



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

PAULO RICARDO DOS SANTOS CORREIA

SÍNTESE, AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E ESTUDO *IN SILICO* DE ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN FRENTE AO *Aedes Aegypti*

**Maceió/AL
2022**

**Universidade Federal de Alagoas
Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970 – Maceió-AL**

PAULO RICARDO DOS SANTOS CORREIA

SÍNTESE, AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E ESTUDO IN SILICO DE ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN FRENTE AO *Aedes Aegypti*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Silva Porto

Maceió – AL

2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

C824s Correia, Paulo Ricardo dos Santos.

Síntese, avaliação biológica e estudo *in silico* de adutos de Morita-Baylis-Hillman frente ao *Aedes aegypti* / Paulo Ricardo dos Santos Correia. – 2022.

129 f. : il color.

Orientador: Dimas José da Paz Lima.

Coorientador: Ricardo Silva Porto.

Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 88-103.

Anexos: f. 104-129.

1. Morita-Baylis-Hillman. 2. Simulação por computador. 3. Larvicidas. 4. Aedes. I. Título.

CDU: 578.833



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA**



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação do mestrando **PAULO RICARDO DOS SANTOS CORREIA** intitulada: “**SÍNTESE, AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E ESTUDO IN SILICO DE ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN FRENTE AO AEDES AEGYPTI**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 28 de março de 2022, às 9h, por meio de videoconferência.

Maceió, 28 de março de 2022.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima
Presidente e Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Ricardo Silva Porto
PROFQUI/UFAL - Coorientador

Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino
PPGQB/IQB/UFAL

Profa. Dra. Verônica Diniz da Silva
Externo ao Programa

À minha família, em especial minha vó (Maria do Carmo),
meu avô (João Francisco) e minha mãe Maria (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Sou grato primeiramente à Luz Divina por me guiar entre os percalços da vida, que vêm me ensinando a valorizá-la e a abrir portas internas de motivações para a realização dos meus sonhos.

Em segundo lugar, é imensurável minha gratidão à minha família por acreditar em mim e, assim, transmitir-me energias de força nesta nova caminhada e, acima de tudo, não apenas por ensinar-me, mas também por ser um ser humano através de suas ações, o que ainda vem me ensinado valores morais e espirituais.

À minha mãe, Maria José, que agora continua sua jornada em outro plano. Meus profundos agradecimentos por ter sido para nós um exemplo de alegria em meio as adversidades, por ter me incentivado a ser uma pessoa melhor a cada dia. Onde quer estejas, este trabalho tem a sua energia, pois sem você nada disso seria possível. Em suma, são incontáveis as palavras que tenho para ti, logo sei que um dia nos encontraremos e poderei expressá-las em um grande abraço.

Aos meus avós por ser o alicerce na minha vida! Da mesma maneira que minha mãe, este trabalho vem se concretizando graças a vocês que, juntamente com minha irmã (Samara) e minhas amadas sobrinhas (Sophia e Lorena), são o real motivo para eu continuar nesta luta.

Gratidão também à Katherine pelo apoio durante essa jornada acadêmica e na vida. Pela paciência em me ouvir e ajudar em tantos momentos. Para mim você tem sido um anjo enviado por Deus exatamente num dos momentos mais críticos da minha vida. Saiba que igualmente estou aqui para o que der e vier.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima, gratidão pela paciência nesta caminhada, pelo apoio e incentivo a trilhar caminhos promissores e pelos conhecimentos compartilhados. O senhor para mim é um dos exemplos de pesquisador e, acima de tudo, de um ser humano ético.

Meus agradecimentos ao meu Coorientador, Prof. Dr. Ricardo Silva Porto, pelo apoio em todos os momentos, por acreditar em mim, pela sua paciência, compreensão e confiança. E grato pelas conversas inspiradoras que ampliaram minha visão para tantas possibilidades de crescimento; por compartilhar um pouco da sua história e por me ouvir. Nunca irei esquecer disso.

Aos membros do Laboratório de Química Orgânica Aplicada a Materiais e Compostos Bioativos – LCM. Em especial, grato à Carol pelas conversas saudáveis e, principalmente, pelo imenso apoio na realização das análises de RMN.

Ao Instituto de Química e Biotecnologia e seus demais professores e à Universidade Federal de Alagoas.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

*“If you think you’re too small to make a difference,
try going to bed with a mosquito in the room”*

Old African proverb

RESUMO

Atualmente, patógenos que vêm adaptando-se às mudanças impostas pela natureza continuam a acarretar vastos danos socioeconômicos e, principalmente, à saúde humana. A exemplo cita-se as Doenças Tropicais Negligenciadas causadas por vírus, tais como a Dengue, Zika e Chikungunya. Esses arbovírus, por sua vez, emergem de ciclos zoonóticos, transmitidos, em sua maioria, pelo artrópode *Aedes aegypti*, em que para a Zika e Chikungunya ainda não há vacina disponível. Embora haja vacina para alguns sorotipos da Dengue, a alta expansão do vetor tem ocasionado níveis crescentes desta doença em ciclos epidêmicos a cada 3 a 5 anos. À vista disso, este trabalho propôs-se a contribuir para o planejamento e desenvolvimento de moléculas com potencial ação biológica frente ao vetor *Aedes aegypti* por meio da aplicação da reação de Morita-Baylis-Hillman (MBH) e realização de estudos *in silico* para compreensão do possível modo de ação de tais compostos. Desta maneira, os compostos sintetizados via reação de MBH apresentaram rendimentos satisfatórios, sendo, posteriormente os compostos submetidos à avaliação larvicida, em conjunto com alguns adutos de MBH disponibilizados por meio de parceria com grupo de pesquisa externo. Dentre estes, 3 apresentaram atividade promissora, destacando-se metil 2-([1,1'-bifenil]-4-il(hidroxi)metil)acrilato (**3n**). Ademais, estudos de docking molecular foram conduzidos com a enzima AaAChE, principal alvo biológico no controle do vetor, e outros possíveis alvos biológicos, o que sugere uma possível múltipla ação. Contudo, análises morfológicas demonstram provável dano em órgãos na região do tórax responsáveis pela síntese da membrana peritrófica, componente essencial do sistema de defesa do inseto. Desta forma, observou-se uma resposta degenerativa no tecido epitelial na região do abdômen da larva. Em suma, evidencia-se que os adutos de MBH apresentam-se como uma promissora classe de compostos no controle populacional do *Aedes aegypti*.

Palavras-chaves: Morita-Baylis-Hillman; *in silico*; Larvicida; *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Currently, pathogens that have adapted to the changes imposed by nature continue to cause extensive socioeconomic damage and, especially, to human health. One example is the Neglected Tropical Diseases caused by viruses, such as Dengue, Zika, and Chikungunya. These arboviruses, in turn, emerge from zoonotic cycles, mostly transmitted by the arthropod *Aedes aegypti*, where for Zika and Chikungunya no vaccine is available yet. Although there is a vaccine for some serotypes of Dengue, the high expansion of the vector has caused increasing levels of this disease in epidemic cycles every 3 to 5 years. Therefore, this work aimed to contribute to the design and development of molecules with potential biological action against the vector *Aedes aegypti* through the Morita-Baylis-Hillman (MBH) reaction methodology and *in silico* studies to understand the possible mode of action of such compounds. Thus, the results of the synthesis presented satisfactory yields, with the compounds being later submitted to larvicidal evaluation, together with some MBH adducts that were available through a partnership with an external research group. Among these, 3 showed promising activity, especially methyl 2-([1,1'-biphenyl]-4-yl(hydroxy)methyl)acrylate (**3n**). Furthermore, molecular docking studies were conducted with the enzyme AaAChE, the main biological target in vector control, and other possible biological targets, suggesting a possible multiple action. However, morphological analyses suggest probable damage in organs in the thorax region responsible for the synthesis of the peritrophic membrane, an essential component of the insect defense system. Thus, a degenerative response was observed in the epithelial tissue in the abdomen region of the larva. In summary, it is evident that MBH adducts are a promising class of compounds in the population control of *Aedes aegypti*.

