aplicada permitiu evidenciar a alta afinidade entre *AaGSTE2* e os inseticidas químicos utilizados, malation, temefós, transflutrina e DEET, evidenciando a atuação dessa enzima em populações de mosquitos resistentes. Dentre as 28.691 amidas avaliadas sobre essa mesma enzima, apenas treze apresentaram baixa afinidade a essa enzima, isto é, capacidade de superar esse mecanismo de resistência. Duas dessas amidas (**8** e **11**) com estruturas químicas complexas e similares apresentaram alta afinidade as enzimas alvo (*AaAChE1*, *AaFKBP12* e *AamJHBP*), com valores de energia de ligação menores do que os ligantes co-cristalizados e os inseticidas químicos. Ainda, foi observada interações de hidrogênio entre essas amidas e o sítio alvo das enzimas de interesse no desenvolvimento de inseticidas.

Amidas são conhecidas por apresentarem ampla atividade biológica, portanto a utilização de técnicas computacionais, como a triagem virtual por *docking* molecular, permitiu a avaliação de diversas moléculas sobre importantes alvos biológicos de *Ae. aegypti*, resultando em duas moléculas potenciais, o que representa uma vantagem no estudo de novos inseticidas. Essas amidas demonstram ser compostos promissores para o controle do vetor. Esses resultados constatados em nossa pesquisa por *docking* molecular devem ser associados à estudos envolvendo dinâmica molecular e associados à testes *in vitro* e *in vivo* para determinar a atividade em *Ae. aegypti* e a relação estrutura-atividade.

5 CAPÍTULO 3 – SÍNTESE DE COMPOSTO BISNITRÍLICO COM ATIVIDADE LARVICIDA EM *Ae. aegypti*

5.1 INTRODUÇÃO

Compostos heterocíclicos são conhecidos por apresentarem ampla atividade biológica (222,223). Nesse contexto, destaca-se a atividade de compostos contendo anéis pirimidínicos com atividade antimicrobiana, antirretroviral, leishmanicida, anti-inflamatória e inseticida (223–226) Para obtenção desses compostos existem diversas estratégias sintéticas, sendo uma dessas a condensação de bisnitrilas com arilamidinas, como as benzamidinas (224,227). Um exemplo é a reação de condensação de Knoevenagel. Esta é amplamente utilizada para formação de ligações do tipo C=C, para obtenção de compostos intermediários, produtos finais, fármacos e polímeros, sendo bastante utilizada para obtenção de intermediários bisnitrílicos (228–230).

Considerando a importância dos compostos binitrílicos para obtenção de diversos compostos pirimidínicos e a atividade relatada destes compostos em *Ae. aegypti*, foi realizada síntese de um composto bisnitrílico a partir da reação de condensação de

Knoevenagel entre um aldeído e malononitrila em meio básico utilizando piperidina como catalizador.

5.2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo sintetizar um composto bisnitrílico e avaliar sua atividade em larvas do terceiro estágio (larvas L3) do mosquito *Ae. aegypti*.

5.2.1 Objetivos específicos

- Realizar a síntese do composto bisnitrílico.
- Determinar a estrutura química do composto obtido por RMN de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas (UPLC-MS/MS).
- Avaliar a atividade larvicida e pupicida do composto.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Síntese do composto bisnitrílico

Em um balão de fundo redondo, quantidades equimolares (3,1 mmol) dos reagentes, aldeído *trans-p-Metoxicinamaldeído* e malononitrila, foram adicionadas e solubilizadas em 30 mL de metanol. Após total solubilização dos reagentes, 10 gotas de piperidina (agente condensante) foram adicionadas, o que levou a formação de um

precipitado (186,187). O meio reacional foi mantido sob agitação constante à temperatura ambiente (figura 26). A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), eluída com o sistema hexano: acetato de etila (1:1), revelada utilizando luz UV (254 nm) e ácido fosfomolibdico. Constatada a formação do produto, o meio reacional foi submetido a baixa temperatura (-20 °C) e posteriormente filtrado a vácuo em funil de Büchner. O precipitado foi preparado para análises de RMN e espectrometria de massas, e a porção líquida descartada. Constatada a formação do composto, foi realizado o cálculo do rendimento, considerando a quantidade molar.

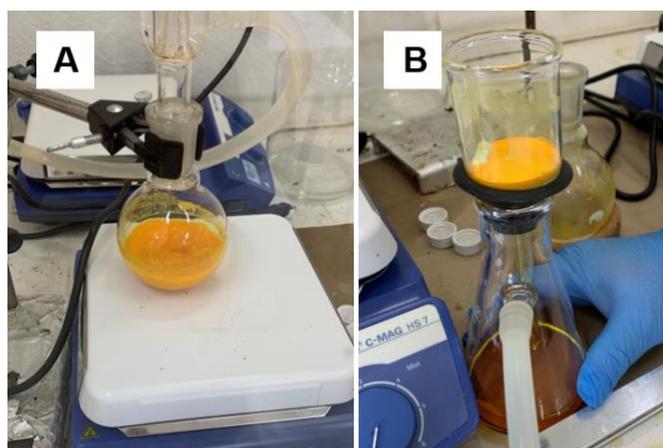


Figura 26 - Síntese do composto bisnitrílico. **A**: reagentes solubilizados em metanol, piperidina adicionada e meio reacional mantido sob agitação magnética constante e temperatura ambiente. **B**: meio reacional filtrado sob pressão reduzida. Fonte: arquivo do Laboratório de Farmacognosia, UnB.

5.3.1.1 Síntese escalonada do composto bisnitrílico

Para obtenção do composto em maior quantidade, foi realizada reação seguindo o mesmo protocolo, no entanto utilizando de 6,2 mmol dos reagentes, 60 mL de metanol e 20 gotas de piperidina.

5.3.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massa (UPLC- MS/MS)

Após análise da pureza cromatográfica por CCD dos produtos obtidos nas reações, estes foram submetidos a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução UPLC-MS/MS ESI-QTOF Bruker Daltonics. Para obtenção dos perfis, foi utilizada coluna cromatográfica de fase reversa C18 (100 x 2,1 mm x 1,8 μ m). A fase móvel do sistema foi estabelecida com acetonitrila na bomba B e água ultrapura Milli-Q na bomba A, ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. A vazão da fase móvel foi mantida em 0,5 mL/min e a temperatura do forno foi de 40°C. Um gradiente de polaridade iniciando-se com 5% de B, atingindo 100% B ao longo de 16 minutos foi utilizado para tais análises. Os parâmetros do espectrômetro de massas incluíram a temperatura da fonte de ionização em 200 °C, a voltagem do capilar em 4500 V, o gás nebulizador a 4 bar e o gás secante a 9 L/min, operando no modo positivo. Os dados obtidos foram processados pelos softwares Compass Hystar e Data analysis Bruker Daltonics.

5.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Para elucidação estrutural o composto sintetizado foi solubilizado em metanol-d deuterado (CD_3OD) e submetido a análise em Ressonância Magnética Nuclear (RMN), utilizando Bruker Avance III HD de 600 MHz (1H) e em RMN de 300 MHz Varian Magneto Oxford YH300 Console Mercury Plus 300 (^{13}C). Equipamentos mantidos na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília (CAIQ/UnB).

5.3.4 Testes biológicos em *Ae. aegypti*

As colônias do mosquito *Ae. aegypti* foram mantidas conforme item 3.3.3.1 do presente trabalho. Foi avaliada a atividade larvicida e pupicida dos reagentes e do composto sintetizado conforme os itens 3.3.3.2 e 3.3.3.3.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O mecanismo reacional para obtenção do composto bisnitrílico pode ser observado na figura 27.

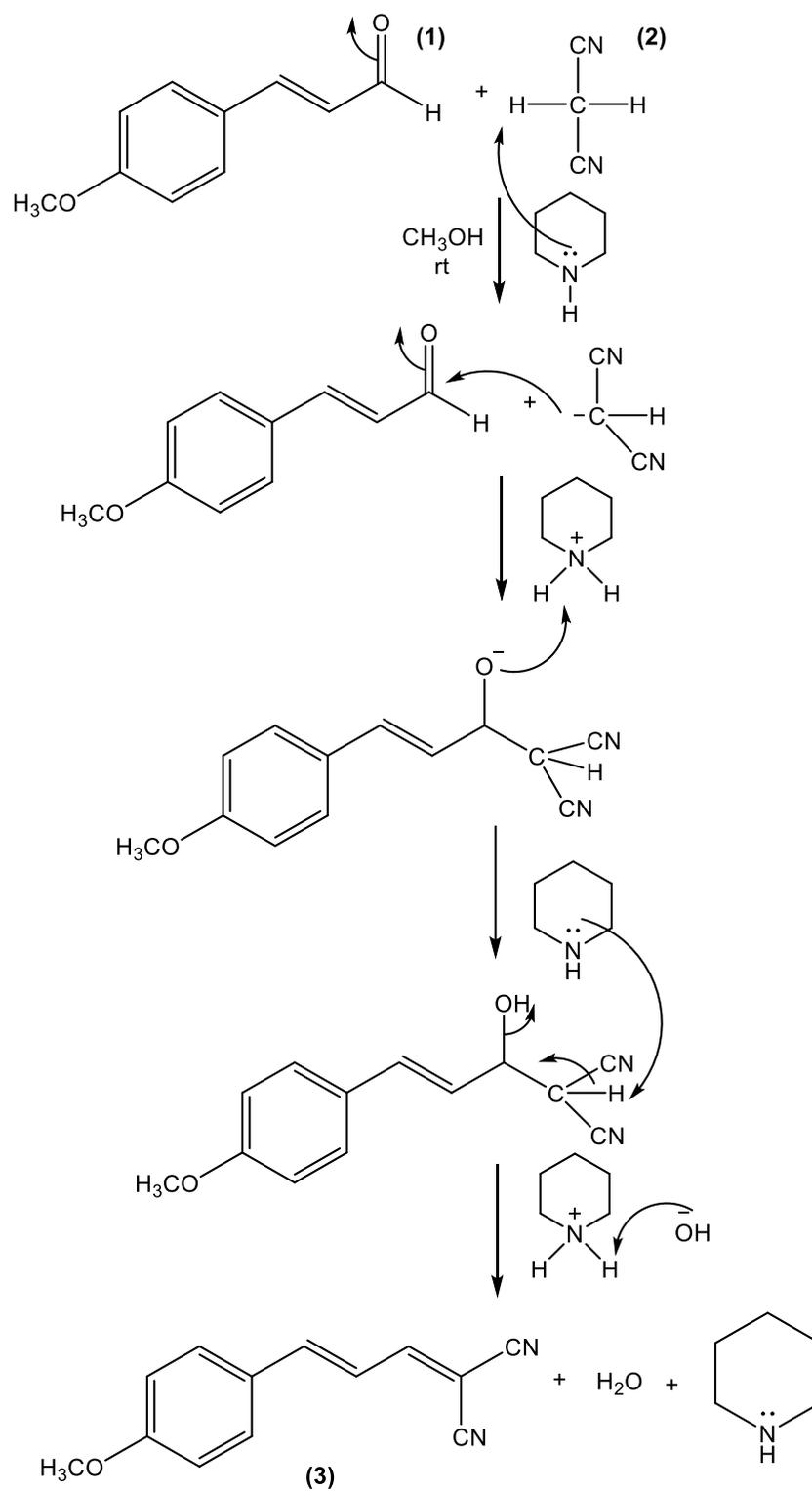


Figura 27 - Esquema reacional para obtenção de bisnitrila (3) a partir da reação do aldeído *Trans-p*-Metoxicinamaldeído (1) com malononitrila (2) em meio básico.

Foram realizadas diferentes reações, com diferentes tempos de reação, seguindo o mesmo protocolo, a fim de determinar as condições ideais para a síntese do produto. Na primeira tentativa, o meio reacional foi mantido sob agitação constante durante 4 horas e 10 minutos e o produto foi obtido com baixo rendimento (5%). Na segunda tentativa, a reação teve duração de 1 hora e 24 minutos com rendimento de 14%. Com o objetivo de obter maior quantidade do produto para realização dos testes biológicos e novas sínteses, foi realizada reação escalonada, onde o produto foi obtido com rendimento de 63%.

Em todas as reações, a confirmação da formação do produto foi realizada primeiramente por análise comparativa do perfil cromatográfico dos reagentes e o meio reacional em placas de CCD. Ou seja, os produtos obtidos em cada síntese foram comparados utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada. Posteriormente, foram realizadas análises em UPLC-MS/MS e RMN. A análise em UPLC-MS/MS permitiu observar a presença de um pico majoritário com m/z 211,0853 $[M+H]^+$ compatível com o produto protonado $C_{13}H_{11}N_2O$ (erro = 8,7 ppm) (figura 28). As análises de RMN uni e bidimensionais confirmaram a elucidação estrutural do composto sintetizado (figura 29, tabela 14 e apêndice C).

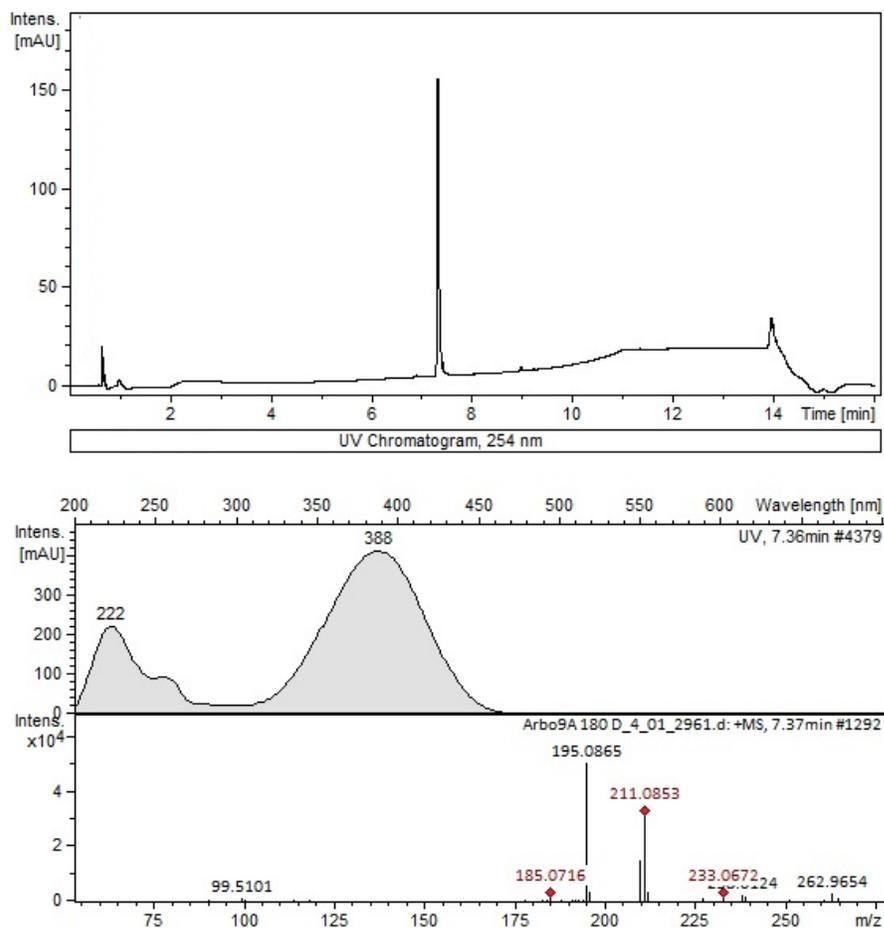


Figura 28 - Análise em UPLC-MS/MS, cromatograma (254nm) e espectrômetro de massas com m/z 211,0853 $[M+H]^+$.

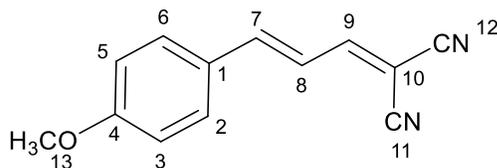


Figura 29 - Estrutura do composto sintetizado 2-(*p*-metoxifenilalilidene)malononitrila.

Tabela 14 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto sintetizado (CD_3OD ; ^1H 600 MHz; ^{13}C 150 MHz).

Posição	δH , J (em Hz)	δC	HSQC
1		128, 67	C
2; 6	7,66 (2H; <i>m</i>)	132,26	CH
3; 5	7,02 (2H; <i>m</i>)	115,96	CH

4		164,56	C
13	3,87 (3H; s)	56,12	CH ₃
7	7,47 (1H; <i>d</i> ; 12)	152,34	CH
8	7,17 (1H; <i>dd</i> ; 12)	121,30	CH
9	7,94 (1H; <i>d</i> ; 12)	162,79	CH
10		80,79	C
12		113,39	CN
11		115,30	CN

Foi realizado o teste larvicida dos reagentes utilizados e do produto obtido, onde foi constatada atividade inédita da bisnitrila sintetizada (figura 30). Além disso, foi observado o aumento da mortalidade das larvas nas leituras de 48 e 72 horas. Considerando a atividade larvicida do composto, foi realizado teste pupicida, no entanto o composto não foi ativo.

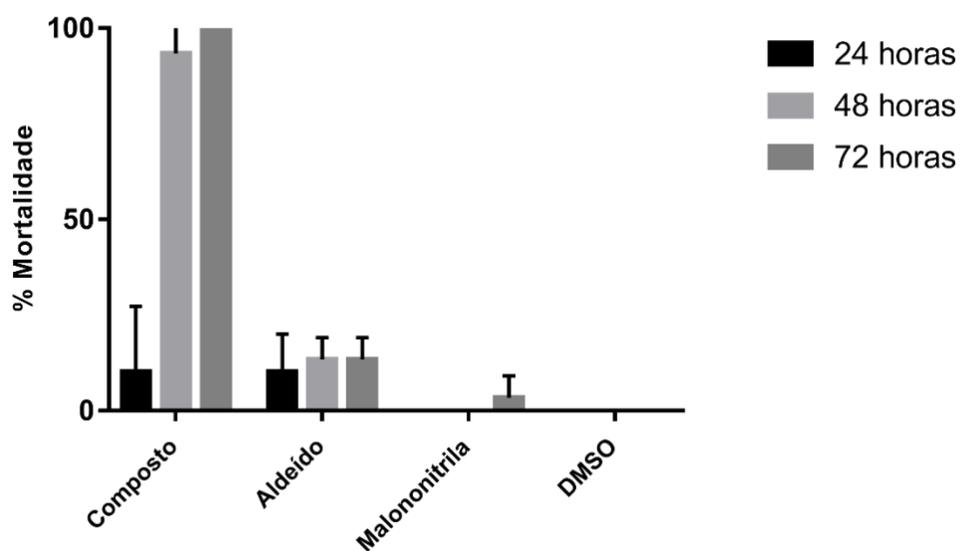


Figura 30 - Atividade larvicida do composto sintetizado e dos reagentes utilizados, testados a 25 µg/mL.