Keywords: Morita-Baylis-Hillman; *in silico*; Larvicide; *Aedes aegypti*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica global do <i>Aedes aegypti</i>	19
Figura 2 - Número de sorotipos de dengue em circulação nos países e territórios das Américas, 1995-2016.....	21
Figura 3 - Incidência de DENV nas Américas de 1980 a 2010.....	22
Figura 4 - Casos de DENV e óbitos por ela causados de janeiro a junho de 2021.....	23
Figura 5 - Regiões geográficas onde o Zika vírus (ZIKV) é enzoótico/endêmico, com surto de epidemias.....	24
Figura 6 - Distribuição geográfica da microcefalia no Brasil, junho de 2015 a março de 2016.....	25
Figura 7 - Representação dos órgãos-alvos afetados pelo arbovírus DENV (a) e ZIKV (b).....	25
Figura 8 - Casos de Chikungunya no mundo a partir de 2018.....	27
Figura 9 - Morfologia da larva do <i>Aedes aegypti</i>	29
Figura 10 - Inseticidas aplicados no controle do vetor <i>Aedes aegypti</i>	32
Figura 11 - Países com Legislação Pesticida baseada no “Código Internacional de Conduta em Manejo de Pesticida”.....	33
Figura 12 - Atuais inseticidas utilizados no combate ao <i>Aedes aegypti</i> no Brasil.....	34
Figura 13 - Realização de ensaio larvicida.....	62
Figura 14 - Larva do <i>Ae. aegypti</i> 4 ^o no estágio sob o controle negativo.....	65
Figura 15 - Larva do <i>Ae. aegypti</i> 4 ^o no estágio em solução de 100 ppm do composto 3n	66
Figura 16 - Visão ampliada das regiões degeneradas da larva do <i>Ae. aegypti</i> em solução de 100 ppm do aduto 4s	67
Figura 17 – Resultado da busca de sequência homóloga da AaAChE pelo webservidor BLAST.....	72
Figura 18 - Gráfico de Ramachandran para a distribuição dos ângulos diedros Phi (φ) e Psi (Ψ) do modelo da AaAChE.....	73
Figura 19 - Verificação da qualidade do modelo da AaAChE pelo servidor ProSa-Web.....	74
Figura 20 - Representação do perfil 3D do modelo AaAChE.....	75

Figura 21 - Validação do cálculo de <i>docking</i> do programa GOLD por meio do procedimento de <i>redocking</i> . Em azul celeste é representado a conformação bioativa do ligante cristalográfico em sobreposição com a pose gerada pelo <i>software</i> , ligante em verde.....	76
Figura 22 - Representação esquemática das principais regiões de interação na AaAChE.....	76
Figura 23 - Visualização das interações do composto de referência (temefós) e os adutos 3g , 3n e 4s com a AaAChE (imagens elaboradas a partir do <i>software</i> Discovery Studio)	78

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Resultados obtidos na síntese dos adutos de MBH.....	59
Tabela 2 - Síntese dos adutos de MBH com acrilato de etila.....	61
Tabela 3 - Resultado do ensaio qualitativo de atividade larvícida na concentração de 100 µg/mL.....	63
Tabela 4 - Avaliação quantitativa da atividade larvícida dos adutos de MBH frente às larvas do <i>Aedes aegypti</i> no 4 ^o estágio após 48 hs.....	64
Tabela 5 - Previsão de possíveis alvos biológicos a partir da estrutura química dos adutos MBH.....	68
Tabela 6 - Alvos potenciais dos adutos MBH frente ao <i>Ae. aegypti</i>	70
Tabela 7 - Valores de <i>FitScore</i> e interações ligante/receptor entre os adutos, o composto de referência e a AaAChE.....	77
Tabela 8 - Avaliação dos parâmetros físico-químicos dos adutos MBH.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE – Acetilcolinesterase

ACE - Enzima conversora de angiotensina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

CTSB - Catepsina B

CHIKV - Vírus Chikungunya

CL₅₀ - de Concentração Letal para 50% de uma população

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

ClogP – Logaritmo do Coeficiente de Partição

DENV – Vírus Dengue

DDT - Diclorodifenil-tricloroetano

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPD - Dihidropirimidina desidrogenase

ET – Estado de Transição

EH's - Hidrolases de epóxido

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

FT-IR - Espectroscopia na Região do Infravermelho

FABP - Família de Proteínas de ligação a ácidos graxos

GRE - Grupos Retiradores de Elétrons

GOLD – Genetic Optimization for Ligand Docking

GSTs - Glutathione S-transferases

HAO2 - (s)-2-hidroxiácido oxidase

LUMO - Lowest Unoccupied Molecular Orbital

MBH - Morita-Baylis-Hillman

MP – Membrana Peritrófica

MME - Metallo-endopeptidase de membrana (Neprilisina)

MM – Mass Molecular

nALH - número de Aceptores de Ligação de Hidrogênio

nDLH - número de Doadores de Ligação de Hidrogênio

nLRot - número de Ligações Rotacionáveis

nLAr - número de Ligações Aromáticas

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

PDB - Protein Data Bank

PT – Fosfotransferase

PAP - Putative-lisosomal

REA - Relação Estrutura-Atividade

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMSD - Root-Mean-Square

SE – Semana Epidemiológica

TMS – Tetrametilsilano

WHO – World Health Organization

YFV - Vírus Febre Amarela

ZIKV – Vírus Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1. Transmissão de arbovírus: a influência de condições ambientais e outros fatores na conexão entre vertebrado, vírus e vetor.....	19
2.2. Principais doenças infecciosas tropicais reemergentes nas Américas veiculadas por vetores biológicos.....	21
2.2.1. Dengue.....	21
2.2.2. Zika.....	24
2.2.3. Chikungunya.....	26
2.3. Morfologia da larva do <i>Aedes aegypti</i>	27
2.4. Meios de Controle do Vetor.....	30
2.5. Principais Classes de Inseticidas: Modos de Ação e Efeitos <i>off Targets</i>	31
2.6. Planejamento e desenvolvimento de inseticidas seletivos- a importância de interações não-covalentes.....	34
2.7. Reação de Morita-Baylis-Hillman: aspectos históricos e escopo multivariado.....	36
2.7.1. Definição geral.....	37
2.7.2. Mecanismo.....	38
3. OBJETIVOS	40
3.1. Objetivo Geral.....	41
3.2. Objetivos específicos.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	43
4.2. Cromatografia em Coluna (CC).....	43
4.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR)	43
4.4. Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	43
4.5. Procedimento reacional para a preparação dos adutos de MBH.....	44
4.6. Avaliação da atividade larvicida.....	53
4.7. Análise microscópica de luz.....	53
4.8. Estudos <i>in silico</i>	54

4.8.1. <i>In silico</i> Target Fishing: Predição de alvos moleculares.....	54
4.8.2. Modelagem Molecular por Homologia Estrutural.....	54
4.8.3. <i>Docking</i> Molecular.....	55
4.8.4. Análise de propriedades físico-químicas e relação estrutura-atividade dos adutos MBH.....	56
5. RESULTADOS E DISCUÇÕES.....	57
5.1. Preparo dos adutos de Morita-Bailys-Hillman.....	58
5.2. Avaliação da atividade larvicida.....	61
5.3. Análise morfológica.....	65
5.4. <i>In silico</i> Target Fishing: Predição de alvos moleculares.....	67
5.5. Modelagem por Homologia Estrutural: construção do modelo da AaAChE.....	71
5.6. <i>Docking</i> Molecular.....	75
5.7. Avaliação <i>in silico</i> de propriedades físico-químicas: Relação Estrutura-Atividade.....	79
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
7. PERSPECTIVAS.....	85
8. REFERÊNCIAS.....	87
ANEXOS: Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C e de Infravermelho (FTIR).....	104

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados epidemiológicos do Brasil, cerca de 987.173 casos de Dengue (DENV) entre dezembro de 2019 e janeiro de 2021 foram confirmados, com 554 óbitos, destacando as regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste. Estima-se ainda cerca de 82.419 episódios de Chikungunya (CHIKV), onde a maior proporção ocorreu em Sergipe, com uma taxa de incidência acima de 100 casos/100 mil habitantes. Em relação ao Vírus Zika (ZIKV), o estado da Bahia apresentou cerca de 47,9% dos casos de Zika do país (BE-23, 2021).

Deste modo, é indispensável ações que apontem para a redução populacional do vetor, sendo o meio químico um dos principais meios de controle, destacando-se os inseticidas Temefós e o Piriproxifeno. Contudo, o mosquito vem apresentando resistência a esses pesticidas e efeitos tóxicos têm sido reportados em peixes e crustáceos (DINIZ *et. al.*, 2014). Nesse contexto, a descoberta de novos compostos com promissora ação larvicida é de suma importância sob a perspectiva de segurança de saúde pública, o que está diretamente relacionado ao desenvolvimento estratégico de compostos não apenas com ação larvicida, mas principalmente ambientalmente sustentáveis, o que é possível pelo estudo da biologia molecular do inseto.

Nesse sentido, ressalta-se que entre os alvos biológicos relacionados a diversos pesticidas, a alteração no funcionamento do sistema nervoso dos artrópodes, particularmente o *Aedes aegypti*, tem sido o meio de ação das principais classes de inseticidas no controle desse vetor, como organoclorados, piretróides (inibindo os canais iônicos), organofosforados e carbamatos (inibindo a enzima acetilcolinesterase). Destaca-se que a acetilcolinesterase (AChE) desempenha um papel essencial na propagação de impulsos nervosos, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina. Logo, a sua inibição leva a uma superestimulação do sistema nervoso (KNUTSSON S. *et. al.*, 2018).

Assim, tendo em vista as inúmeras ações biológicas dos adutos de Morita Baylis-Hillman (MBH), tais como anticâncer, antiprotozoário e antifúngica (OLIVEIRA *et al.*, 2021), e considerando-se a indispensabilidade de um manejo efetivo no combate ao *Aedes aegypti*, este trabalho teve como objetivo identificar potenciais hits frente à AaAChE deste vetor por meio da síntese e validação experimental por ensaios larvicida, calculando-se Concentração Letal para 50% de uma população

(CL₅₀) e estudos de análise morfológica e docking molecular para compreensão do possível meio de ação desta classe de compostos.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

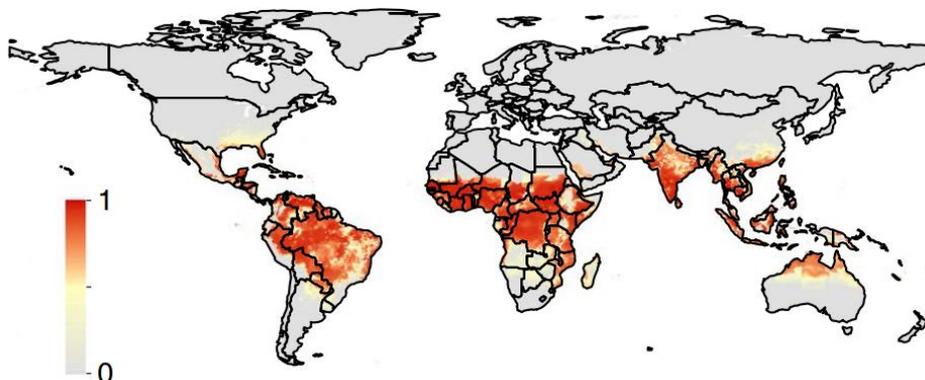
2.1. Transmissão de arbovírus: a influência de condições ambientais e outros fatores na conexão entre vertebrado, vírus e vetor

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o termo “arbovírus” é atribuído a “*vírus que compartilham a característica de serem mantidos naturalmente por meio da transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis por artrópodes hematófagos ou transmissão transovariana de artrópodes fêmeas infectadas para sua progênie*” (WHO, 1985).

Entre diversos artrópodes potencialmente difusores de arbovírus patogênicos destaca-se o *Aedes aegypti*, o qual é responsável pela transmissão urbana de DENV, CHIKV e ZIKV e o Vírus Febre Amarela (YFV). Originário da África Subsariana como uma espécie selvática, esse vetor desembarcou nas Américas por meio de navios na época de sua colonização em meados de 1400, encontrando perfeitas condições climáticas e disposição de alimento para sua rápida disseminação neste Novo Mundo (POWELL *et. al*, 2013; POWELL, 2018).

Atualmente, ressalta-se que fatores socioeconômicos têm contribuído para sua expansão pelo mundo (figura 1), como viagens aéreas, migração e urbanização. Estima-se que tais aspectos, associados a mudanças climáticas, ainda irão promover a contínua difusão deste artrópode pelos próximos 30 anos (KRAEMER *et. al.*, 2019).

Figura 1: Distribuição geográfica global do *Aedes aegypti*.



Fonte: Kraemer, M.U.G. *et. al.*,

Ressalta-se que zonas tropicais e subtropicais são fatores limitantes para o desenvolvimento biológico dos artrópodes, uma vez que esses não conseguem regular a sua própria temperatura interna, motivo pelo qual surtos de arboviroses apresentam um padrão sazonal nessas regiões (IWAMURA *et. al.*, 2020).

Nesse contexto, antes de continuarem o processo de replicação viral em outro hospedeiro, os arbovírus passam por um período de incubação no vetor, cujo tempo varia de acordo com a temperatura local. Desta maneira, ambientes quentes, em média 35°C, resultam num curto intervalo de incubação, favorecendo a rápida transmissão do vírus para mamíferos (CARRINGTON *et. al.*, 2013; RICHARDSON *et. al.*, 2011).

Por exemplo, estudos experimentais têm constatado, nessas condições ambientais, a presença do CHIKV nas glândulas salivares do *Aedes aegypti* em dois dias pós-alimentação sanguínea (WATTS *et. al.*, 1987). Em relação ao DENV, o tempo para esse arbovírus alcançar este órgão é em torno de quatro dias (WATTS *et. al.*, 1987; DUBRULLE *et. al.*, 2009) enquanto para o YFV e ZIKV é dez e de quatorze dias, respectivamente (MCELROY *et. al.*, 2008; CHOUIN-CARNEIRO *et. al.*, 2016).

Ademais, fatores genéticos apresentam-se como um outro fator que influencia diretamente na competência do vetor *Aedes aegypti* em transmitir arboviroses, ou seja, condições genômicas podem acarretar numa maior capacidade de infecção do mosquito após a ingestão de sangue infectado e, conseqüentemente, na transmissão de vírus através da saliva do inseto (FONTENILLE e POWELL, 2020). Logo, tais fatores podem levar mosquitos mais susceptíveis à infecção por arbovírus, o que diretamente implica na dinâmica relação entre o homem e tais vírus (ALONSO-PALOMARES *et. al.*, 2018).

Por fim, outro fator determinante na transmissão vetorial está relacionado à microbiota presente no seu intestino. Apte-Deshpande e colaboradores (2014) constataram que a bactéria Gram-negativa *Serratia odorífera* aumenta a susceptibilidade de vetores *Aedes aegypti* perante o CHIKV (APTE-DESHPANDE *et. al.*, 2014). Já aqueles que apresentam o fungo *Talaromyces* são mais propensos a contraírem o DENV (ANGLERÓ-RODRÍGUEZ *et. al.*, 2016), cuja infecção por esse vírus, por outro lado, é suprimida na presença da bactéria *Wolbachia* (TERRADAS *et.*

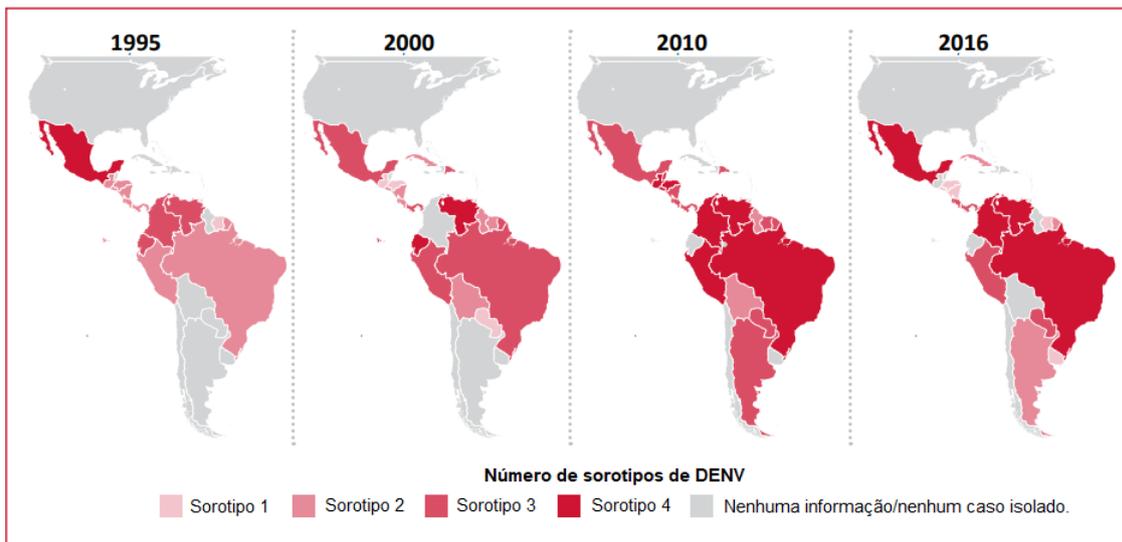
al., 2017), que também impacta a produção de ovos e tempo de vida do mosquito (XUE, *et. al.*, 2018).

2.2. Principais doenças infecciosas tropicais reemergentes nas Américas veiculadas por vetores biológicos

2.2.1. Dengue

Dengue é um arbovírus (DENV) pertencente ao gênero *Flavivirus*, compondo um dos 70 vírus globalmente distribuídos da família *Flaviviridae* (GUBLER, 1998). Aos longos tempos, esse patógeno vem infectando cerca de 390 milhões de pessoas no mundo anualmente por meio de artrópodes hematófagos, os quais vêm disseminando quatro sorotipos antigênicos distintos deste arbovírus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (figura 2) (BHATT *et. al.*, 2013). Desta maneira, pessoas que vivem em regiões endêmicas, especialmente em zonas tropicais e subtropicais, podem ser infectadas até quatro vezes durante a vida.

Figura 2: Número de sorotipos de dengue em circulação nos países e territórios das Américas, 1995-2016.



Fonte: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34860/PAHOCHA17039_eng.pdf?sequence=5&isAllowed=y [PAHO, 2018].