O composto sintetizado encontra-se disponível comercialmente, no entanto, a realização da síntese torna-se vantajosa considerando a facilidade da obtenção do composto e a disponibilidade dos materiais e reagentes necessários. Ressalta-se que

essa classe de compostos (também conhecidos como intermediário de Michael) é conhecida na química orgânica como compostos intermediários para obtenção de importantes estruturas com atividades biológicas importantes, como os compostos pirimidínicos (222,224,231), sendo alguns desses já avaliados em larvas de *Ae. aegypti* (226,232).

Portanto, a partir da bisnitrila sintetizada no presente estudo, os próximos passos envolvem o desenvolvimento de compostos pirimidínicos e a respectiva avaliação da atividade em larvas de *Ae. aegypti*.

5.5 CONCLUSÃO

Foi realizada síntese de um intermediário bisnitrílico a partir da reação de condensação de Knoevenagel do aldeído *trans-p-Metoxicinamaldeído* com malononitrila em meio básico catalisada por piperidina, e estabelecido o controle da reação. O escalonamento da reação proporcionou rendimento de 63%.

O composto sintetizado (bisnitrila) se destacou por apresentar maior atividade em larvas L3 de *Ae. aegypti* após 48 e 72 horas de exposição. Na literatura não foi encontrada atividade larvicida relatada para o composto sintetizado, 2- (*p*-metoxifenilalililidene) malononitrila. A bisnitrila obtida nesse estudo será utilizada como percussor para síntese de novos compostos pirimidínicos, tendo em vista, a alta atividade biológica atribuída aos compostos dessa classe.

6 CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho inserido no projeto ArboControl, teve como objetivo encontrar novas estratégias de combate ao vetor *Aedes aegypti*, assim foram realizadas três pesquisas.

Na primeira parte deste trabalho foi realizada pesquisas envolvendo compostos naturais de duas plantas do cerrado, *Annona crassiflora* e *Xylopia aromatica*. As técnicas quimiométricas permitiram a identificação da clássica química dos compostos responsáveis pela atividade larvicida dos extratos de *A. crassiflora* (acetogeninas), esse resultado foi confirmado pelo isolamento clássico, ainda que não tenha sido possível realizar o isolamento desses compostos, esses foram identificados em misturas. Este resultado resultou em uma publicação no periódico *Scientific Reports*, e demonstrou a potencial utilização desse tipo de estudo para evitar a realização de trabalhos repetitivos. O estudo realizando técnicas de isolamento clássico permitiu o isolamento de dois compostos terpênicos do extrato hexânico da folha de *X. aromatica*, sendo um desses ativo, no entanto tóxico, portanto as perspectivas do trabalho envolvem a obtenção de amidas semissintéticas a partir do ácido isolado tendo em vista a facilidade do isolamento, a alta quantidade isolada e sua estrutura química.

Na segunda parte deste trabalho foi realizado estudo computacional de triagem virtual por meio de *docking* molecular. Considerando a ampla atividade de amidas, essas foram triadas sobre 4 alvos moleculares. Primeiramente os compostos tiveram sua afinidade de ligação avaliada sobre a glutathione S-transferase, tendo em vista, a desintoxicação mediada por essa enzima. Foram selecionadas duas amidas capazes de superar esse mecanismo de resistência mediado por essa enzima e que apresentaram alta afinidade a outros três alvos importantes no vetor. Para continuidade do estudo devem ser realizados estudos de dinâmica molecular, testes *in vitro* e *in vivo* para determinar a relação estrutura-ativa e assim obter um potencial inseticida.

Na última parte deste trabalho foi realizada síntese para obtenção de composto bisnitrílico, tendo em vista, que este serve como intermediário para síntese de compostos pirimidínicos que apresentam ampla atividade biológica, como atividade larvicida em *Ae. aegypti*. O composto foi obtido com 63% de rendimento e foi observada atividade larvicida inédita em 48 e 72 horas de exposição. Assim, os próximos passos deste estudo

envolvem a obtenção de compostos pirimidínicos e avaliação da atividade destes sobre *Ae. aegypti*.

Nesse trabalho foram encontrados compostos promissores para o controle do vetor, no entanto, para o desenvolvimento de um produto final ainda são necessárias diversas etapas de pesquisa envolvendo diferentes áreas, como o controle de qualidade e o desenvolvimento de formulações. Visando acelerar este processo, torna-se interessante uma interação entre o meio acadêmico e empresas que possuem maquinário e experiência no desenvolvimento de produtos.

7 REFERÊNCIAS

1. Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(August):11–7.
2. Kamal M, Kenawy MA, Rady MH, Khaled AS, Samy AM. Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* under changing climate. *PLoS One*. 2018;13(12):1–21.
3. Chouin-Carneiro T, dos Santos FB. Transmission of Major Arboviruses in Brazil: The Role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Vectors. *Biol Control Pest Vector Insects* [Internet]. 2017;2:Ch. 11. Available from: <https://doi.org/10.5772/66946%0Ahttp://www.intechopen.com/books/biological-control-of-pest-and-vector-insects/transmission-of-major-arboviruses-in-brazil-the-role-of-aedes-aegypti-and-aedes-albopictus-vectors>
4. Kotsakiozi P, Gloria-Soria A, Caccone A, Evans B, Schama R, Martins AJ, et al. Tracking the return of *Aedes aegypti* to Brazil, the major vector of the dengue, chikungunya and Zika viruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7):1–20.
5. Souza-Neto JA, Powell JR, Bonizzoni M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infect Genet Evol*. 2019;67:191–209.
6. Organization WH. Vector-borne diseases [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 19]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
7. Pan American Health Organization •. Epidemiological Update Dengue Year of report Total of dengue cases Proportion of severe dengue cases [Internet]. 2019 [cited 2021 Mar 19]. Available from: <http://www.paho.org>
8. Plourde AR, Bloch EM. A literature review of zika virus. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(7):1185–92.
9. Valle D, Pimenta DN, Aguiar R. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões.

- Epidemiol e Serv saude Rev do Sist Unico Saude do Bras. 2016;25(2):419–22.
10. Yang F, Schildhauer S, Billeter SA, Yoshimizu MH, Payne R, Pakingan MJ, et al. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in California by biochemical assays. *J Med Entomol*. 2020;57(4):1176–83.
 11. MONATH, Thomas P.; VASCONCELOS PF. Yellow Fever. *J Clin Virol*. 2015;64:160–73.
 12. Wilder-Smith A, Hombach J, Ferguson N, Selgelid M, O'Brien K, Vannice K, et al. Deliberations of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization on the use of CYD-TDV dengue vaccine. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2019;19(1):e31–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30494-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30494-8)
 13. Roiz D, Wilson AL, Scott TW, Fonseca DM, Jourdain F, Müller P, et al. Integrated *Aedes* management for the control of *Aedes*-borne diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(12):1–21.
 14. Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dusfour I, et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7):1–20.
 15. Organization WH. WHO | Control strategies [Internet]. [cited 2021 Mar 19]. Available from: https://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/en/
 16. Organization WH. WHO | Environmental management [Internet]. [cited 2021 Mar 19]. Available from: https://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/environmental_management/en/
 17. Terradas G, McGraw EA. Wolbachia-mediated virus blocking in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *Curr Opin Insect Sci*. 2017;22:37–44.
 18. Polanczyk RA, de Oliveira Garcia M, Batista Alves S. Potential of *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner for controlling *Aedes aegypti*. *Rev Saude Publica*. 2003;37(6):813–6.
 19. Organization WH. WHO | Chemical control [Internet]. [cited 2021 Mar 19]. Available from: https://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/chemical_control/en/
 20. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol e Serviços Saúde* [Internet]. 2007;16(4):279–93. Available from: scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742007000400006&lng=en&nrm=iso&tlng=en%0Ahttp://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742007000400006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 21. Marcombe S, Fustec B, Cattel J, Chonephetsarath S, Thammavong P, Phommavanh N, et al. Distribution of insecticide resistance and mechanisms involved in the arbovirus vector *aedes aegypti* in laos and implication for vector control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(12):1–22.
 22. Yadav IC, Devi NL, Syed JH, Cheng Z, Li J, Zhang G, et al. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Sci Total Environ*. 2015;511:123–37.
 23. Melo SJ, Sousa JPB, Maíra G S, Morais LS, Magalhães NMG, Gouveia FN, et al. *Machaerium acutifolium* compounds with larvicidal activity against *Aedes aegypti*.

- Pest Manag Sci. 2021;77(3):1444–51.
24. Ali A, Tabanca N, Demirci B, Raman V, Budel JM, Baser KHC, et al. Insecticidal and biting deterrent activities of magnolia grandiflora essential oils and selected pure compounds against aedes aegypti. *Molecules*. 2020;25(6).
 25. Yang L, Wen KS, Ruan X, Zhao YX, Wei F, Wang Q. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*. 2018;23(4):1–26.
 26. Pavela AR, Maggi F, Iannarelli R, Benelli G. Plant extracts for developing mosquito larvicides: from laboratory to the field, with insights on the modes of action. 2019;
 27. Sousa JR, Silva FA, Targanski SK, Fazolo BR, Souza JM, Campos MG, et al. Synthesis and larvicidal activity of indole derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Appl Entomol*. 2019;143(10):1172–81.
 28. Bharathi A, Roopan SM, Rahuman AA, Rajakumar G. In vitro larvicidal and antioxidant activity of dihydrophenanthroline-3- carbonitriles. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
 29. Guzman MG, Harris E. *Dengue*. 2014;6736(14):1–13.
 30. WHO. Dengue and severe dengue [Internet]. [cited 2021 Mar 20]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
 31. Climate change may enable *Aedes aegypti* infestation in major European cities by 2100 _ Elsevier Enhanced Reader.pdf.
 32. Organization WH. Dengue and severe dengue [Internet]. [cited 2021 Mar 20]. Available from: https://www.who.int/health-topics/dengue-and-severe-dengue#tab=tab_3
 33. Narayan R, Tripathi S. Intrinsic ADE: The Dark Side of Antibody Dependent Enhancement During Dengue Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10(October):1–6.
 34. Organization WH. WHO | GACVS Statement on Dengvaxia® (CYD-TDV) [Internet]. [cited 2021 Mar 20]. Available from: https://www.who.int/vaccine_safety/committee/GACVS-StatementonDengvaxia-CYD-TDV/en/
 35. Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Santhana S, Dye C. Zika : the origin and spread of a mosquito-borne virus. 2016;(February):675–86.
 36. Didier Musso a DJG. Zika virus. *Am Soc Microbiol*. 2016;29(3):313–20.
 37. Martyn K. White, D.Phil., Hassen S. Wollebo, Ph.D., J. David Beckham, M.D. KL, Tyler, Kamel Khalili PD. Zika Virus: An Emergent Neuropathological Agent. *Physiol Behav*. 2016;176(1):100–106.
 38. Organization WH. Zika virus [Internet]. [cited 2021 Mar 22]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
 39. Organization WH. Zika virus disease [Internet]. [cited 2021 Mar 22]. Available from: https://www.who.int/health-topics/zika-virus-disease#tab=tab_1
 40. Organization WH. Guillain–Barré syndrome [Internet]. [cited 2021 Mar 22]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/guillain-barré-syndrome>
 41. Poland GA, Ovsyannikova IG, Kennedy RB. Zika Vaccine Development: Current Status. *Mayo Clin Proc*. 2019;94(12):2572–86.
 42. Wilder-Smith A, Vannice K, Durbin A, Hombach J, Thomas SJ, Thevarjan I, et al. Zika vaccines and therapeutics: Landscape analysis and challenges ahead. *BMC*

- Med. 2018;16(1):1–15.
43. Organization WH. Chikungunya [Internet]. [cited 2021 Mar 23]. Available from: https://www.who.int/health-topics/chikungunya#tab=tab_1
 44. VAIRO F et al. Chikungunya: epidemiology, pathogenesis, clinical features, management, and prevention. *Infect Dis Clin*. 2019;33(4):1003–25.
 45. PAHO/WHO. PAHO/WHO | Factsheet Chikungunya [Internet]. [cited 2021 Mar 23]. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=8303:2013-hoja-informativa-chikungunya&Itemid=40023&lang=en
 46. VU, David M.; JUNGKIND, Donald; LABEAUD AD. Chikungunya virus. *Clin Lab Med*. 2017;37(January):371–82.
 47. Ganesan VK, Duan B, Reid SP. Chikungunya virus: Pathophysiology, mechanism, and modeling. *Viruses*. 2017;9(12):1–14.
 48. Bio-manguinhos/Fiocruz. Chikungunya: sintomas, transmissão e prevenção - Bio-Manguinhos/Fiocruz || Inovação em saúde || Vacinas, kits para diagnósticos e biofármacos [Internet]. [cited 2021 Mar 23]. Available from: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/chikungunya-sintomas-transmissao-e-prevencao>
 49. Mahalingam S, Tharmarajah K, Zaid A. Chikungunya: Vaccines and therapeutics. *F1000Research*. 2017;6(0):2–8.
 50. Chen GL, Coates EE, Plummer SH, Carter CA, Berkowitz N, Conan-Cibotti M, et al. Effect of a Chikungunya Virus-Like Particle Vaccine on Safety and Tolerability Outcomes: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;323(14):1369–77.
 51. Paessler S, Walker DH. Pathogenesis of the viral hemorrhagic fevers. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2013;8(October):411–40.
 52. WHO (World Health Organization). Yellow fever [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 1]. Available from: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/yellow-fever>
 53. OPAS/OMS Brasil. Febre amarela - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde [Internet]. [cited 2021 Aug 1]. Available from: <https://www.paho.org/pt/node/40>
 54. Organization PAHO/ WH. Epidemiological Update: Yellow Fever. PAHO/WHO. 2018.
 55. Luiz ACGR, Caixeta BS, Cruvinel MF, Anjos SPA, Braga SG, Almeida KC de, et al. Movimento Antivacina: a propagação de uma distopia que ameaça a saúde da população brasileira / Antivacin Movement: the spread of a dystopia that threatens the health of the Brazilian population. *Brazilian J Heal Rev*. 2021;4(1):430–41.
 56. Domingues CMAS, Fantinato FFST, Duarte E, Garcia LP. Vacina Brasil e estratégias de formação e desenvolvimento em imunizações. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2019;28(2):1–4.
 57. Harapan H, Ryan M, Yohan B, Abidin RS, Nainu F, Rakib A, et al. Covid-19 and dengue: Double punches for dengue-endemic countries in Asia. *Rev Med Virol*. 2021;31(2):1–9.
 58. do Rosário MS, de Siqueira IC. Concerns about COVID-19 and arboviral (chikungunya, dengue, zika) concurrent outbreaks. *Brazilian J Infect Dis*.

- 2020;24(6):583–4.
59. Mascarenhas MDM, De Araújo Batista FM, Rodrigues MTP, De Alencar Alves Barbosa O, Barros VC. Simultaneous occurrence of COVID-19 and dengue: what do the data show? *Cad Saude Publica*. 2020;36(6).
 60. Ribeiro VST, Telles JP, Tuon FF. Arboviral diseases and COVID-19 in Brazil: Concerns regarding climatic, sanitation, and endemic scenario. *J Med Virol*. 2020;92(11):2390–1.
 61. Marta G. Grech, Paolo D. Sartor, Walter R. Almirón FFL-A. Effect of temperature on life history traits during immature development of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Córdoba city, Argentina. *Acta Trop*. 2015;146(1):1–6.
 62. Lopes N, Nozawa C, Linhares REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2014;5(3):55–64.
 63. Beserra EB, Freitas EM de, Souza JT de, Fernandes CRM, Santos KD. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. *Iheringia Série Zool*. 2009;99(3):281–5.
 64. Funasa. Dengue Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor- Manual de Normas Técnicas. 2001.
 65. IOC. Dengue [Internet]. [cited 2021 Mar 26]. Available from: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/opportunista.html>
 66. Fiocruz. PRINCIPAIS MOSQUITOS DE IMPORTÂNCIA SANITÁRIA NO BRASIL.
 67. Laura de Sene Amâncio Zara A, Maria dos Santos S, Synthia Fernandes-Oliveira E, Gomes Carvalho R, Evelim Coelho G. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiol e Serviços Saúde* [Internet]. 2016;25(2):1–2. Available from: http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000200391&scielo=S2237-96222016000200391
 68. Valle D, Braga I a. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2007;16(2):113–8.
 69. Organization WH. HANDBOOK for Integrated Vector Management Integrated Vector Management (IVM) Vector Ecology and Management (VEM) Department of Control of Neglected Tropical Diseases (NTD) World Health Organization.
 70. MANJARRES-SUAREZ, Alejandra; OLIVERO-VERBEL J. Chemical control of *Aedes aegypti*: a historical perspective. *Rev Costarric Salud Pública*. 2013;22(1):68–75.
 71. Shaalan EAS, Canyon D, Younes MWF, Abdel-Wahab H, Mansour AH. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environ Int*. 2005;31(8):1149–66.
 72. Claudio D'Amato JPMT e OM. DDT (DICLORO DIFENIL TRICLOROETANO): TOXICIDADE E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL- UMA REVISÃO. *Quim Nova*. 2002;25(6):995–1002.
 73. Saude M da. Ministério da Saúde [Internet]. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt0500_12_03_2009.html
 74. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol e Serviços Saúde* [Internet]. 2007;16(4):295–302. Available from:

- http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742007000400007&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
75. Dos Santos Dias L, MacOris MDLDG, Andrighetti MTMO, Otrera VCG, Dias ADS, Bauzer LGSDR, et al. Toxicity of spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in Brazil. *PLoS One*. 2017;12(3):1–15.
 76. Viana-Medeiros PF, Bellinato DF, Valle D. Laboratory selection of *Aedes aegypti* field populations with the organophosphate malathion: Negative impacts on resistance to deltamethrin and to the organophosphate temephos. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(8):1–20.
 77. Denise Valle, Denise Nacif Pimenta RV da C. *Dengue: teorias e práticas* [Internet]. 2015 [cited 2021 Mar 26]. Available from: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=9XNSDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA93&dq=Controle+químico+de+Aedes+aegypti,+resistência+a+inseticidas+e+alternativa&ots=vJHw0OARAX&sig=VqaBVUcWuqyU9iPHxnoBOU3LjZg#v=onepage&q&f=false>
 78. Fonseca EOL, Macoris M de L da G, Santos RF Dos, Morato DG, Isabel MDSS, Cerqueira NA, et al. Estudo experimental sobre a ação de larvicidas em populações de *Aedes aegypti* do município de Itabuna, Bahia, em condições simuladas de campo. *Epidemiol e Serv Saude Rev do Sist Unico Saude do Bras*. 2019;28(1):e2017316.
 79. Fernandes KM, Tomé HVV, Miranda FR, Gonçalves WG, Pascini TV, Serrão JE, et al. *Aedes aegypti* larvae treated with spinosad produce adults with damaged midgut and reduced fecundity. *Chemosphere*. 2019;221:464–70.
 80. Ministério da Saúde. NOTA INFORMATIVA Nº 103/2019-CGAR/DEIDT/SVS/MS [Internet]. Available from: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/novembro/27/Nota-Informativa-103-2019-manejo-de-resistencia.pdf>
 81. Ministério da Saúde. Aplicação espacial de inseticidas [Internet]. [cited 2021 Mar 26]. Available from: <https://www-hmg.saude.gov.br/saude-de-a-z/controle-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/aplicacao-espacial-de-inseticidas>
 82. Ministério da Saúde. Manual sobre Medidas de Proteção à Saúde dos Agentes de Combate às Endemias [Internet]. 2019 [cited 2021 Mar 26]. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/>
 83. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 38, 2020 [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 26]. Available from: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/outubro/23/boletim_epidemiologico_svs_41.pdf
 84. CONASEMS. Informações sobre insumos para o controle de larvas do *Aedes aegypti* - CONASEMS [Internet]. [cited 2021 Mar 26]. Available from: https://www.conasems.org.br/orientacao_ao_gestor/informacoes-sobre-insumos-para-o-controle-de-larvas-do-aedes-aegypti/
 85. Ministério da Saúde. NOTA TÉCNICA Nº 1/2020 CGAR/DEIDT/SVS/MS [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 26]. Available from: [https://dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/dengue/SEI_MS - 0013726537 - Nota Técnica \(1\).pdf](https://dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/dengue/SEI_MS - 0013726537 - Nota Técnica (1).pdf)

86. Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Araújo SC, Martins AJ, Lima JBP, Valle D. Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *aedes aegypti* populations. *Biomed Res Int*. 2016;2016.
87. Santos M, REYES F. Piretróides – Uma Visão Geral. *Alim Nutr* [Internet]. 2008;18(3):339–49. Available from: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewArticle/173>
88. Achee NL, Grieco JP, Vatandoost H, Seixas G, Pinto J, Ching-Ng L, et al. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(1):1–22.
89. Organization WH. Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations Interim guidance for entomologists [Internet]. 2016 [cited 2021 Mar 26]. Available from: www.who.int
90. Oberemok VV, Laikova KV, Gninenko YI, Zaitsev AS, Nyadar PM, Adeyemi TA. A short history of insecticides. *J Plant Prot Res*. 2015;55(3):221–6.
91. Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR, Williamson MS. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*. 2007;59(3):151–62.
92. Alessandra M, Guillermo F, Reyes R. PIRETRÓIDES – UMA VISÃO GERAL. 2007;339–49.
93. Kishore N, Mishra BB, Tiwari VK, Tripathi V, Lall N. Natural products as leads to potential mosquitocides. *Phytochem Rev*. 2014;13(3):587–627.
94. Veitch GE, Boyer A, Ley S V. The azadirachtin story. *Angew Chemie - Int Ed*. 2008;47(49):9402–29.
95. Mordue AJ, Morgan ED, Nisbet AJ. Azadirachtin, a Natural Product in Insect Control. *Compr Mol Insect Sci*. 2005;6–6:117–35.
96. Dua VK, Pandey AC, Raghavendra K, Gupta A, Sharma T, Dash AP. Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. *Malar J*. 2009;8(1):2–7.
97. Benelli G, Canale A, Toniolo C, Higuchi A, Murugan K, Pavela R, et al. Neem (*Azadirachta indica*): towards the ideal insecticide? *Nat Prod Res* [Internet]. 2017;31(4):369–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1214834>
98. Ministério da Saúde. Produtos saneantes para o combate ao *Aedes aegypti* — Português (Brasil) [Internet]. [cited 2021 Mar 31]. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/saneantes/aedes-aegypti>
99. Pandiyan GN, Mathew N, Munusamy S. Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019;174(November 2018):549–56.
100. Sharma A, Tilak R, Sisodia N. Evaluation of bioactivity of aqueous extracts of *Bougainvillea spectabilis*, *Saraca asoca*, and *Chenopodium album* against immature forms of *Aedes aegypti*. *Med J Armed Forces India*. 2019;75(3):308–11.
101. Li G, Lou HX. Strategies to diversify natural products for drug discovery. *Med Res Rev*. 2018;38(4):1255–94.
102. NETO JAR et. al. Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. *J Ethnopharmacol*. 2020;112547.
103. Cortelo PC, Demarque DP, Dusi RG, Albernaz LC, Braz-Filho R, Goncharova EI, et

- al. A Molecular Networking Strategy: High-Throughput Screening and Chemical Analysis of Brazilian Cerrado Plant Extracts against Cancer Cells. *Cells*. 2021;10(3):691.
104. Cardoso EFL, Alessandro I, Cardoso E, Luiz L. Bioactive compounds found in Brazilian Cerrado fruits. [Internet]. Vol. 16, *International journal of molecular sciences*. 2015. p. 23760–83. Available from: <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26473827>
 105. Arruda HS, Pastore GM, Pastore GM. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of nutrients and bioactive compounds for food and non-food purposes: A comprehensive review. *Food Res Int*. 2019;123:450–80.
 106. Aminimoghadamfarouj N, Nematollahi A, Wiart C. Annonaceae: Bio-resource for tomorrow's drug discovery. *J Asian Nat Prod Res*. 2011;13(5):465–76.
 107. Lúcio ASSC, Almeida JRG da S, da-Cunha EVL, Tavares JF, Barbosa Filho JM. Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. Vol. 74, *Alkaloids: Chemistry and Biology*. 2015. 233–409 p.
 108. Lopes J de C, Mello-Silva R. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. *Rev Bras Frutic* [Internet]. 2014;36(spe1):125–31. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452014000500015&lng=pt&tlng=pt
 109. Biba VS, Amily A, Sangeetha S, Remani P. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activity of annonaceae family. *World J Pharm Pharm Sci*. 2014;3(3):1595–604.
 110. Attiq A, Jalil J, Husain K. Annonaceae: Breaking the wall of inflammation. Vol. 8, *Frontiers in Pharmacology*. 2017.
 111. Tundis R, Xiao J, Loizzo MR. *Annona* species (Annonaceae): a rich source of potential antitumor agents? *Ann N Y Acad Sci*. 2017;1398(1):30–6.
 112. QUÍLEZ AM et al. Potential therapeutic applications of the genus *Annona*: Local and traditional uses and pharmacology. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2018;225:244–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dineu.2015.08.001>
 113. RAINER H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A. S. T. -H. IL. *Ann des Naturhistorischen Museums Wien Ser B für Bot und Zool*. 2006;191–205.
 114. Osorio E, Arango GJ, Jiménez N, Alzate F, Ruiz G, Gutiérrez D, et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *J Ethnopharmacol*. 2007;111(3):630–5.
 115. Brasil F do. *Annona exsucca* DC. [Internet]. [cited 2021 Apr 5]. Available from: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB110244>
 116. ALCÂNTARA JM et al. Constituintes voláteis das folhas de três espécies de Annonaceae. CD ROOM VII SBOE na Amaz Ciência, Tecnol Inovação na Amaz. 2013;
 117. Pandey N, Barve D. Phytochemical and pharmacological review on *Annona squamosa* Linn. *Int J Res Pharm Biomed Sci*. 2011;2(4):1404–12.
 118. Ma C, Chen Y, Chen J, Li X, Chen Y. A Review on *Annona squamosa* L.: Phytochemicals and Biological Activities. *Am J Chin Med*. 2017;45(5):933–64.

119. Alves CCF, Oliveira JD, Estevam EBB, Xavier MN, Nicolella HD, Furtado RA, et al. Antiproliferative activity of essential oils from three plants of the Brazilian cerrado: *Campomanesia adamantium* (myrtaceae), *Protium ovatum* (burseraceae) and *Cardiopetalum calophyllum* (annonaceae). *Brazilian J Biol.* 2020;80(2):290–4.
120. Xavier MN, Alves CCF, Cazal C de M, Santos NH. Chemical composition of the volatile oil of *Cardiopetalum calophyllum* collected in the Cerrado area. *Ciência Rural.* 2016;46(5):937–42.
121. Xavier MN, Alves JM, Carneiro NS, Souchie EL, Da Silva EAJ, Martins CHG, et al. Composição química do óleo essencial de *cardiopetalum calophyllum* schldl. (Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. *Rev Virtual Quim.* 2016;8(5):1433–48.
122. Rodrigues AMS, De Paula JE, Degallier N, Molez JF, Espíndola LS. Larvicidal activity of some cerrado plants extracts against *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc* [Internet]. 2006;22(2):314–7. Available from: [http://www.bioone.org/doi/abs/10.2987/8756-971X\(2006\)22\[314:LAOSCP\]2.0.CO;2#.UucEDPWKhO4.mendeley](http://www.bioone.org/doi/abs/10.2987/8756-971X(2006)22[314:LAOSCP]2.0.CO;2#.UucEDPWKhO4.mendeley)
123. Costa MS et al. Anonáceas provocam mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)¹. *Rev Bras Biociências.* 2013;v. 11, n 2:184–90.
124. Silva DB, Tulli ECO, Garcez WS, Nascimento EA. Chemical Constituents of the Underground Stem Bark of. *J Braz Chem Soc.* 2007;18(8):1560–5.
125. VALÉRIA SOARES DE ARAÚJO PINHO F et al. Phytochemical Constituents and Toxicity of *Duguetia furfuracea* Hydroalcoholic Extract in *Drosophila melanogaster*. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2014;2014.
126. PINHO FVS de A et al. Phytochemical Composition, Antifungal and Antioxidant Activity of *Duguetia furfuracea* A. St.-Hill.pdf. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016.
127. da Silva DB, Tulli ECO, Militão GCG, Costa-Lotufo L V., Pessoa C, de Moraes MO, et al. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. *Phytomedicine.* 2009;16(11):1059–63.
128. Benth AS, Cruz V, Aparecida C, Kassuya L, Andréa C, Cardoso L, et al. Antioxidant, anti-rheumatic and anti-inflammatory investigation of extract. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2018;211(July 2017):9–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.019>
129. de Mesquita ML, Grellier P, Mambu L, de Paula JE, Espindola LS. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *J Ethnopharmacol.* 2007;110(1):165–70.
130. Maia JGS, Andrade EHA, da Silva ACM, Oliveira J, Carreira LMM, Araújo JS. Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopia* species. *Flavour Fragr J.* 2005;20(5):474–7.
131. NASCIMENTO MNG et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Xylopia aromatica* (Annonaceae) flowers and leaves. *Rev Virtual Quim.* 2018;10(5):1578–90.
132. Lopes J de C, Mello-Silva R. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. *Rev Bras Frutic.* 2014;36(SPEC. EDITION 1):125–31.
133. T. COLMAN-SAZARBITO, J. ZMIBRANO NRF. Bioactive Annonaceous Acetogenins From the Bark of *Xylopia aromatica*. *J Nat Prod.* 1994;57(4):486–93.

134. Martins D, Hamerski L, Alvarenga SAV, Roque NF. Labdane dimers from *Xylopia atomatica*. *Phytochemistry*. 1999;51(6):813–7.
135. Moraes MPL, Roque NF. Diterpenes from the fruits of *Xylopia aromatica*. *Phytochemistry*. 1988;27(10):3205–8.
136. Jr S. Plantas do Gênero *Xylopia* : Composição Química e Potencial Farmacológico. 2015;(2013):814–26.
137. Garavito G, Rincón J, Arteaga L, Hata Y, Bourdy G, Gimenez A, et al. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2006;107(3):460–2.
138. de Mesquita ML, de Paula JE, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, et al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *J Ethnopharmacol*. 2009;123(3):439–45.
139. De Mesquita ML, Desrivot J, Bories C, Fournet A, De Paula JE, Grellier P, et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(7):783–7.
140. Isabel C. Moreira, Nídia F. Roque, Karla Contini JHGL. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata* (Annonaceae). *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17(1):55–8.
141. Moreira IC, Roque NF, Vilegas W, Zalewski CA, Lago JHG, Funasaki M. Genus *Xylopia* (Annonaceae): Chemical and biological aspects. *Chem Biodivers*. 2013;10(11):1921–43.
142. Moreira IC, Lago JHG, Roque NF. Alkaloid, flavonoids and terpenoids from leaves and fruits of *Xylopia emarginata* (Annonaceae). *Biochem Syst Ecol*. 2003;31(5):535–7.
143. Colman-Saizarbitoria T, Montilla L, Rodriguez M, Castillo A, Hasegawa M. Xymarginatin: A new acetogenin inhibitor of mitochondrial electron transport from *Xylopia emarginata* Mart., Annonaceae. *Rev Bras Farmacogn*. 2009;19(4):871–5.
144. Coelho AAM, de Paula JE, Espíndola LS. Efeito de extratos de plantas do Cerrado em *Dipetalogaster maxima* (Uhler) (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Bras Entomol*. 2009;53(3):444–51.
145. Silva EM, Valencia A, Grossi-de-Sá MF, Rocha TL, Freire É, de Paula JE, et al. Inhibitory action of Cerrado plants against mammalian and insect α -amylases. *Pestic Biochem Physiol*. 2009;95(3):141–6.
146. Yuliana ND, Khatib A, Choi YH, Verpoorte R. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phyther Res*. 2011;25(2):157–69.
147. Demarque DP, Dusi RG, de Sousa FDM, Grossi SM, Silvério MRS, Lopes NP, et al. Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–9.
148. de Sousa FDM, Grossi SM, Monteiro GC, Demarque DP, Espindola LS. Dereplication and Isolation of Larvicidal Compounds From Annonaceae Species Against *Aedes aegypti*. *Rev Bras Farmacogn*. 2020;30(1):123–6.
149. Grossi SM. ESTUDO DE PLANTA DA FAMÍLIA ANNONACEAE PARA ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIA LARVICIDA EM *Aedes aegypti*. 2018.
150. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test [Internet]. OECD; 2013 [cited 2021 Apr 15]. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2). Available

- from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en
151. Organization WH. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides [Internet]. World Health Organization. 2005. p. 1–41. Available from: http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf?ua=1
 152. Paes MM, Vega MRG, Cortes D, Kanashiro MM. Potencial Citotóxico das Acetogeninas do Gênero *Annona*. *Rev Virtual Quim*. 2016;8(3):945–80.
 153. Costa MS, Santana AEG, Oliveira LL, Serrão JE. Toxicity of squamocin on *Aedes aegypti* larvae, its predators and human cells. *Pest Manag Sci*. 2017;73(3):636–40.
 154. Bonneau N, Cynober T, Jullian JC, Champy P. ¹H qNMR Quantification of Annonaceous Acetogenins in Crude Extracts of *Annona muricata* L. Fruit Pulp. *Phytochem Anal*. 2017;28(4):251–6.
 155. Costa MS, Cossolin JFS, Pereira MJB, Sant’Ana AEG, Lima MD, Zanuncio JC, et al. Larvicidal and cytotoxic potential of squamocin on the midgut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Vol. 6, *Toxins*. 2014. p. 1169–76.
 156. Da Silva Costa M, De Paula SO, Martins GF, Zanuncio JC, Santana AEG, Serrão JE. Multiple modes of action of the squamocin in the midgut cells of *aedes aegypti* larvae. Vol. 11, *PLoS ONE*. 2016.
 157. DA SILVA COSTA M et al. Modes of action of squamocin in the anal papillae of *Aedes aegypti* larvae. *Physiol Mol Plant Pathol* [Internet]. 2018;101:172–7. Available from: <https://doi.org/10.1080/17476348.2020.1754800>
 158. RODRIGUES AM et al. Larvicidal and Enzymatic Inhibition Effects of *Annona Muricata* Seed Extract and Main Constituent Annonacin against *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus* (Diptera Culicidae).pdf.
 159. Höllerhage, M., Rösler, T. W., Berjas, M., Luo, R., Tran, K., Richards, K. M., ... & Smith RE. Neurotoxicity of Dietary Supplements from Annonaceae Species. *Int J Toxicol*. 2015;34(6):543–50.
 160. Almudena Bermejo, Bruno Figadere, Maria-Carmen Zafra-Polo, Isabel Barrachina, Ernesto Estornell DC. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod reports*,. 2005;22(2):269–303.
 161. Moreira IC, Roque NF, Karla Contini JHGL. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata* (Annonaceae). *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17(1):55–8.
 162. Alice M, Falcão P, Souza LS De, Dolabella SS, Guimarães AG, Isabel C, et al. Zebrafish as an alternative method for determining the embryo toxicity of plant products : a systematic review. *Environ Sci Pollut Res*. 2018;25(35):35015–26.
 163. AGUIAR JCD et al. Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. *Nat Prod Commun*. 2010;5(12).
 164. Fernanda G, Oliveira S, Arau CDS. The Genus *Hymenaea* (Fabaceae): A Chemical and Pharmacological Review. *Stud Nat Prod Chem*. 2018;58:339–88.
 165. Sadgrove, Nicholas J., Haytham Senbill, Ben-Erik Van Wyk BWG. New Labdanes with Antimicrobial and Acaricidal Activity: Terpenes of *Callitris* and *Widdringtonia* (Cupressaceae). *Antibiotics*. 2020;9(4):173.
 166. Breno Múmic Sequeira, Romeu Machado Rocha Neto, Lúzio Gabriel Bocalon