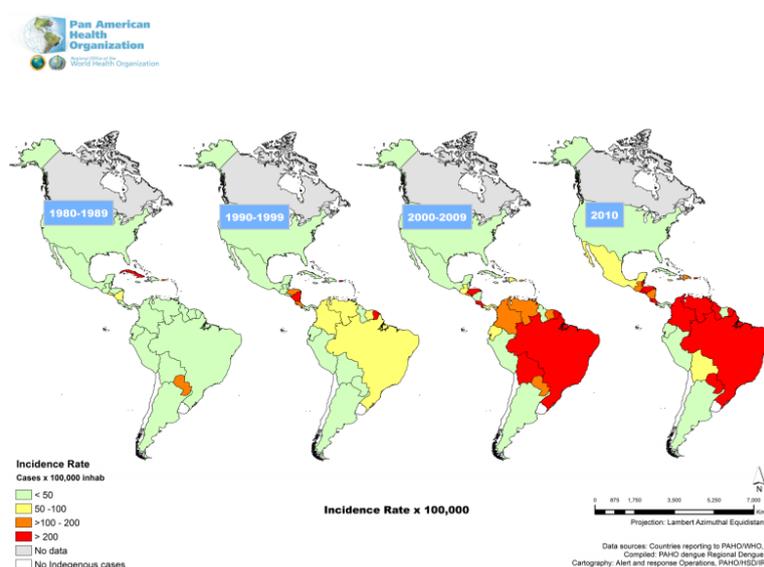
Tais áreas apresentam condições favoráveis ambientais para a ampla distribuição geográfica desta arbovirose, uma vez que os mosquitos transmissores

desta doença, como o *Anopheles gambiae* e o *Aedes aegypti*, desenvolvem-se em locais com elevada temperatura e humidade relativa, o que vem ocasionando sérios problemas socioeconômicos há séculos em regiões como América, África e Ásia (TOLEDO *et. al.*, 2019; SMITH, 2014).

Particular e historicamente no Continente Asiático relata-se na Enciclopédia Médica Chinesa os primeiros sintomas clínicos similares à Dengue durante a Dinastia de Chin (AD 265–420), a qual era conhecida como “veneno da água”, pois era associada a insetos que dependiam da água para seu desenvolvimento. Ao longo dos tempos, outros registros reportam incidências de epidemia com sintomas equivalente a esta doença, como nas Índias Ocidentais Francesas (1635) e na América Central (1699), com uma grande expansão territorial antes do século XVIII (GUBLER, 1998; CAREY, 1971; MARTÍN *et. al.*, 2010).

Especialmente nas Américas, Dick *et al.* (2012) têm identificado quatro períodos de incidências desta arbovirose entre 1600 e 2010: introdução do arbovírus nas Américas (1600–1946); bem sucedido plano de erradicação do vetor *Aedes aegypti* em 18 países (1947–1970); falhas neste plano levaram à re-emergência do vetor (1971–1999) e crescente surtos devido à grande disseminação do arbovírus pela grande expansão do vetor *Aedes aegypti* (MARTÍN *et. al.*, 2010). Ressalta-se o número de casos reportados no ano de 1980, com cerca de 1 milhão de vítimas e mais de 4 milhões de 2000 a 2010. Desde então, percebeu-se que a DENV apresenta um padrão de endemo-epidemia, com surtos a cada 3 a 5 anos (figura 3) (DICK *et. al.*, 2012).

Figura 3: Incidência de DENV nas Américas de 1980 a 2010.



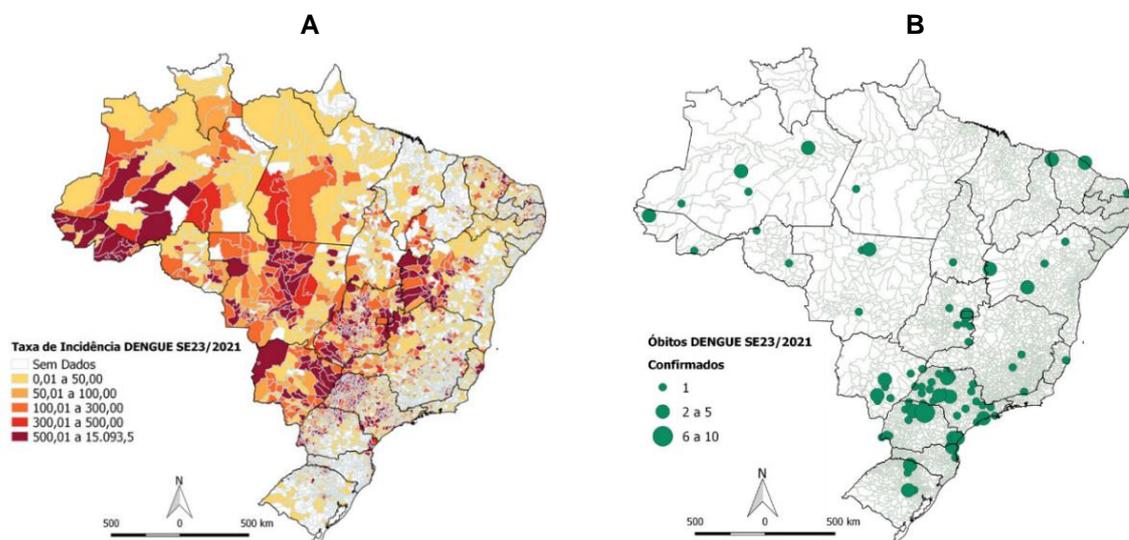
Fonte: PAHO, 2018.

Em relação às consequências na falha no plano de erradicação do vetor no Brasil, ressalta-se que desde a primeira epidemia de DENV-1 e DENV-4 no estado de Roraima (1981-1982), o *Ae. aegypti* ainda vem disseminando tal arbovirose continuamente. A partir de então, inúmeras dificuldades no controle do vetor acarretaram sua rápida propagação pelo país, o que pode estar relacionado à fácil e crescente locomoção de pessoas pelo país. Desta maneira, em 1986 o vírus do tipo DENV-1 inicia nova epidemia no Estado do Rio de Janeiro e algumas regiões do Nordeste. No verão de 2001 – 2002, DEN-3 é reintroduzido no País, levando a uma nova onda epidêmica (SAÚDE, 2019).

Em 2015, a ANVISA aprova uma vacina comercial contra os quatro sorotipos da DENV (Dengvaxia), contudo além do seu alto custo, ainda não há um consenso sobre a sua eficácia, o que levou esta agência reguladora a recomendar o não uso desta vacina no Brasil, tendo em vista a possibilidade de estar associada ao aumento de doenças graves em pessoas nunca contaminadas com o DENV (WHO, 2019; BRASIL, 2017; REUTERS, 2018; SILVEIRA *et. al.*, 2019).

Atualmente, segundo dados epidemiológicos do Brasil, cerca de 379.150 casos de DENV foram registrados entre as semanas epidemiológicas (SE) 1 a 23 (janeiro a junho de 2021), com maior taxa de incidência na região Centro-Oeste (397,8 casos/100 mil habitantes). Ressalta-se que 2.251 casos de dengue com sinais de alarme têm sido notificados no país, com 116 óbitos confirmados (figura 4) (BRASIL-E, 2021).

Figura 4: Casos de DENV e óbitos por ela causado de janeiro a junho de 2021.

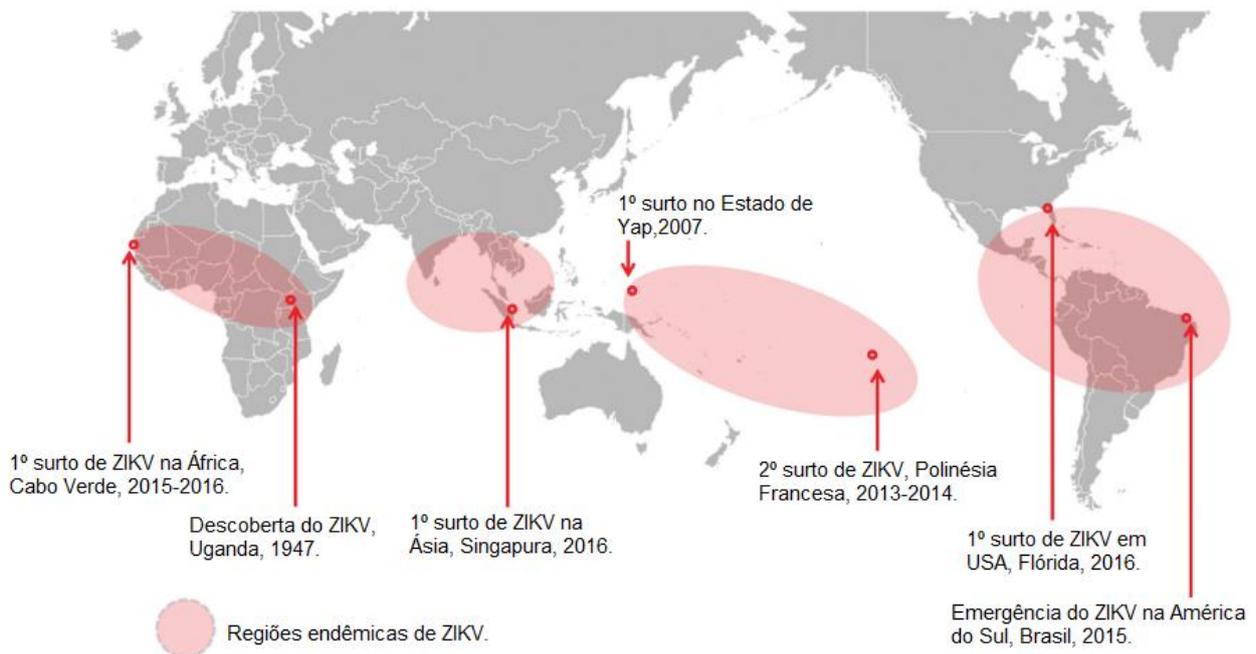


Fonte: Ministério da Saúde, 2021 (BRASIL, 2021).

2.2.2. Zika

Apesar do Zika Vírus (ZIKV) ter sido descoberto em 1947, ainda havia pouco entendimento sobre a virulência e seu potencial patogênico até os primeiros surtos de Síndrome de Guillain-Barré na Polinésia Francesa (2013-2014), num momento em que foi detectado elevada taxa de infecção pelo ZIKV (figura 5) (GUBLER, 2017; KOBINGER, G., RACINE, T., 2020).

Figura 5: Regiões geográficas onde o Zika vírus (ZIKV) é enzoótico / endêmico, com surto de epidemias.



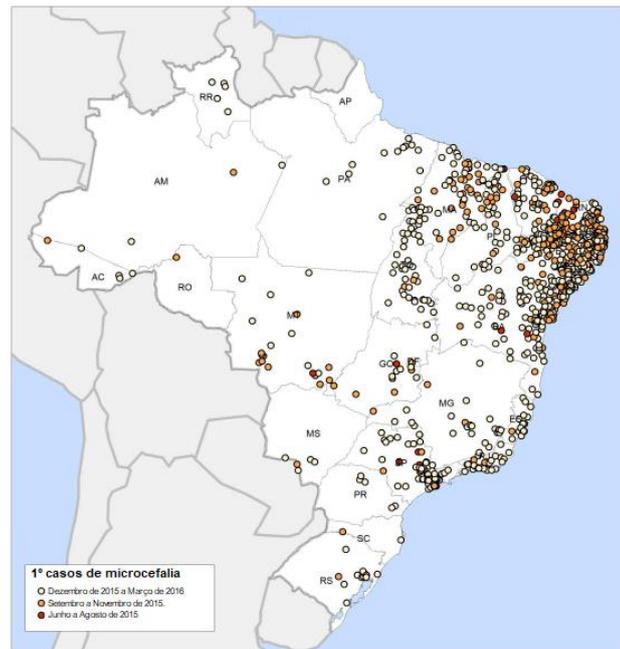
Fonte: GLUBER *et. al.*, 2017.

Desde então, a globalização acelerada, principalmente em relação ao desenvolvimento do transporte aéreo, tem contribuído na disseminação desse arbovírus (e tantos outros) para outros continentes, principalmente após o surto nas Ilhas Yap (figura 5). Em suma, tal expansão geográfica tem sido associada ao crescente número de casos de microcefalia em recém-nascidos em 31 países e territórios, especialmente no Nordeste do Brasil entre 2015 e 2016 (figura 6) (LOWE *et. al.*, 2018; WHO, 2018).

Ressalta-se que nesta época ainda havia poucos estudos sobre este vírus neurotrópico, o que levou a um desafio na sua identificação devido à ocorrência de reatividade cruzada com outros flavovírus, cujos sintomas eram muito próximos da

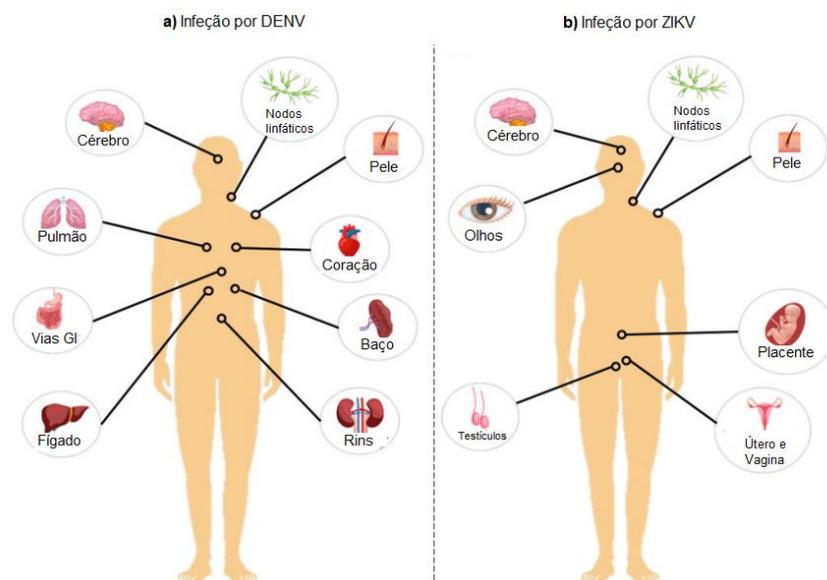
dengue, uma vez que ambos os vírus afetam alguns órgãos em comum (figura 7). Logo, entre as formas de detecção do ZIKV utiliza-se fluídos biológicos, como urina e sêmen e sorológicos de IgM (SILVA *et. al.*, 2020).

Figura 6: Distribuição geográfica da microcefalia no Brasil, junho de 2015 a março de 2016.



Fonte: LOWE *et. al.*, 2018.

Figura 7: Representação dos órgãos-alvos afetados pelo arbovírus DENV (a) e ZIKV (b).



Fonte: SILVA *et. al.*, 2020 (KOBINGER e RACINE, 2020)

2.2.3. Chikungunya

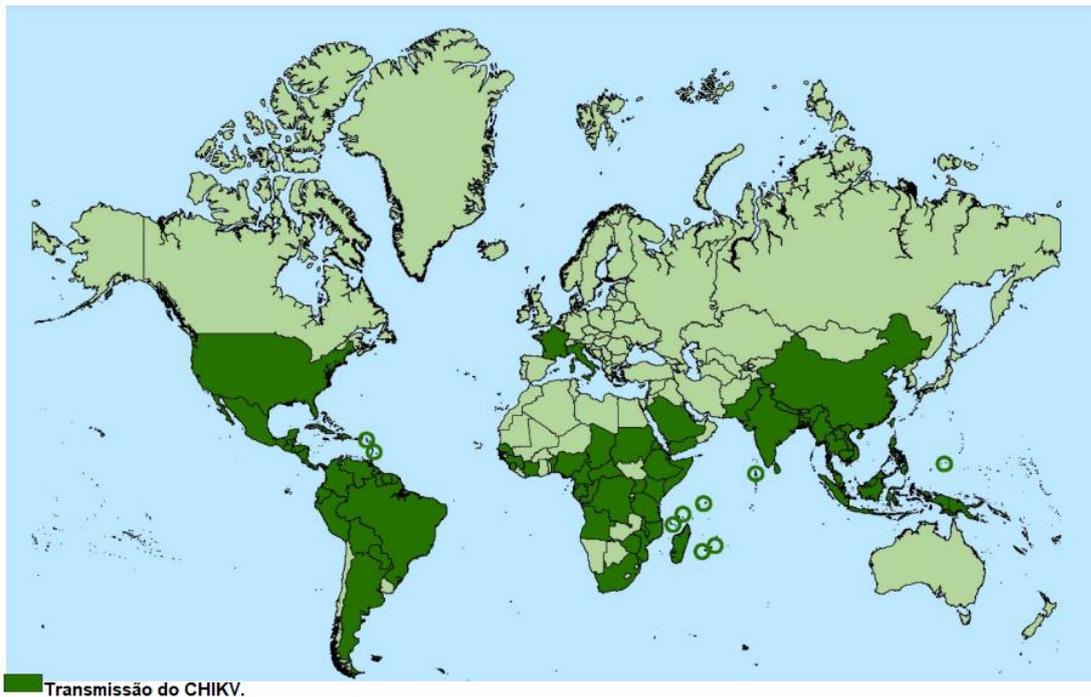
O Vírus Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus RNA esférico, de fita simples e sentido positivo do gênero *Alphavirus*, pertencente à família *Togaviridae* (CHEN, 2017). A sua ampla expansão pelo mundo tem sido favorecida pelas adequadas condições ambientais nas zonas tropicais e subtropicais para o vetor transmissor deste arbovírus, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, os quais também vêm adaptando-se a regiões temperadas (figura 8) (ANDRÉ *et. al.*, 2019).