- Flauzino, Daniele da Silva Ferreira, Lizandra Guidi Magalhães, Patrícia Mendonça Pauletti, Ana Helena Januário, Márcio Luis Andrade e Silva WRC. ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Hymenaea courbaril* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA. In: Atena Editora, editor. As Ciências Exatas e da Terra no Século XXI 2. 2nd ed. 2019. p. 101–14.
167. Aguiar AR, Alvarenga ES, Silva EMP, Farias ES, Picanço MC. Synthesis, insecticidal activity, and phytotoxicity of novel chiral amides. *Pest Manag Sci*. 2019;75(6):1689–96.
168. Lopes, Mayara Cristina, Elson Santiago Alvarenga, Alex Ramos Aguiar, Izailda Barbosa dos Santos B, Adriano G, Silva D, Arcanjo, Lucas de Paula MCP. INSECTICIDAL ACTIVITY OF DIENAMIDES ON CABBAGE CATERPILLAR AND BENEFICIAL INSECTS. *Quim Nova*. 2018;41(4):375–9.
169. Kumar V, Eswara Reddy SG, Bhardwaj A, Dolma SK, Kumar N. Larvicidal activity and structure activity relationship of cinnamoyl amides from *Zanthoxylum armatum* and their synthetic analogues against diamondback moth, *Plutella xylostella*. *EXCLI J*. 2016;15:229–37.
170. Demarque DP, Merten C. Intra- versus Intermolecular Hydrogen Bonding: Solvent-Dependent Conformational Preferences of a Common Supramolecular Binding Motif from ¹H NMR and Vibrational Circular Dichroism Spectra. *Chem - A Eur J*. 2017;23(71):17915–22.
171. Martim JKP, Maranhão LT, Costa-casagrande TA. Review : Role of the chemical compounds present in the essential oil and in the extract of *Cordia verbenacea* DC as an anti-inflammatory , antimicrobial and healing product: Essential oil–extract, anti-inflammatory, antimicrobial and healing evaluation. *J Ethnopharmacol*. 2020;
172. Antrell CLC, Lun JAK, Ryson CTB, Obaisy MK, Uke SOD. Isolation and Identification of Mosquito Bite Deterrent Terpenoids from Leaves of American (*Callicarpa americana*) and Japanese (*Callicarpa japonica*) Beautyberry. 2005;5948–53.
173. Kamilla Felipe do Nascimentoa, Flora Martinez Figueira Moreirab, Joyce Alencar Santosb, Candida Aparecida Leite Kassuyab, Julio Henrique Rosa Crodab, c, Claudia Andrea Lima Cardosod, Maria do Carmo Vieirae, Ana Lúcia Tasca Góis Ruizf, Mary Ann Fogliof, Jo ASNF. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. *J Ethnopharmacol*. 2018;210:351–8.
174. Taylor P, Andrade-neto M, Santiago GMP, Ferreira YS. Chemical Composition and Larvicidal Effects of Essential Oil from *Bauhinia acuruana* (Moric) against *Aedes aegypti* Chemical Composition and Larvicidal Effects of Essential Oil from *Bauhinia acuruana* (Moric) against *Aedes aegypti*. *J Essent Oil Res*. 2011;23(5):59–62.
175. Lima RN, Ribeiro AS, Santiago GMP, Costa COS, Soares MB, Bezerra DP, et al. Antitumor and *Aedes aegypti* Larvicidal Activities of Essential Oils From *Piper klotzschianum* , *P. hispidum* , and. *Nat Prod Commun*. 2019;14(7).
176. Feitosa EMA, Santiago GMP, Lemos TLG De, Lima JQ, Malcher GT, Braz-filho R. Chemical Composition and Larvicidal Activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). *J Braz Chem Soc*. 2009;20(2):375–8.
177. Heidi Luise Schulte, Joao Paulo Barreto Sousa, Diego Sousa-Moura, Cesar Koppe

- Grisolia LSE. Chemosphere Degradation evaluation and toxicity profile of bilobol , a promising eco-friendly larvicide. *Chemosphere*. 2021;263.
178. MAGALHÃES NMG. *Vismia gracilis* Hieron. (Hypericaceae): caracterizações químicas e atividade biológica em *Aedes aegypti*. 2020.
 179. Rahman RU, Souza B, Uddin I, Carrara L, Brito LP, Costa MM, et al. Insecticide resistance and underlying targets-site and metabolic mechanisms in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Lahore, Pakistan. *Sci Rep*. 2021;11(1):1–15.
 180. Lumjuan N, Stevenson BJ, Prapanthadara L aied, Somboon P, Brophy PM, Loftus BJ, et al. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochem Mol Biol*. 2007;37(10):1026–35.
 181. Enayati AA, Ranson H, Hemingway J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol*. 2005;14(1):3–8.
 182. Vontas, J. G., Small, G. J., Nikou, D. C., Ranson, H., & Hemingway J. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathioneS-transferase involved in insecticide resistance from the rice brownplanthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochem J*. 2002;362(2):329–37.
 183. Helvecio E, Romão TP, de Carvalho-Leandro D, de Oliveira IF, Cavalcanti AEHD, Reimer L, et al. Polymorphisms in GSTE2 is associated with temephos resistance in *Aedes aegypti*. *Pestic Biochem Physiol*. 2020;165.
 184. Ranson H, Rossiter L, Ortelli F, Jensen B, Wang X, Roth CW, et al. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J*. 2001;359(2):295–304.
 185. Saavedra-Rodriguez, K., Strode, C., Flores, A. E., Garcia-Luna, S., Reyes-Solis, G., Ranson, H., ... & Black IV WC. Differential transcription profiles in *Aedes aegypti* detoxification genes after temephos selection. *Insect Mol Biol [Internet]*. 2014;23(2):199–215. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 186. Df Barbosa J, Silva VB, Ericles P´, Alves B, Gumina G, Santos RL, et al. Structure-activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Pest Manag Sci [Internet]*. 2012;68(11):1478–83. Available from: www.soci.org
 187. Tudela J, Santos O, Silva D, Kato MJ, Alves A, Filho P, et al. Larvicidal Activity of Essential Oils From Piper Species Against Strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Resistant to Pyrethroids. *Front Plant Sci [Internet]*. 2021;12. Available from: www.frontiersin.org
 188. Manwill Id PK, Kalsi M, Wu S, Martinez Rodriguez EJ, Cheng Id X, Piermarini Id PM, et al. Semi-synthetic cinnamodial analogues: Structural insights into the insecticidal and antifeedant activities of drimane sesquiterpenes against the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis [Internet]*. 2020;14(2). Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008073>
 189. Pinzi L, Rastelli G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18).
 190. Lionta E, Spyrou G, Vassilatis DK, Cournia Z. Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. *Curr Top Med Chem*. 2014;14(16):1923–38.

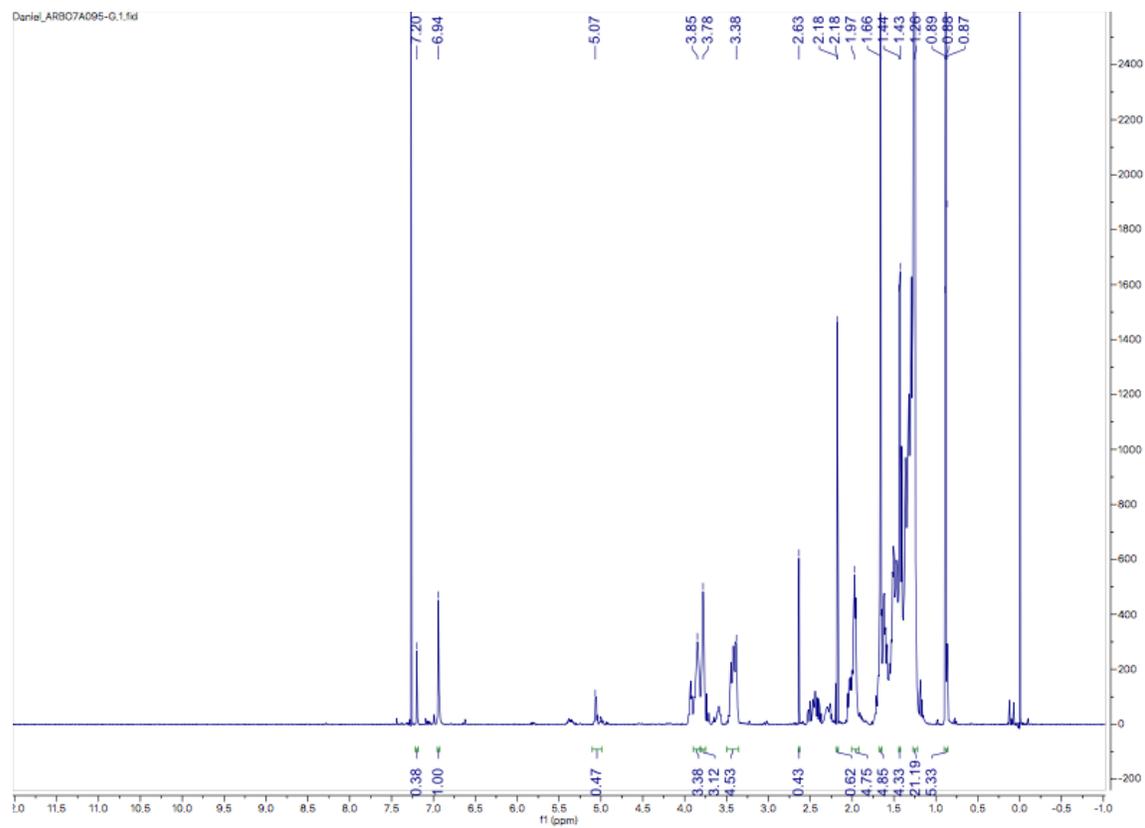
191. Eckelbarger JD, Parker MH, Yap MCH, Buysse AM, Babcock JM, Hunter R, et al. Synthesis and biological activity of a new class of insecticides: the N-(5-aryl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)amides. *Pest Manag Sci.* 2017;73(4):761–73.
192. Licciardi S, Herve JP, Darriet F, Hougard JM, Corbel V. Lethal and behavioural effects of three synthetic repellents (DEET, IR3535 and KBR 3023) on *Aedes aegypti* mosquitoes in laboratory assays. *Med Vet Entomol.* 2006;20(3):288–93.
193. Maia RT, Nadvorny D. Molecular docking of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* glutathione S-Transferases epsilon 2 (GSTE2) against usnic acid: An evidence of glutathione conjugation. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2014;57(5):689–94.
194. Oda A, Tsuchida K, Takakura T, Yamaotsu N, Hirono S. Comparison of consensus scoring strategies for evaluating computational models of protein-ligand complexes. *J Chem Inf Model.* 2006;46(1):380–91.
195. Sanil D, Shetty V, Shetty NJ. Differential expression of glutathione s-transferase enzyme in different life stages of various insecticide-resistant strains of *Anopheles stephensi*: A malaria vector. *J Vector Borne Dis.* 2014;51(2):97–105.
196. Goindin D, Delannay C, Gelasse A, Ramdini C, Gaude T, Faucon F, et al. Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). *Infect Dis Poverty.* 2017;6(1):1–15.
197. Francis S, Karla SR, Perera R, Paine M, Black WC, Delgoda R. Insecticide resistance to permethrin and malathion and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from St. Andrew Jamaica. Vol. 12, *PLoS ONE.* 2017.
198. Viana-Medeiros PF, Bellinato DF, Valle D. Laboratory selection of *Aedes aegypti* field populations with the organophosphate malathion: Negative impacts on resistance to deltamethrin and to the organophosphate temephos. Vol. 12, *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2018.
199. Dos Santos CR, De Melo Rodovalho C, Jablonka W, Martins AJ, Lima JBP, Dos Santos Dias L, et al. Insecticide resistance, fitness and susceptibility to Zika infection of an interbred *Aedes aegypti* population from Rio de Janeiro, Brazil. *Parasites and Vectors.* 2020;13(1).
200. Adolphi A, Poulton B, Anthousi A, Macilwee S, Ranson H, Lycett GJ. Functional genetic validation of key genes conferring insecticide resistance in the major African malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(51):25764–72.
201. Yang L, Norris EJ, Jiang S, Bernier UR, Linthicum KJ, Bloomquist JR. Reduced effectiveness of repellents in a pyrethroid-resistant strain of *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) and its correlation with olfactory sensitivity. *Pest Manag Sci.* 2020;76(1):118–24.
202. Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, et al. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol.* 2003;17(1):87–94.
203. Rodríguez MM, Bisset J, Ruiz M, Soca A. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J Med Entomol.* 2002;39(6):882–8.

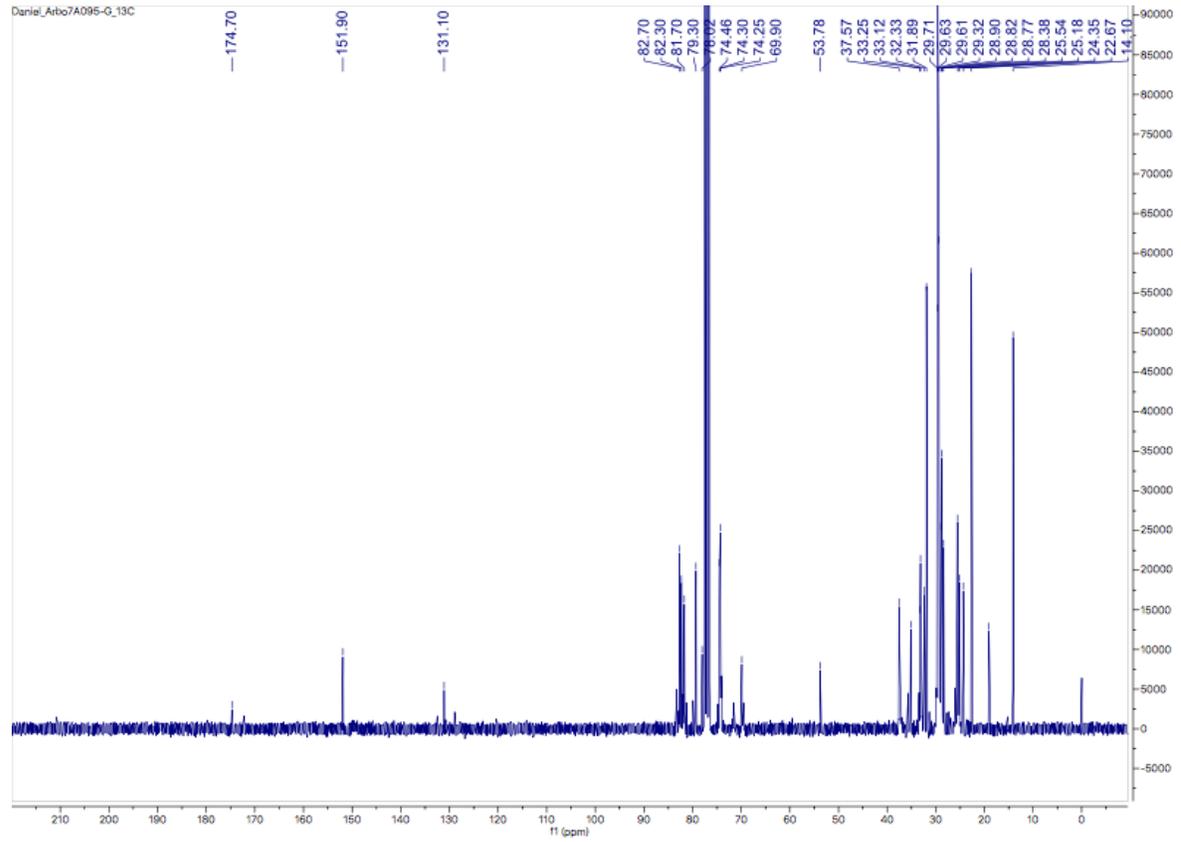
204. Angélica Aponte, R. Patricia Penilla, Américo D. Rodríguez CBO. Mechanisms of pyrethroid resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* from Colombia. *Acta Trop.* 2019;191:146–56.
205. Maia PCR. Investigação do comportamento de tolerância ao n,n-dietilmetilbenzamida (DEET) em populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Universidade de São Paulo Faculdade de Saúde Pública. 2008.
206. Hellestad, Vanessa J., Bruce A. Witthuhn AMF. The insect repellent DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzamide) increases the synthesis of glutathione S-transferase in cultured mosquito cells. *Cell Biol Toxicol.* 2011;27(2):149–57.
207. Koou S-Y, Chong C-S, Vythilingam I, Lee C-Y, Ng L-C. Insecticide resistance and its underlying mechanisms in field populations of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) in Singapore. *Parasit Vectors.* 2014;7(1):471.
208. Jankowska M, Rogalska J, Wyszowska J, Stankiewicz M. Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System-A Review. *Molecules* [Internet]. 2018;23(1). Available from: www.mdpi.com/journal/molecules
209. Chakraborty G, Shin J, Nguyen QT, Harikishore A, Baek K, Yoon HS. Solution structure of FK506-binding protein 12 from *Aedes aegypti*. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 2012;80(10):2476–81.
210. Rajan S, Saw KQ, Nguyen QT, Baek K, Yoon HS. High-resolution crystal structure of FKBP12 from *Aedes aegypti*. *Protein Sci.* 2012;21(7):1080–4.
211. Jones DNM, Wang J, Murphy EJ. Complete NMR chemical shift assignments of odorant binding protein 22 from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, bound to arachidonic acid. *Biomol NMR Assign.* 2019;13(2):279.
212. Kythreoti G, Sdralia N, Tsitoura P, Papachristos DP, Michaelakis A, Karras V, et al. Volatile allosteric antagonists of mosquito odorant receptors inhibit human-host attraction. *J Biol Chem.* 2021;296:1–14.
213. Wang J, Murphy EJ, Nix JC, Jones DNM. *Aedes aegypti* Odorant Binding Protein 22 selectively binds fatty acids through a conformational change in its C-terminal tail. *Sci Rep.* 2020;10(1).
214. Conway MJ, Londono-Renteria B, Troupin A, Watson AM, Klimstra WB, Fikrig E, et al. *Aedes aegypti* D7 Saliva Protein Inhibits Dengue Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(9).
215. Kim IH, Pham V, Jablonka W, Goodman WG, Ribeiro JMC, Andersen JF. A mosquito hemolymph odorant-binding protein family member specifically binds juvenile hormone. *J Biol Chem.* 2017;292(37):15329–39.
216. Kim IH, Castillo JC, Aryan A, Martin-Martin I, Nouzova M, Noriega FG, et al. A mosquito juvenile hormone binding protein (mJHBP) regulates the activation of innate immune defenses and hemocyte development. *PLoS Pathog.* 2020;16(1).
217. Viana J de O, Félix MB, Maia MDS, Serafim V de L, Scotti L, Scotti MT. Drug discovery and computational strategies in the multitarget drugs era. *Brazilian J Pharm Sci.* 2018;54(Special Issue):1–25.
218. Barros ME de SB. Estudo de Docking Molecular, Síntese e Atividade Biológica de Análogos da (-)-Massoialactona e da Combretastatina A-4 [Internet]. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco. 2015. Available from: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/186602/PPAU0156->

- D.pdf?sequence=1&isAllowed=y%0Ahttp://journal.stainkudus.ac.id/index.php/equilibrium/article/view/1268/1127%0Ahttp://www.scielo.br/pdf/rae/v45n1/v45n1a08%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j
219. IASMIN RAMOS DA SILVA. ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR E TRIAGEM VIRTUAL BASEADOS NA INTERAÇÃO RECEPTOR-LIGANTE PARA A IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS CANDIDATOS À INIBIÇÃO DA CATECOL-OMETILTRANSFERASE COMO TRATAMENTO POTENCIAL DA DOENÇA DE PARKINSON. 2019.
 220. Santos LHS, Ferreira RS, Caffarena ER. Integrating molecular docking and molecular dynamics simulations. *Docking screens drug Discov.* 2019;2053.
 221. Salmaso V, Moro S. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. Vol. 9, *Frontiers in Pharmacology.* 2018.
 222. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de novos 3,4- diaril-4-oxo-pirimidina-5-carbonitrilas. 2003.
 223. Kelly B. SÍNTESE DE UM NOVO DERIVADO DE PIRIMIDINA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA, ANTICHAGÁSICA E ANTIMICROBIANA ESEU POTENCIAL SINÉRGICO FRENTE ÀS BACTÉRIAS *Acinetobacter baumannii* E *Staphylococcus aureus*. 2020.
 224. Falcão EPDS, De Melo SJ, Srivastava RM, Catanho MTJDA, Do Nascimento SC. Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-(3- and 4-(N-phthalimidophenyl)) pyrimidines. *Eur J Med Chem.* 2006;41(2):276–82.
 225. do Monte ZS, Monteiro MRL, Borba CBA, de Gusmão NB, Falcão EP da S, Silva RO, et al. Synthesis of 4-amino-2,6-diaryl-5-cyanopyrimidines as antimicrobial agents. *Synth Commun.* 2016;46(11):983–91.
 226. Monte ZS, Navarro DMAF, Aguiar JCROF, Nascimento JS, Scotti MT, Scotti L, et al. Pyrimidine derivatives: QSAR studies of larvicidal activity against *aedes aegypti*. *J Braz Chem Soc.* 2020;31(7):1531–40.
 227. ZENAIDE SEVERINA DO MONTE. Pirimidinas: De Potenciais Fármacos a Marcadores Fluorescentes. 2016.
 228. Yousefian M, Rafiee Z. Cu-metal-organic framework supported on chitosan for efficient condensation of aromatic aldehydes and malononitrile. *Carbohydr Polym.* 2020;228(September 2019).
 229. Hu Y, Guan Z, He YH, Louwagie N, Yao MJ. L-Arginine as a cost-effective and recyclable catalyst for the synthesis of α,β -unsaturated nitriles and ketones in an ionic liquid. *J Chem Res.* 2010;(1):22–4.
 230. Ikeda, H., Kawabe, Y., Sakai, T., & Kawasaki K. Second harmonic generation in nonbenzenoid aromatics. *Chem Phys Lett.* 1989;157(6):576–8.
 231. Maria Renata Leite Monteiro. 6-Aril-pirimidinas contendo uma função imida: síntese e avaliação das propriedades antimicrobianas. 2005.
 232. Liu XH, Wang Q, Sun ZH, Wedge DE, Becnel JJ, Estep AS, et al. Synthesis and insecticidal activity of novel pyrimidine derivatives containing urea pharmacophore against *Aedes aegypti*. *Pest Manag Sci.* 2017;73(5):953–9.

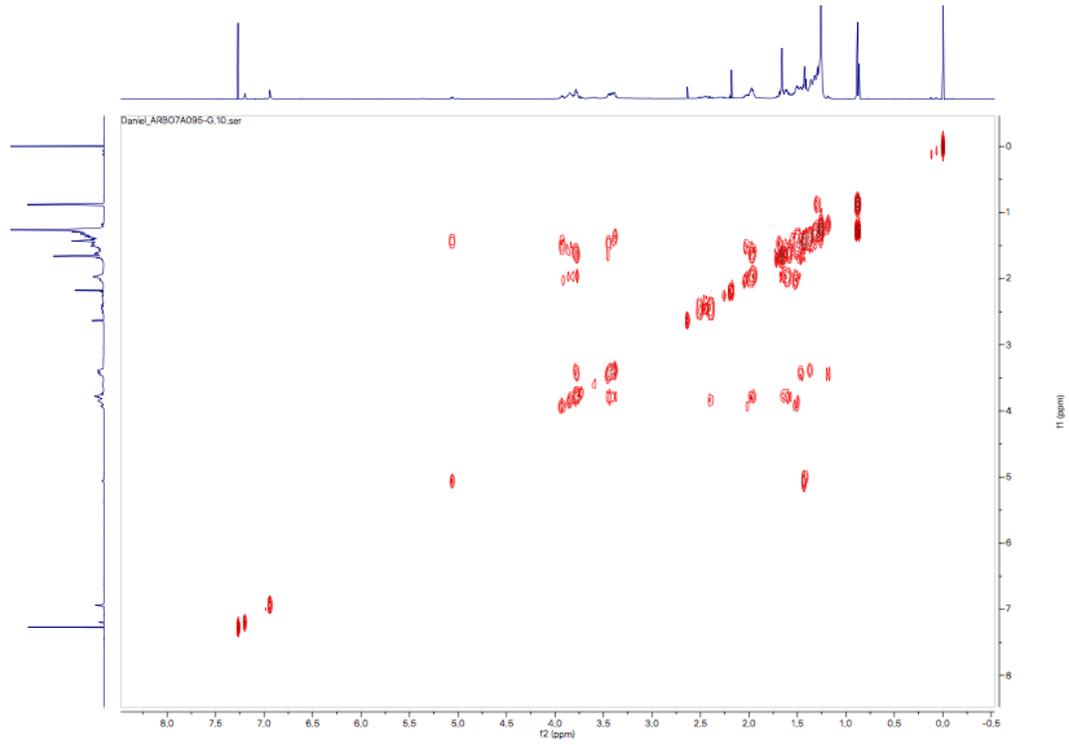
APÊNDICE - A- ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL ACETOGENINAS