Ressalta-se que, num contexto de aquecimento global e outras mudanças ambientais antropogênicas, esse e outros arbovírus representam um grave problema para saúde pública, pois apresentam uma grande adaptabilidade às mudanças socioambientais que repercutem na intrínseca relação vertebrados/hospedeiros e condições ambientais (ANDRÉ *et. al.*, 2019; YACTAYO *et. al.*, 2016).

Nesse sentido, na figura 8 vê-se a ampla extensão do CHIKV pelo mundo, cujo padrão epidemiológico inclui casos esporádicos e epidêmicos. Especialmente nas Américas, o vírus dissemina-se a partir da Ilha de Saint Martin em 2013 (WHO, 2017) acarretando cerca de 600.000 casos suspeitos e 40.000 casos confirmados da doença em 2015, cujos sintomas, entre agudos e subagudos, são marcados por febre, que frequentemente vem acompanhada por dores nas articulações (HONÓRIO *et. al.*, 2015).

No Brasil, os primeiros relatos de transmissão autóctone de febre Chikungunya foram detectados em 2014 na cidade de Oiapoque, no Estado do Amapá. A partir de então, cerca de 2.772 casos de CHIKV foram notificados no país nesse mesmo ano, como em Amapá (1.154) e Bahia (1.214) (CDC, 2020).

Figura 8: Casos de Chikungunya no mundo a partir de 2018.



Fonte: Centro Europeu para Prevenção e Controle de Doenças [CDC, 2020].

Portanto, é de suma importância ações que visem ao controle populacional dos vetores transmissores desse e tantos outros arbovírus potencialmente patogênicos que podem levar a epidemias. Para a prevenção contra o CHIKV ainda não há vacinas disponíveis para a população.

2.3. Morfologia da larva do *Aedes aegypti*

Morfologicamente a larva do *Aedes aegypti* caracteriza-se por apresentar um aspecto alongado e cor escura, com um corpo subdividido em cabeça, tórax e abdômen, seguido pelo seguimento anal e sifão (figura 9). Em relação à **cabeça**, esta é arredondada, composta um par de olhos (localizados nas laterais) e antenas, além de aparelho bucal com escovas orais ou palatais, cujo movimento ocasiona correntes hídricas que favorecem à entrada do alimento para a boca, que apresenta mandíbula e maxilar articuláveis (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994).

O **tórax** apresenta uma forma elíptica, onde se encontra o coração, cuja função é impulsionar a hemolinfa (sistema circulatório dos artrópodes) por meio de contrações peristálticas para toda a extensão corporal da larva (CLARK *et. al.*, 1999;

LEMOS, 2018; GLENN, 2010). Ademais, nesta região localiza-se o ceco gástrico que atua na digestão e homeostase de íons (D'SILVA, e O'DONNELL, 2018).

Este último órgão, por sua vez, é uma extensão do intestino médio, o qual se situa na seção posterior do **abdômen**. Sendo o principal local na digestão de alimentos, o intestino médio é o órgão mais susceptível ao ataque de vírus e bactérias e substâncias tóxicas advindas do metabolismo sanguíneo, como o grupo prostético heme que pode resultar na oxidação de ácidos nucleicos (TAPPEL, 1955) lipídeos (VINCENT *et. al.*, 1988; AFT, R.L.; MUELLER, G.C., 1984) e proteínas (AFT e MUELLER, 1984; VINCENT, 1989; WHITEN *et. al.*, 2018).

Desta maneira, a fim de proteger-se contra tais patógenos e o estresse mecânico a partir da alimentação, o bolo alimentar sanguíneo é revestido por uma membrana extracelular semipermeável formada por quitina, glicoproteína e proteoglicano, denominada **matrix (ou membrana) peritrófica** (ABRAHAM, 2004; AGRAWAL *et. al.*, 2014; HEGEDUS *et. al.*, 2009; BILLINGSLEY e LEHANE, 1996).

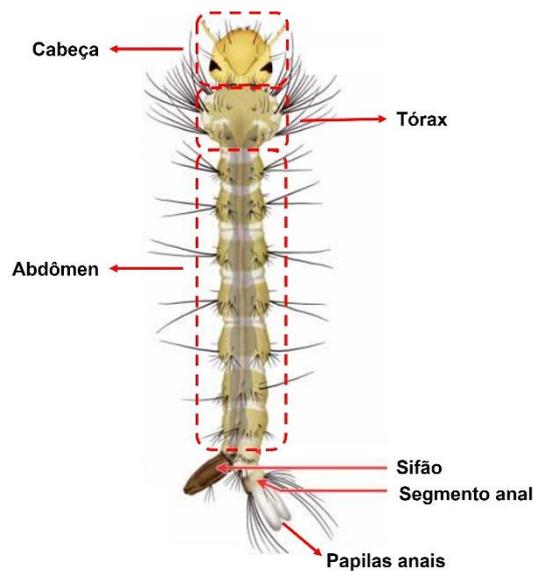
Essa membrana, por sua vez, age como uma barreira de proteção do tecido epitelial, que é composta por células digestivas (produção de enzimas proteolíticas, principalmente tripsina), endócrinas (regulação das funções do epitélio digestivo, células musculares e sistema nervoso) e regenerativas (que se diferenciam em ambas as células) (MOFFETT, 2005; BROWN *et. al.*, 1985; BRADLEY, 1987).

Ressalta-se que além da função de absorção de nutrientes, o intestino médio também participa do sistema de controle da pressão osmótica e regulação iônica, em conjunto com outros órgãos, como reto e papilas anais e **tubos de Malpighian** (localizados a partir do 6º segmento do abdômen) (RAMSAY, 1950). Esse último, por sua vez, produz urina por meio do transporte de íons da hemolinfa para o lúmen (BRADLEY *et. al.*, 1982; BRADLEY e PHILLIPS, 1975).

Contudo, devido ao meio aquoso onde a larva se encontra, para evitar a diluição do sistema circulatório mediante processo de osmose, o **reto** reabsorve íons da urina para a hemolinfa (BRADLEY, 1972; STOBART, 1967). Ademais, as quatro **papilas anais** (que surgem de uma extensão do segmento terminal) igualmente contribuem tal manutenção osmótica absorvendo íons do meio aquoso externo, como Na⁺ e Cl⁻ (MISYURA *et. al.*, 2020; LEE *et. al.*, 2017).

Por fim, na superfície dorsal do oitavo segmento abdominal encontra-se um tubo cilíndrico uma estrutura respiratória, denominada sifão, cujas extremidades abrem-se os espiráculos para a passagem de oxigênio (BECKER *et. al.*, 2010; RUEDA, 2004).

Figura 9: Morfologia da larva do *Aedes aegypti*.



Fonte: Adaptado de RUEDA, L. 2004.

2.4. Meios de controle do vetor

Segundo Braga e Valle (2007), o controle de artrópodes, especialmente aqueles transmissores de doenças parasitárias e virais, tem por objetivo impedir a infecção por arbovírus patogênicos por meio da interrupção ou redução da disseminação desses vírus, sendo as principais metas no âmbito da Saúde Pública: prevenir epidemias e/ou a reintrodução de doenças e diminuir os fatores de risco ambiental de transmissão, assim como manobrar adversidades existentes.

Para tanto, ressalta-se que é imprescindível a aplicação de mais de uma estratégia de controle para uma efetiva redução populacional do vetor e, conseqüentemente, diminuição na taxa de incidência de arboviroses (POOPATHI e TYAGI, 2006). Nesse sentido, a utilização de um manejo integrado tem sido uma prática adequada em muitos programas de saúde pública, a qual inclui: vigilância,

manejo ambiental, controle biológico e químico, com uso de inseticidas (e/ou repelentes) e microrganismos, respectivamente, além de armadilhas e manejo da resistência a inseticidas (ROSE, 2001).

Destaca-se que o **manejo ambiental**, engloba um conjunto de medidas a fim de eliminar os fatores de riscos ambientais, tais como criadouros (muito comuns em terrenos baldios), mobilidade e concentração populacional (BRAGA e VALLE, 2007). Logo, busca-se minimizar a propagação do vetor por meio da conscientização da população para boas práticas na gestão de resíduos sólidos, a fim de eliminar corpos d'águas; instalação de telas em portas e janelas, entre outros (SAÚDE, 2019, 2009; ZARA *et. al.*, 2016).

Em relação às ações voltadas para o **controle biológico**, essas objetivam à redução populacional vetorial por meio da aplicação de predadores ou patógenos naturais, tais como artrópodes larvívoros (gênero *Toxorhynchites*), uma vez que não necessitam de sangue para a finalização de seu ciclo gonotrófico; já em áreas com grandes corpos d'água, pode-se utilizar peixes larvívoros (espécies *Gambusia* e *Fundulus*) (EVANS *et. al.*, 2018).

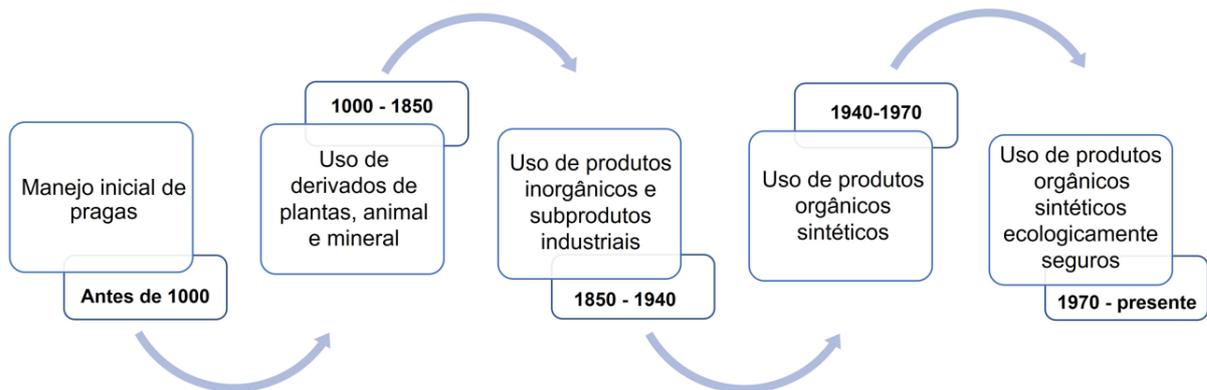
Outra técnica de biocontrole é o uso de fungos entomopatogênicos. Estudos comprovam a susceptibilidade de larvas do *Aedes aegypti* ao *Beauveria tenella* e *Metarhizium anisopliae*, enquanto a sua forma adulta é sensível ao *Entomophthora culici* (EVANS *et. al.*, 2018; MULLA *et. al.*, 1982). Ademais, certas bactérias têm demonstrado potencial promissor na redução populacional do vetor, como *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) (GOLDBERG e MARGALIT, 1977) e *Bacillus sphaericus* (Bs) (MULLIGAN *et. al.*, 1980).

No que concerne ao **meio químico**, esse se baseia no uso de substâncias químicas (inseticidas) que atuam no controle do vetor na forma imatura mosquito (larvas e pupas), podendo atuar por meio de vias neurotóxicas (organofosforados) ou inibição na síntese de quitina. Além do mais, podem atuar na fase adulta do *Aedes aegypti*, por meio da regulação de seu crescimento (piretróides) (MCGREGOR e CONNELLY, 2021). Tais mecanismos de ação, em suma, causam modificações em vias bioquímicas no vetor, expressando-se de maneira tóxica à sua sobrevivência.

2.5. Principais Classes de Inseticidas: Modos de Ação e Efeitos off Targets

A história evolutiva do uso de pesticidas é subdividida em cinco fases (esquema 1):

Esquema 1: Linha cronológica sobre o desenvolvimento de pesticidas.



Fonte: UNSWORTH, 2019.

Nesse contexto, especificamente o desenvolvimento de inseticidas tem progredido entre diferentes gerações, iniciando-se a partir do século XIX com a aplicação de **compostos inorgânicos** no controle de um grande número de pragas em plantações, tais como compostos arseniais (arsênico branco, arseniato de alumínio, cálcio e chumbo), fluorados (criolita, fluoreto de sódio) e miscelânea (calda sulfo cálcica, sulfatos, entre outros) (FARIA, 2009).

Em seguida, surge a classe dos **Organoclorados** durante a II Guerra Mundial, num cenário de crescente disseminação da malária, sendo o diclorodifenil-tricloroetano (DDT) o primeiro a ser comercializado. Ressalta-se que esta geração de inseticida foi gradativamente inutilizada devido a sua toxicidade frente a vertebrados, sendo proibida a sua comercialização e utilização por órgãos de saúde pública (FARIA, 2009).

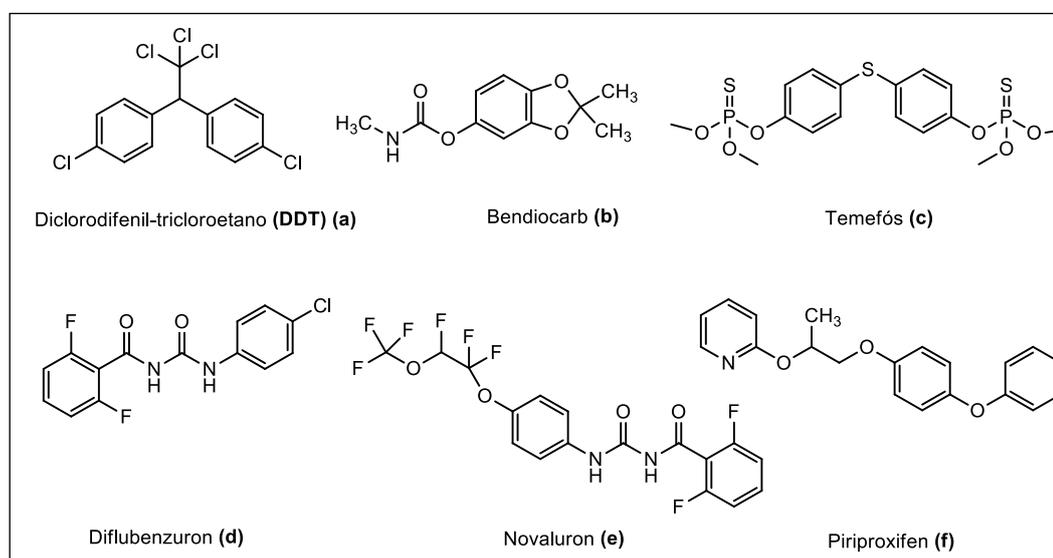
Posteriormente, observou-se que derivados do ácido fosfórico apresentavam grande potencial larvicida, o que levou ao início da segunda geração de inseticidas com o advento dos **Organofosforados** a partir de 1940, cujo modo de ação relaciona-se à inibição irreversível da enzima acetilcolinesterase. Em meados de 1950 emerge outra classe de compostos, os **Carbamatos**, que são ésteres de ácido N-metil

carbâmico, igualmente atuando no mesmo alvo enzimático da classe anterior, como o Bendiocarb (figura 10) (FARIA, 2009; REYNOSO -LÓPEZ *et. al.*, 2021).

Ressalta-se que ésteres orgânicos derivados do ácido fosfórico (organofosforados), com ligações entre C – P, a exemplo o temefós, apresentam efeitos tóxicos em espécies *off-targets*, o que está relacionado à prolongada persistência no meio ambiente devido a sua estabilidade química, térmica e resistência à degradação fotolítica (KUMAR *et. al.*, 2021; GREAVES e LETCHER, 2017; SUN *et. al.*, 2016). Entre as implicações tóxicas, destaca-se consequências neuroteratogênicas, genotoxicidade, desordens hepatológicas e endócrinas em vertebrados (SUN *et. al.*, 2016; PINKAS *et. al.*, 2015; KUMAR *et. al.*, 2016). Ademais, pesquisas têm demonstrado relação entre inúmeras doenças crônicas, como obesidade, câncer e diabetes, com carbamatos, sendo alguns adicionados na lista de Produtos Químicos Desreguladores Endócrinos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2013) (WHO, 2013; MNIF *et. al.*, 2011; BALLANTYNE e MARRS, 1992).

Dessa maneira, a fim de solucionar tal problema inicia-se uma nova geração de inseticidas, conhecida pelo seu novo mecanismo de ação biológico, os **reguladores de crescimento**. Esses, por sua vez, substituíram o uso do temefós no Brasil a partir de 2013, sendo o diflubenzuron o primeiro a ser empregado, o qual atua inibindo a síntese de quitina. Em 2014, passou-se a utilizar um outro composto com o mesmo modo de ação, o novaluron e a partir de 2015 até 2019 o piriproxifen (figura 10), análogo do hormônio juvenil do *Aedes aegypti* (FONSECA *et. al.*, 2019).