Apêndice A1 - Espectro de ^1H B7.2.1

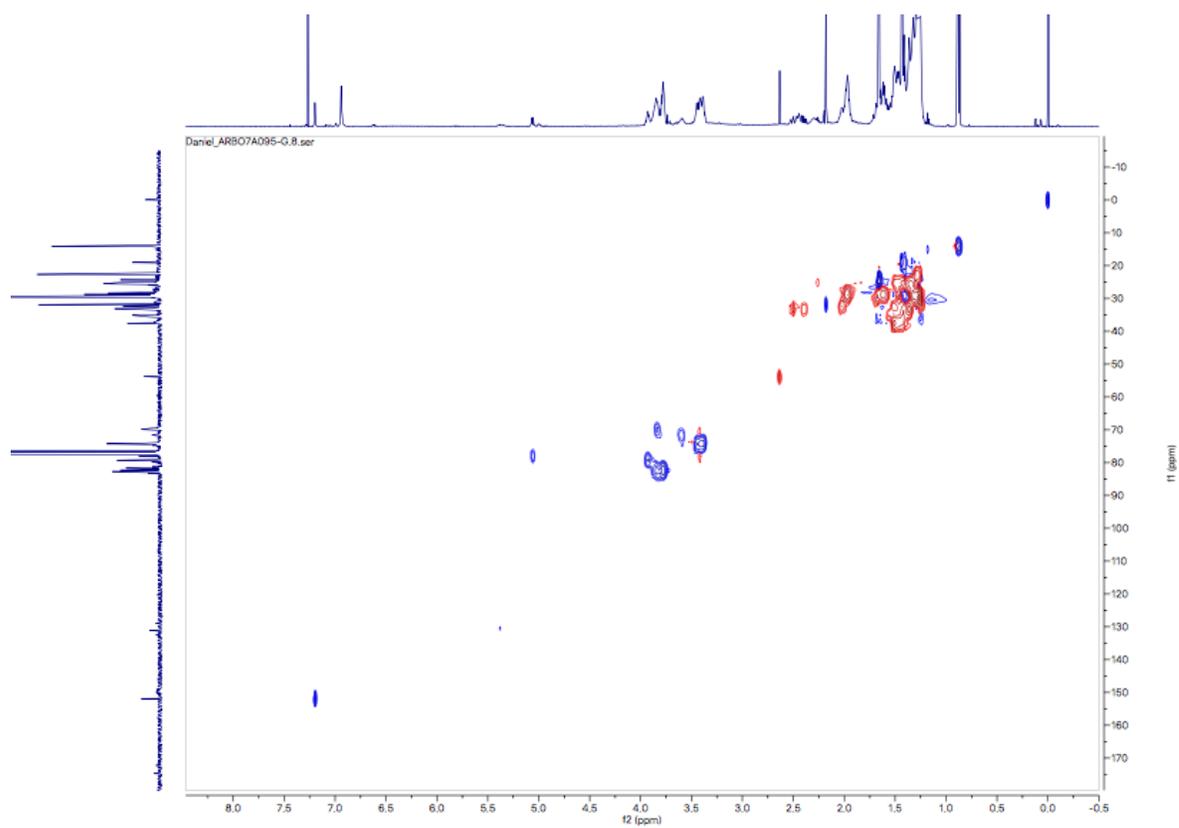


Apêndice A2 - Espectro de ^{13}C B7.2.1

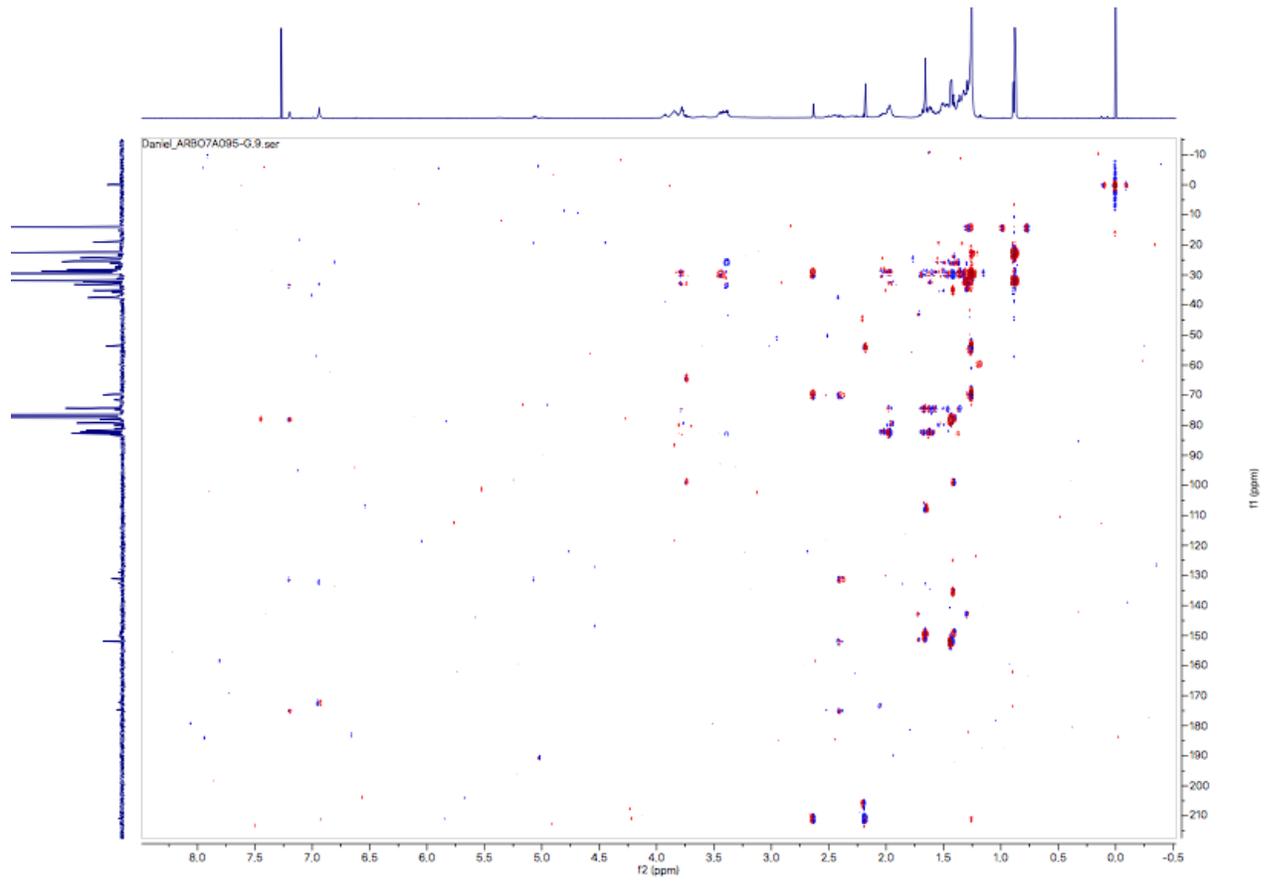
Apêndice A3 - Cosy B7.2.1

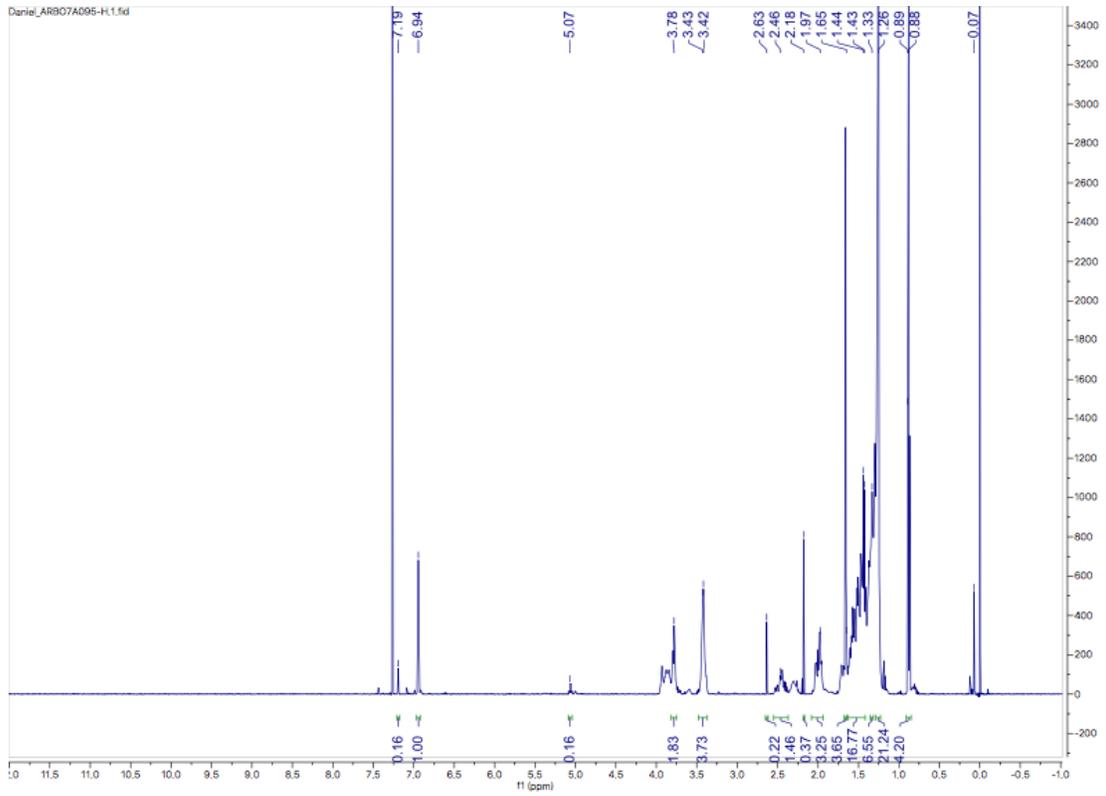


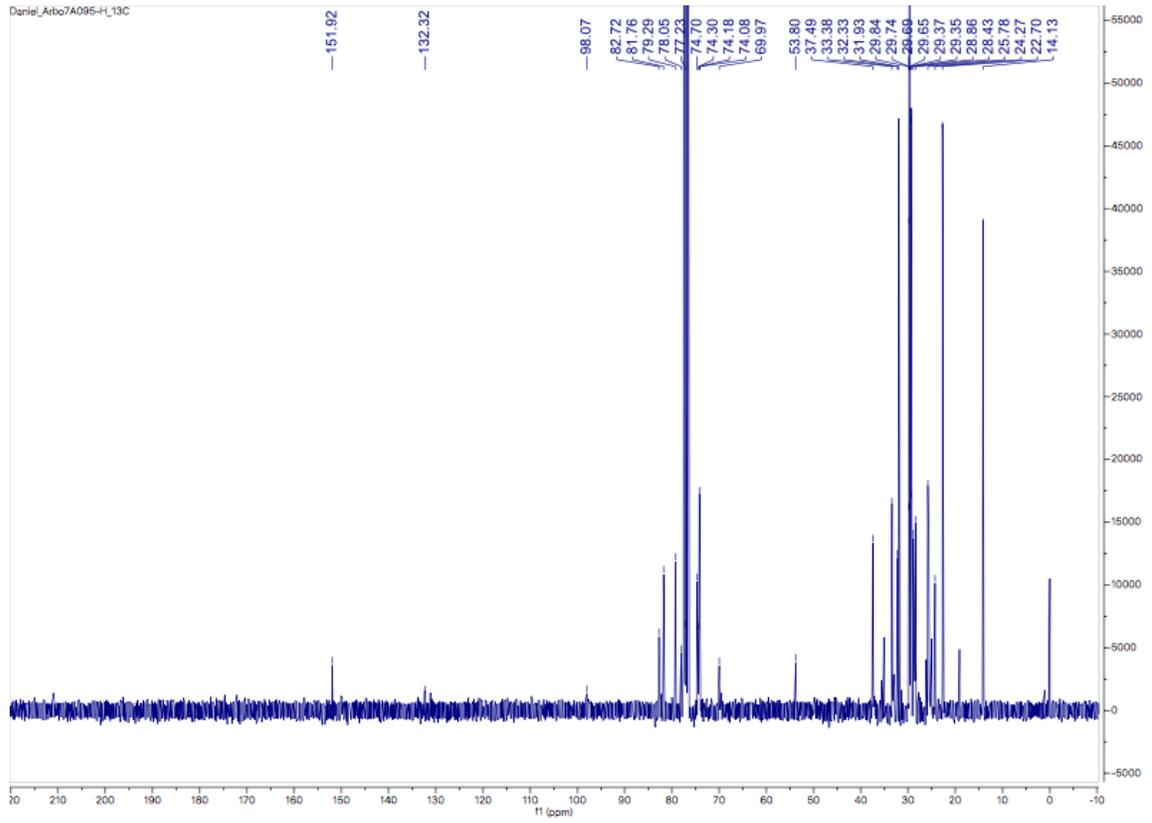
Apêndice A4 - HSQC B7.2.1



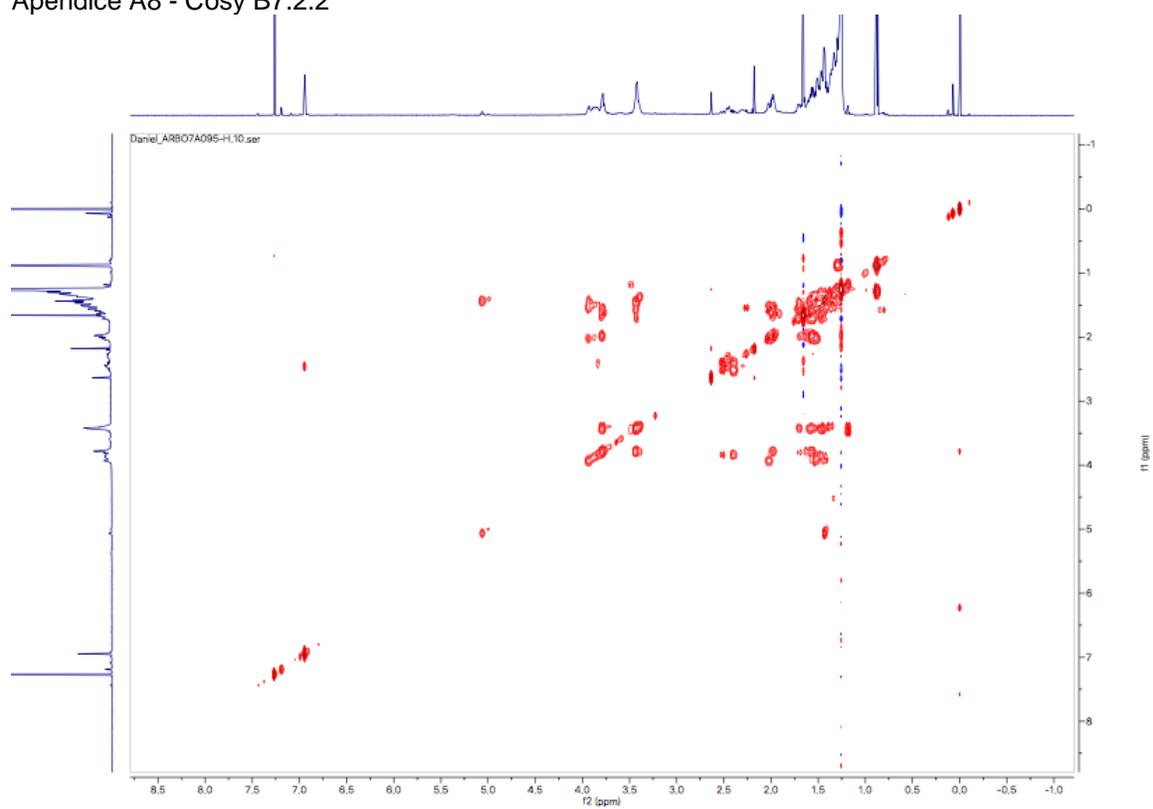
Apêndice A5 - HMBC B7.2.1



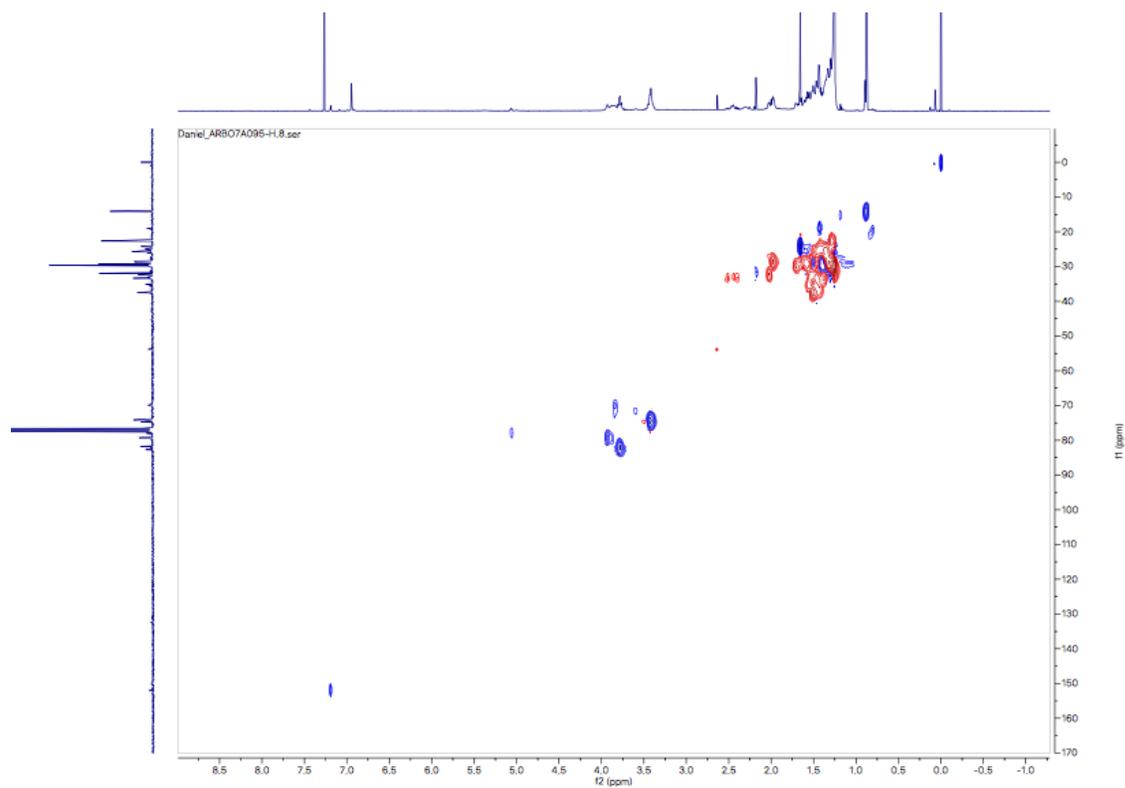
Apêndice A6 - Espectro de ^1H B7.2.2

Apêndice A7 - Espectro de ^{13}C B7.2.2

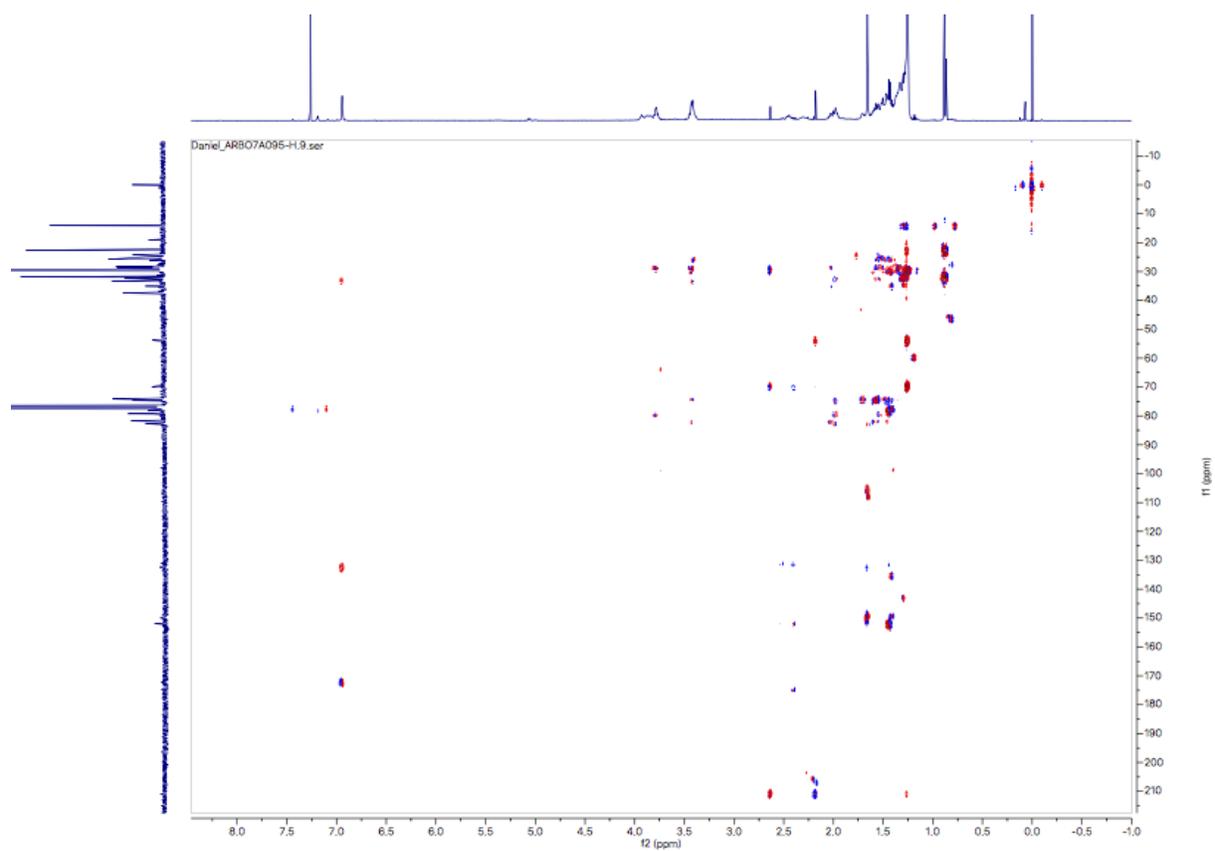
Apêndice A8 - Cosy B7.2.2

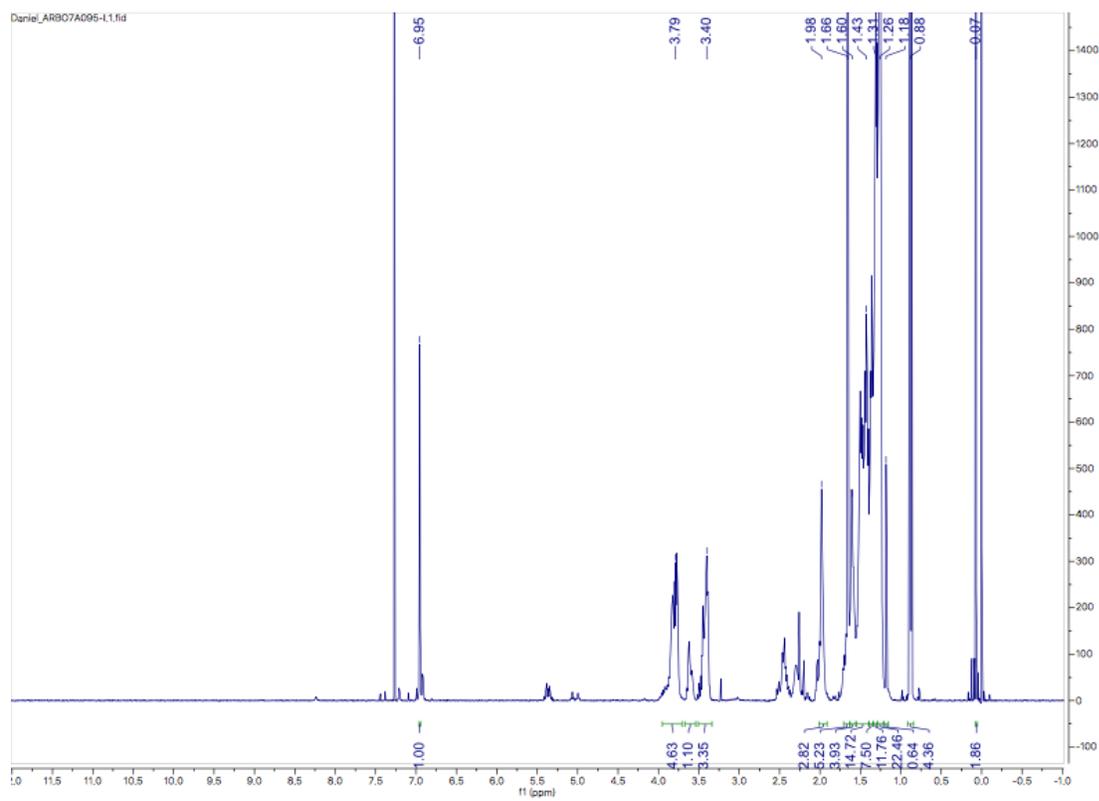


Apêndice A9 - HSQC B7.2.2

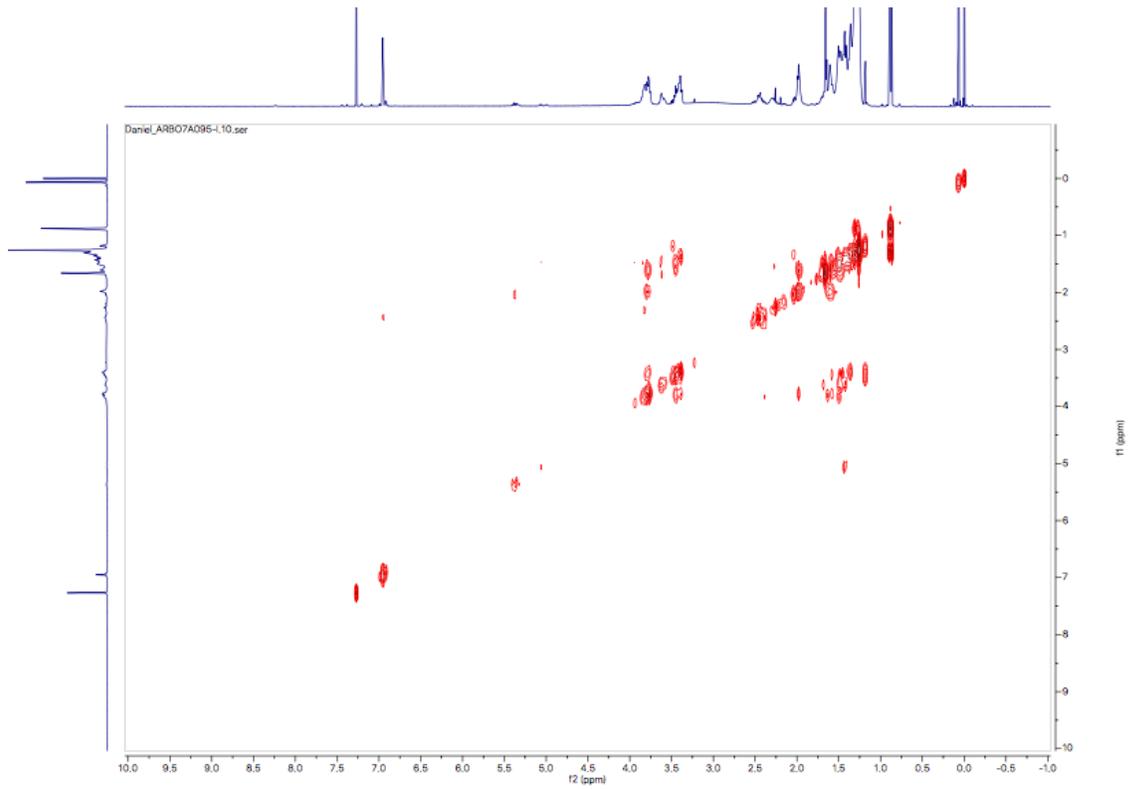


Apêndice A10 - HMBC B7.2.2

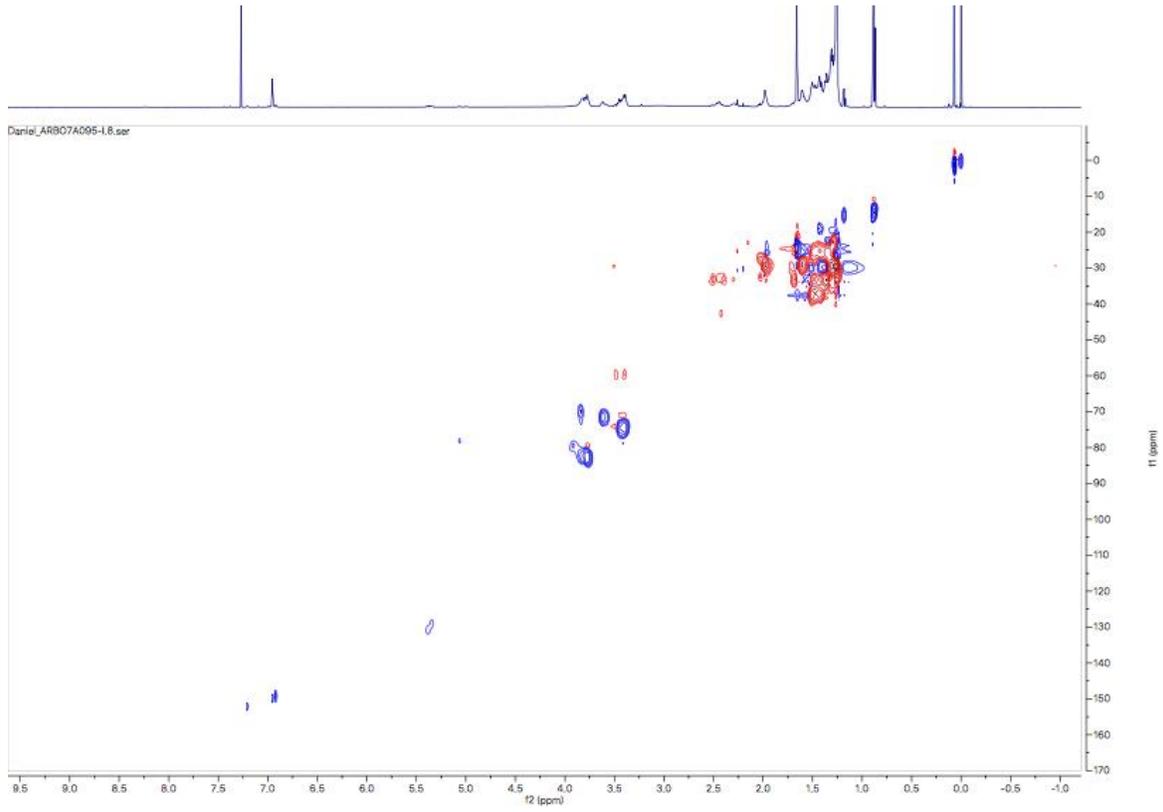


Apêndice A11 - Espectro de ^1H B7.2.3

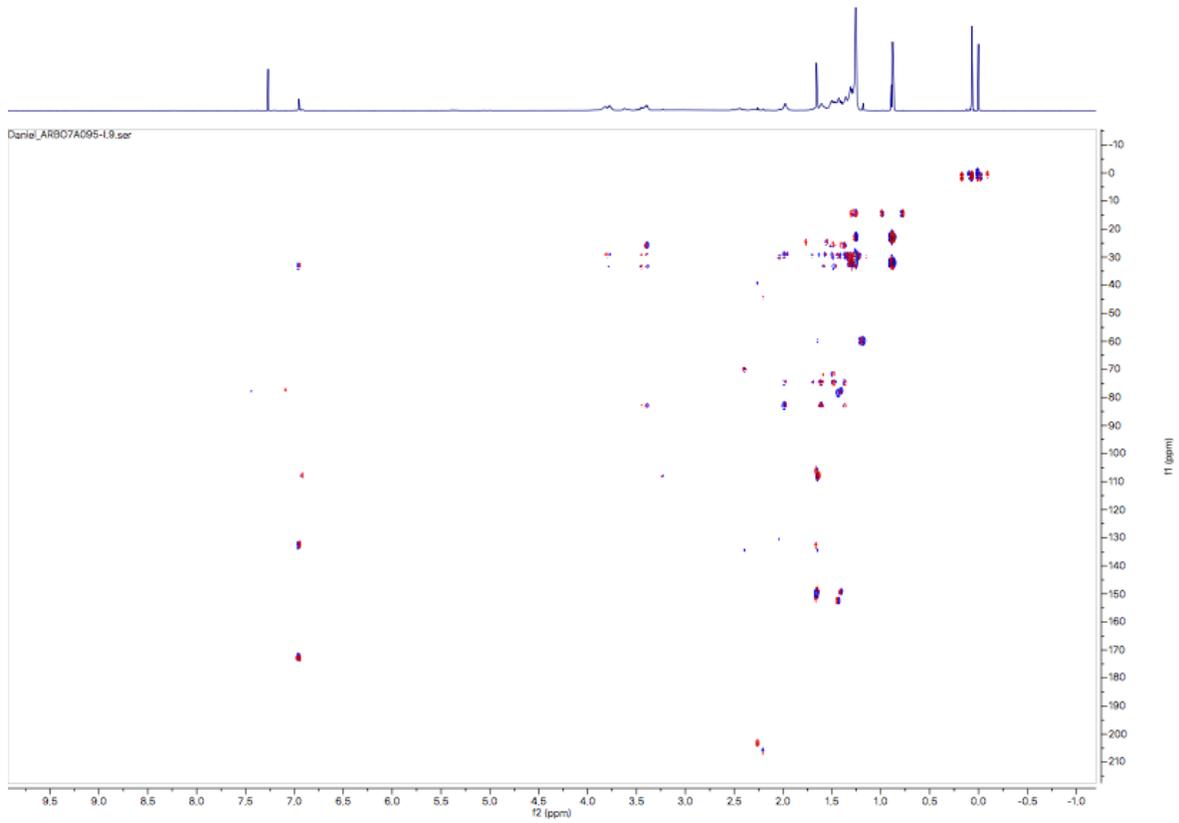
Apêndice A12 - Cosy B7.2.3

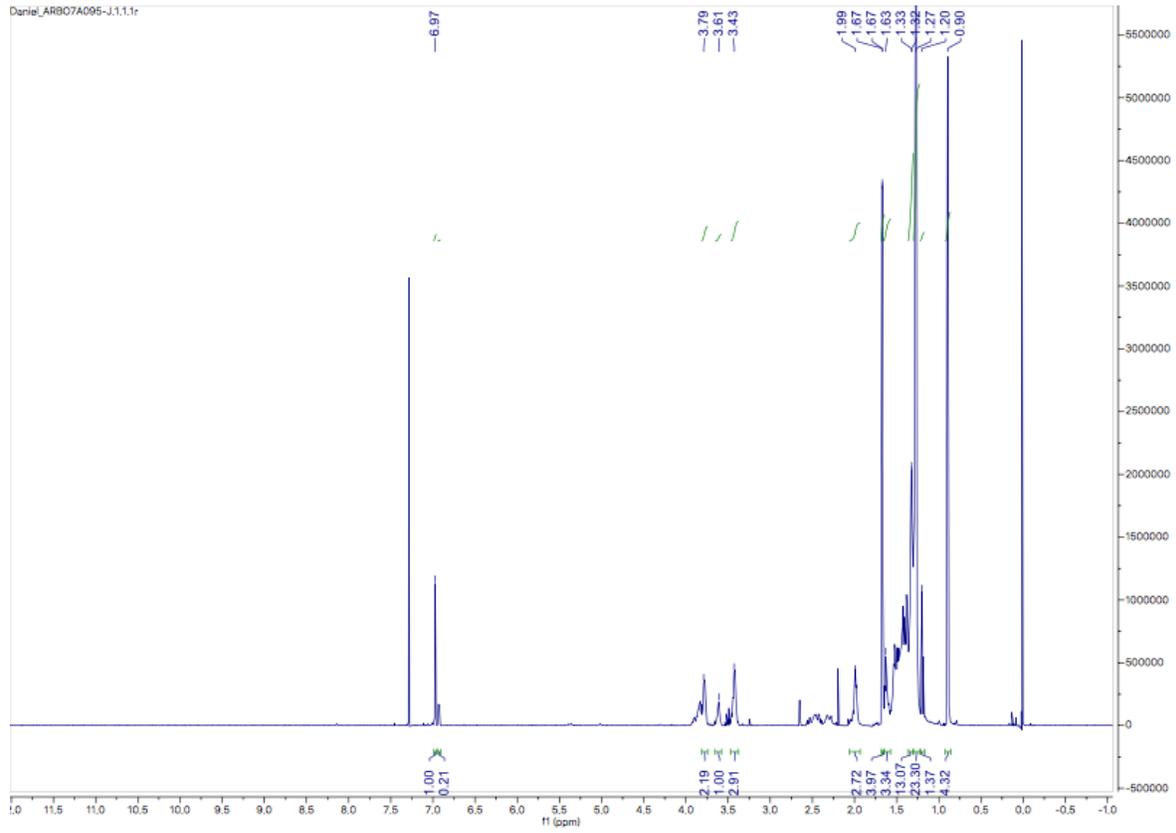


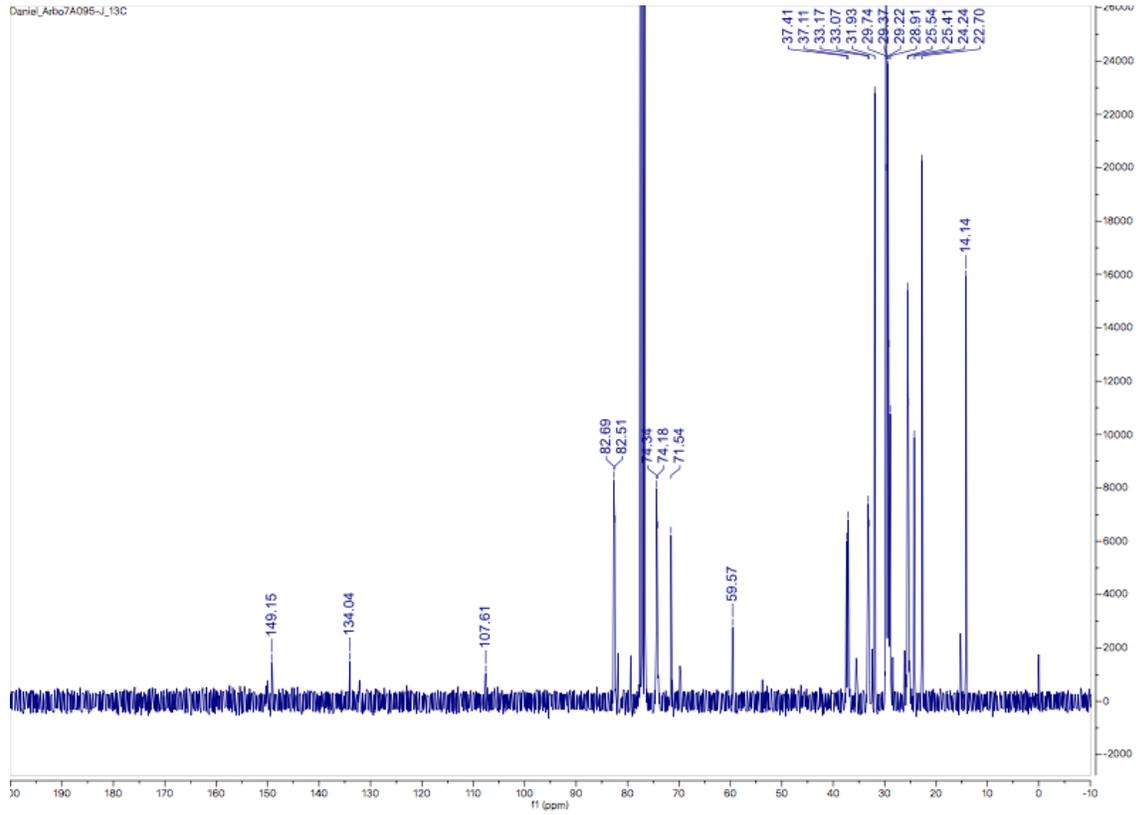
Apêndice A13 - HSQC B7.2.3



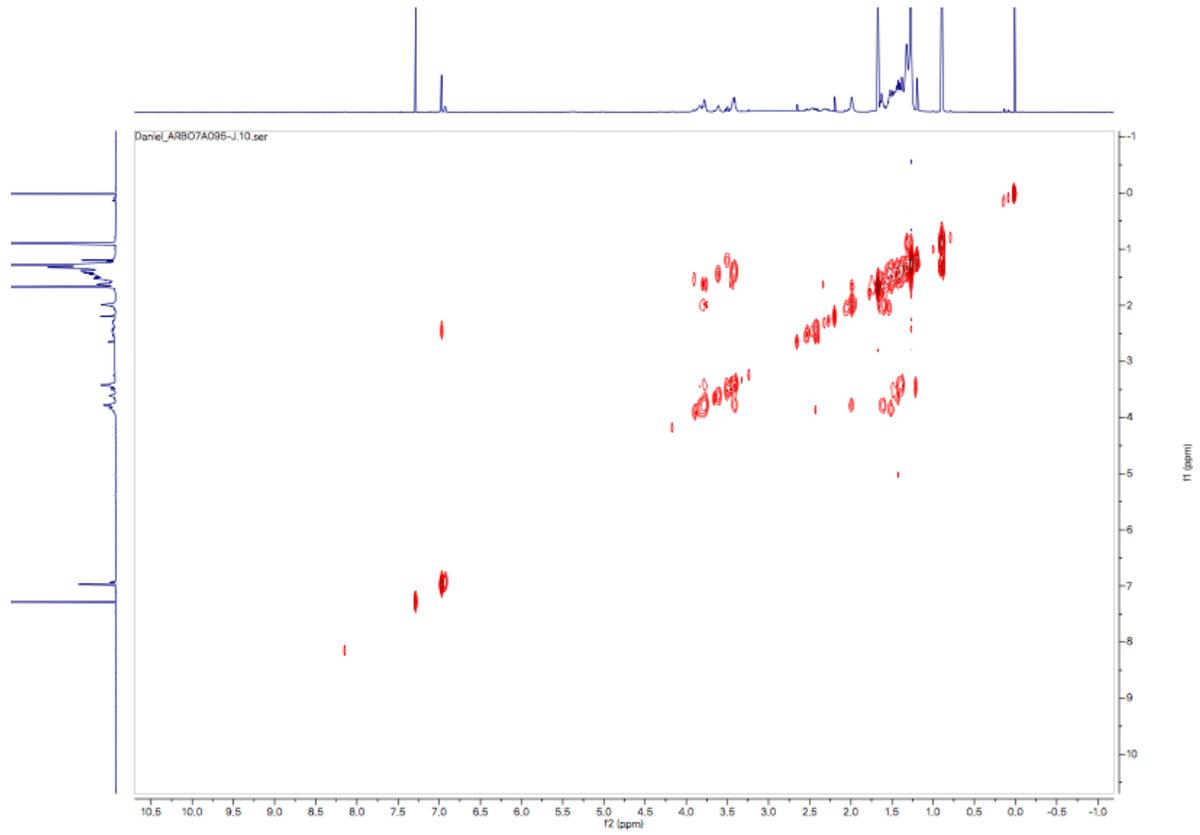
Apêndice A14 - HMBC B7.2.3



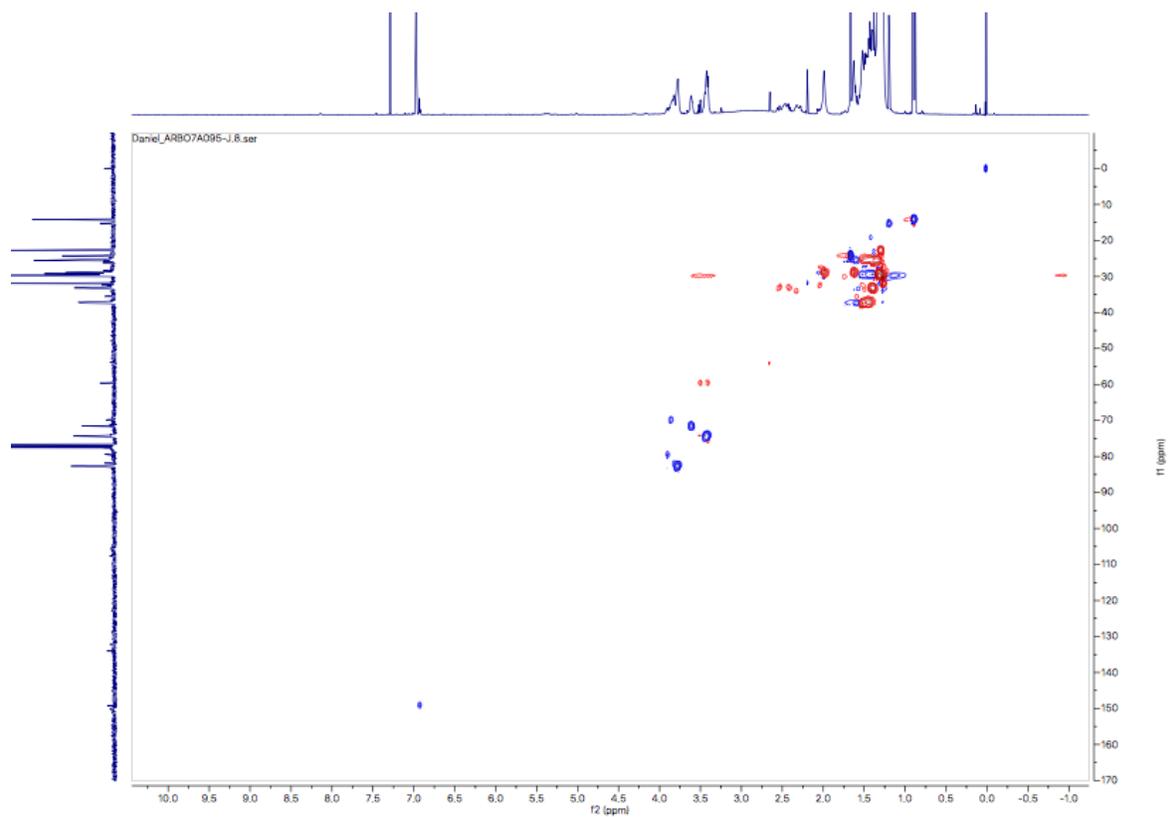
Apêndice A15 - Espectro de ^1H B7.2.4

Apêndice A16 - Espectro de ^{13}C B7.2.4

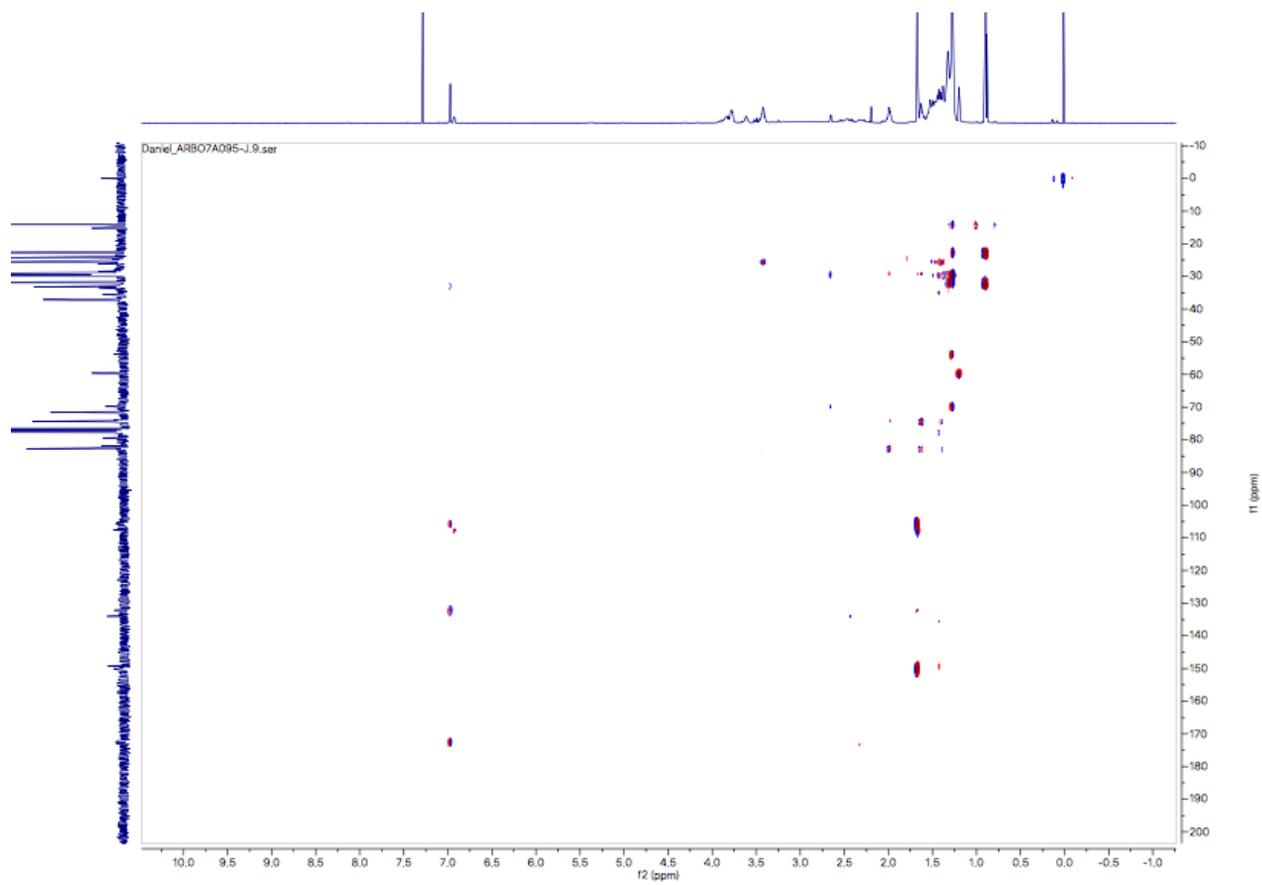
Apêndice A17 - Cosy B7.2.4



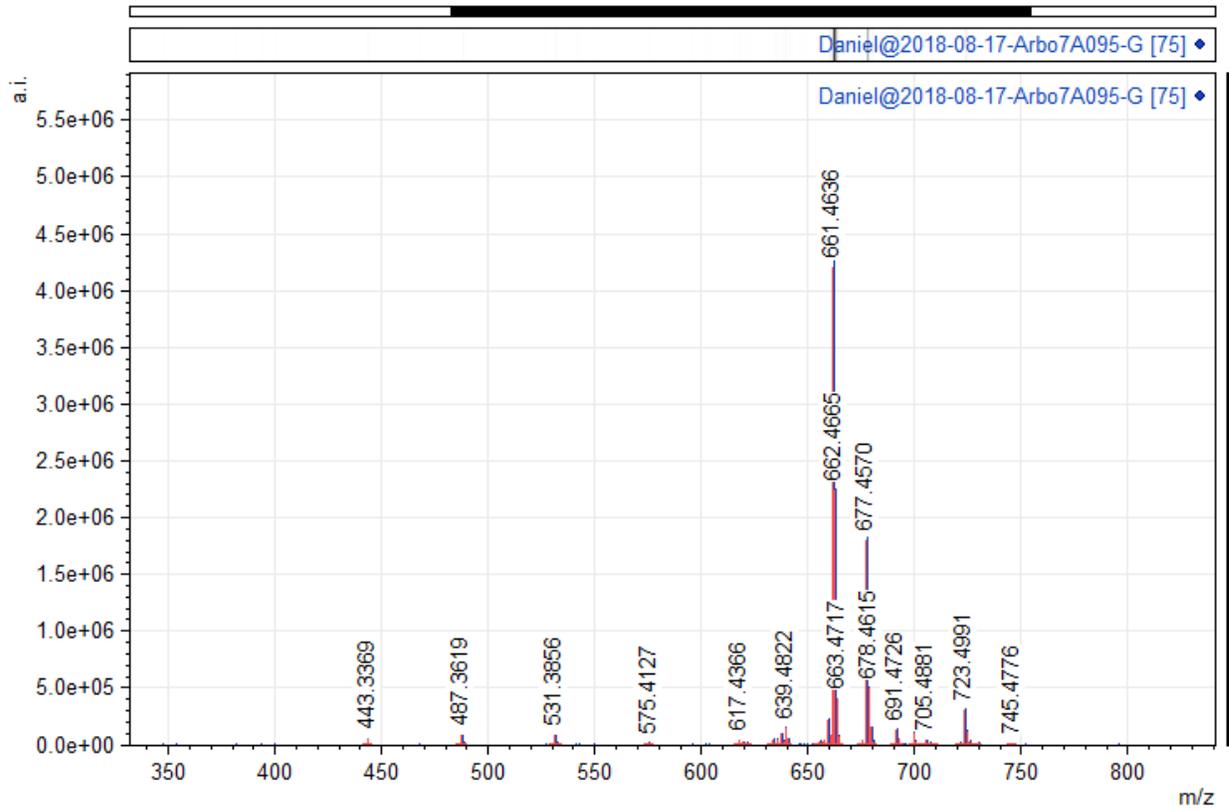
Apêndice A18 - HSQC B7.2.4



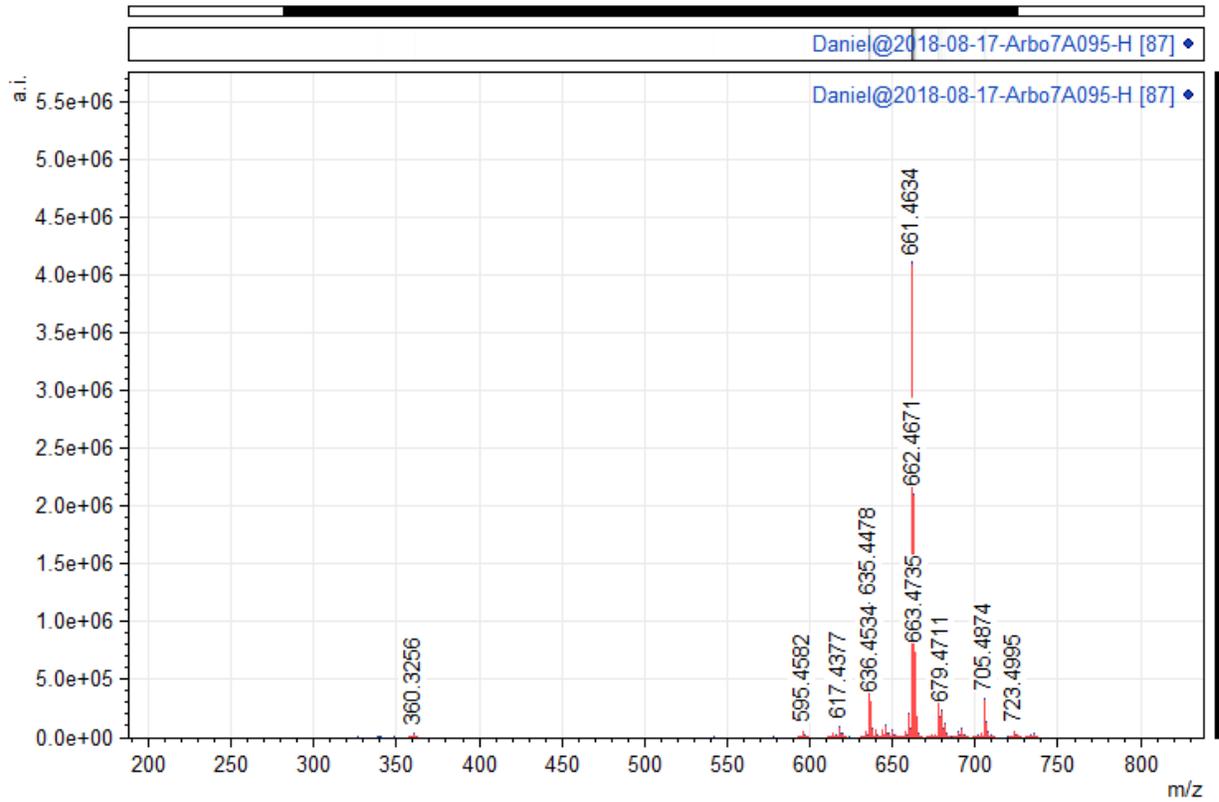
Apêndice A19 - HMBC B7.2.4



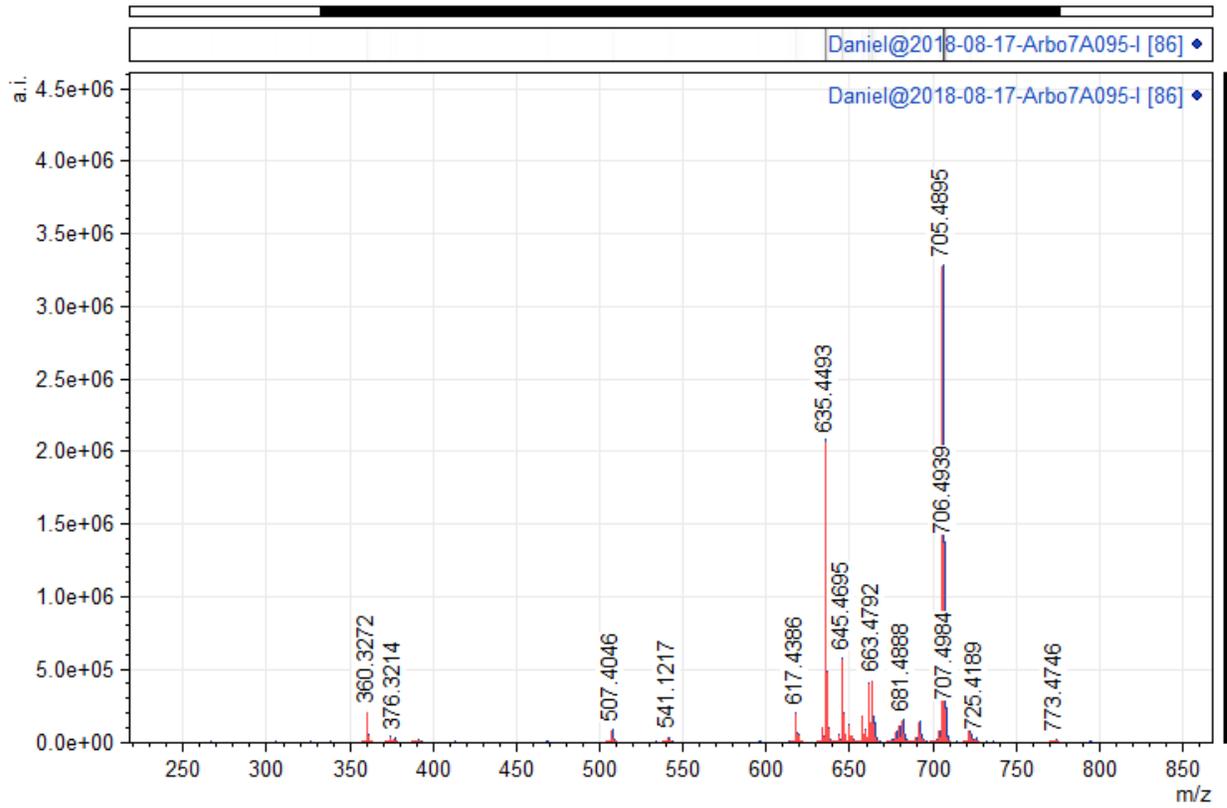
Apêndice A20 - HRMS B7.2.1



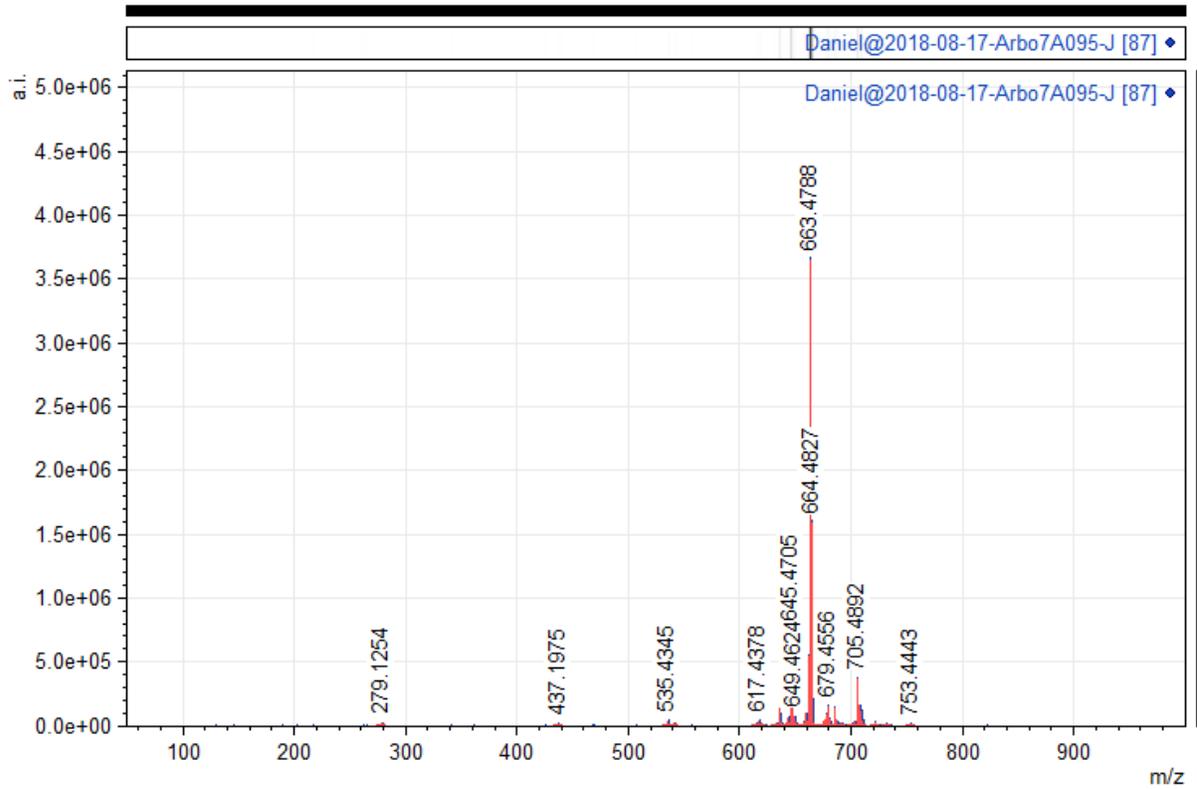
Apêndice A21 - HRMS B7.2.2



Apêndice A22 - HRMS B7.2.3

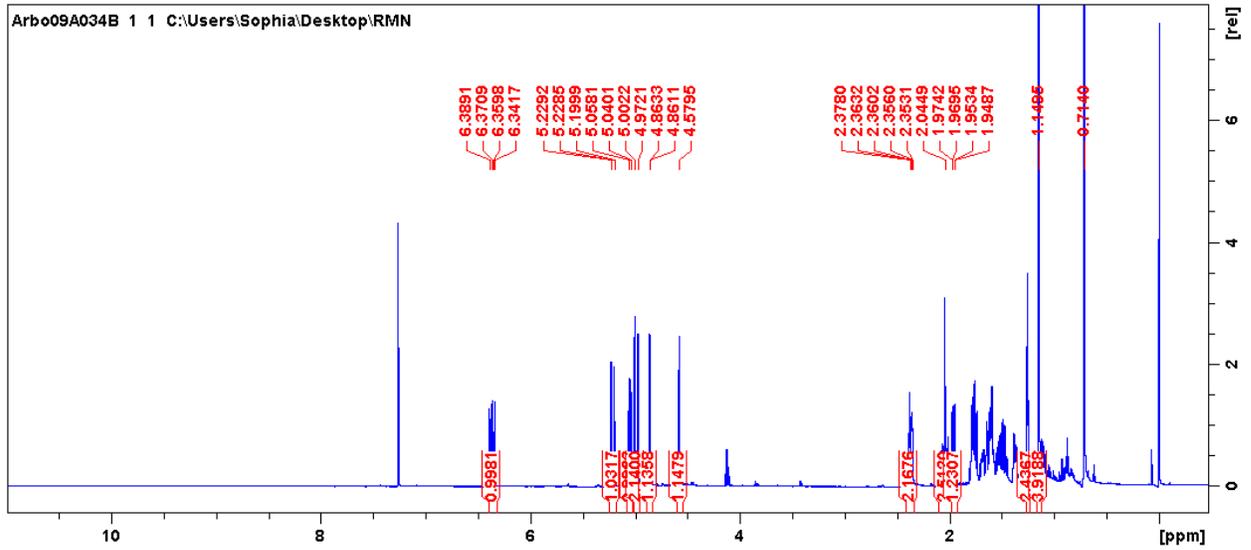


Apêndice A23 - HRMS B7.2.4

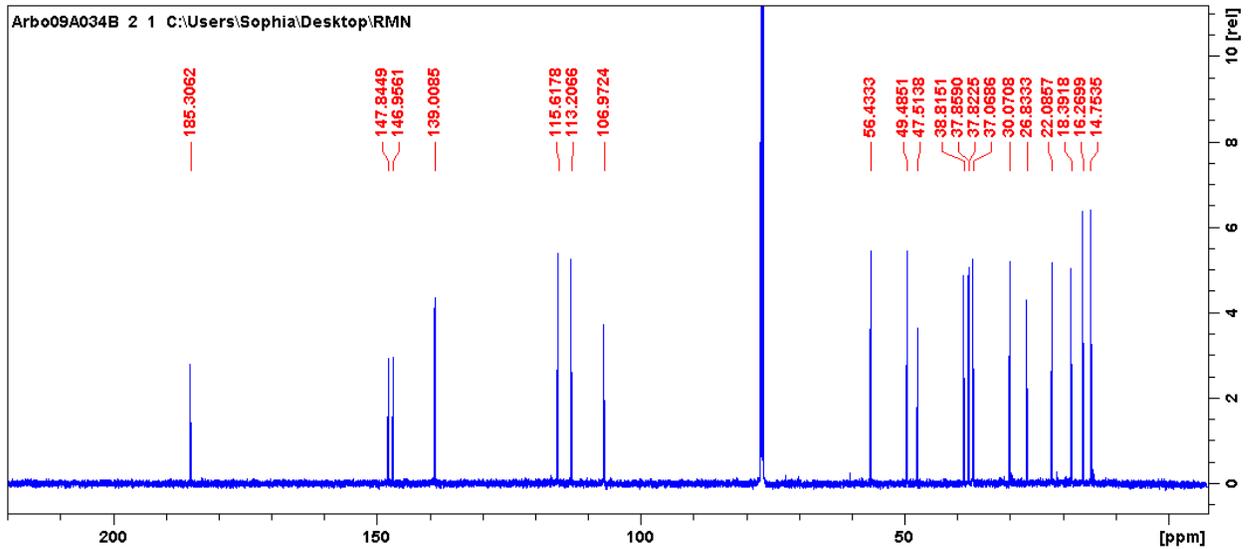


APÊNDICE - B- ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL ÁCIDO ISOZICO

Apêndice B1 - Espectro de ^1H ácido Isozico.

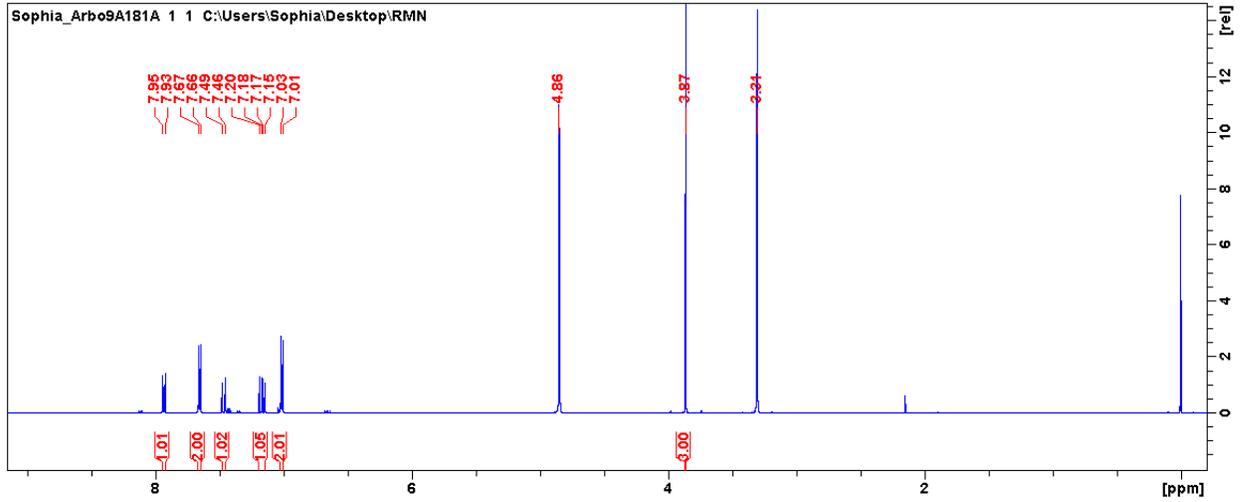


Apêndice B2 - Espectro de ^{13}C ácido Isozico.



APÊNDICE - C - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL BISNITRILA

Apêndice C1 - Espectro de ^1H bisnitrila



Apêndice C2 - Espectro de ^{13}C bisnitrila