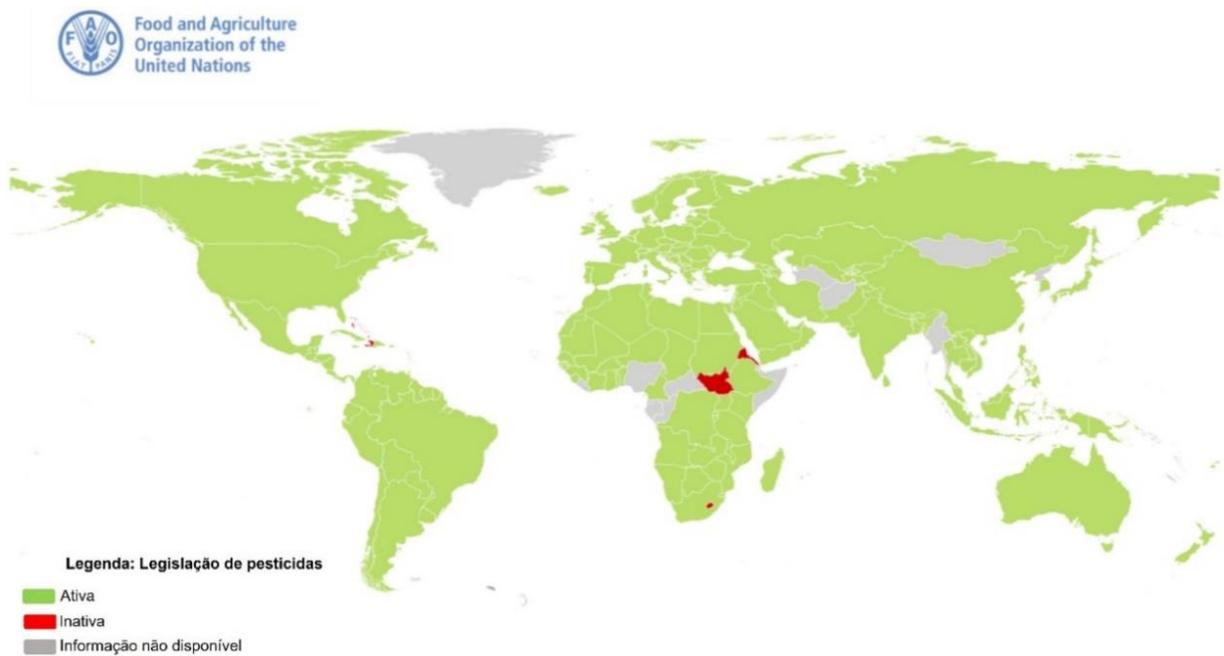
Figura 10: Inseticidas aplicados no controle do vetor *Aedes aegypti*.



Fonte: Autor, 2022.

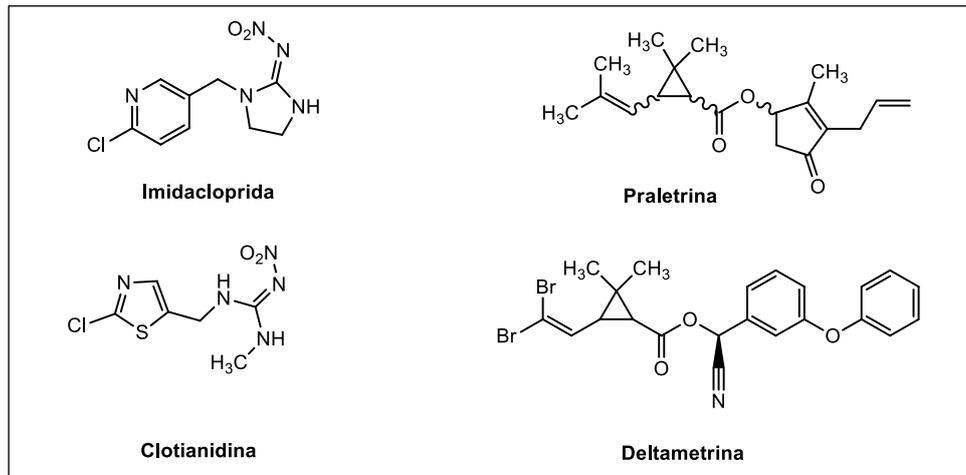
Atualmente, nos programas de controle vetorial, os produtos autorizados pelo Ministério da Saúde são baseados no Código Internacional de Conduta sobre Gerenciamento de Pesticidas da FAO/OMS (figura 11): Spnosad, SumiShield, Fusion, Fludora® e Cielo, sendo estes dois últimos os que mais vêm sendo utilizados por diversas Secretarias de Saúde Estaduais no Brasil (BRASIL, 2019; FONGNIKIN *et al.*, 2020) cujo modo de aplicação é o residual (pulverização em paredes ou outras superfícies) para o Fludora e espacial para o outro (a Ultra Baixo Volume (UBV) com nebulizadores costais ou equipamentos acoplados aos veículos) (OPAS, 2019).

Figura 11: Países com Legislação Pesticida baseada no “Código Internacional de Conduta em Manejo de Pesticida.



Fonte: Food and Agriculture Organization of the United Nations (<http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/code/en/>) (adaptado pelo autor, 2022).

Ambas as formulações destes produtos equivalem a uma mistura de dois inseticidas, pertencentes à classe dos **neonicotinoides e piretroides** (Cielo: 3,00% imidacloprida + 0,75% praletrina; Fludora: 50,00% Clotianidina + 6,25% deltametrina) (BRAISL-A, 2019; WHO, 2019) (figura 12).

Figura 12: Atuais inseticidas utilizados no combate ao *Aedes aegypti* no Brasil.

Fonte: Autor, 2022.

De forma geral, os neonicotinoides (imidacloprida e clotianidina, por exemplo) vêm sendo comercializados desde 1900 (inseticidas de 2ª geração (HORIKOSHI, 2018), agindo seletivamente nos receptores de acetilcolina nicotínicos de artrópodes (IHARA e MATSUDA, 2018). Contudo, segundo Goulson (2018) essa classe de compostos tem sido criticada devido a um possível efeito tóxico em espécies *off target*, como insetos polinizadores.

Por fim, em relação aos piretroides, destaca-se que esses surgiram a partir de diversas modificações estruturais do inseticida natural terpenóide pyrethrin (ELLIOTT, 1995) cujo mecanismo de ação envolve a modificação na cinética dos canais de sódio do sistema nervoso central dos insetos (SODERLUND, 2010) podendo ser tóxicos aos vertebrados a depender da rota de administração e dosagem (SODERLUND, 2012; CLARK, 1995).

2.6. Planejamento e desenvolvimento de inseticidas seletivos- a importância de interações não-covalentes

O controle de vetores é uma das principais estratégias atuais para reduzir exponencialmente a transmissão de vírus patogênicos, como a Dengue, Zika e Chikungunya. Contudo, mudanças socioambientais, tais como desmatamento, saneamento inadequado e intensificação no uso de agroquímicos, vêm contribuindo na resistência dos vetores frente a inseticidas, o que leva a uma necessidade urgente

de se planejar novas moléculas com potencial inseticida e seletiva para uma dada espécie (WILSON *et. al.*, 2020; WHO, 2011; BARRES *et. al.*, 2016).

Desta maneira, o uso desses compostos tem resultado em muitos benefícios no controle populacional de mosquitos transmissores de arbovírus, sendo por isso um dos principais instrumentos no combate a esses vetores (BARRES *et. al.*, 2016). Porém, entre a descoberta e o desenvolvimento de novos compostos, há um tempo de 8 a 10 anos com milhões de dólares de investimento (WHITFORD, 2021). Por isso, a fim de conduzir uma descoberta efetiva de um promissor inseticida, são essenciais estudos *in silico* para a seleção de uma molécula que apresente equilíbrio entre potência e biodisponibilidade para um determinado alvo biológico (OASHI *et. al.*, 2011; DAVID, 2017).

Nesse contexto, enzimas são macromoléculas alvo tanto no campo da descoberta de fármacos, como também no desenvolvimento de pesticidas, em que uma das principais razões para tal encontra-se na sua crucial importância para diversos processos vitais em sistemas biológicos, como o metabolismo. Outrossim, ela é particularmente vulnerável à modulação por pequenas moléculas por interações seja de natureza covalente ou não (COPELAND *et. al.*, 2007; HOPKINS e HOPKINS, 2002).

Neste sentido, entre os diversos modos de ação de inseticidas, a alteração no funcionamento do sistema nervoso dos artrópodes, particularmente o *Aedes aegypti*, tem sido um dos principais mecanismos de ação para o controle desse vetor, sobretudo a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), que atua na hidrólise do principal neurotransmissor excitatório dos insetos, acetilcolina (SPONG *et. al.*, 2016).

Porém, em diversas espécies de mosquitos, incluindo *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti*, constata-se uma alteração na AChE codificada pelo gene *ace-1*, acarretando a substituição do aminoácido glicina pela serina na posição 119 (WEILL *et. al.*, 2003; ALOUT, 2008). Tal mutação reduz a acessibilidade de inibidores do tipo organofosforados e carbamatos ao sítio ativo da enzima por impedimento estérico (CHEUNG *et. al.*, 2018). Em geral, populações desses artrópodes na América Latina, África e Europa vêm apresentando insensibilidade a essas classes de inibidores, o que evidencia a urgência no desenvolvimento de novos compostos potencialmente inseticidas e ecologicamente seguros (WEILL *et. al.*, 2003; PINTO *et. al.*, 2019).

Para tanto, é importante destacar certas diferenças estruturais dessa enzima entre mosquitos e mamíferos, especialmente o ser humano. Cheung e colaboradores (2018) revelam um distinto canal aberto próximo ao sítio catalítico na AChE do *Anopheles gambiae* (AgAChE) que não há na AChE humana (hAChE), cuja distinção é um caminho para elaboração racional de inseticidas mais seletivos. Porém, deve-se considerar que a natureza das interações químicas é um fator crucial para tal seletividade.

À vista disso, análise de cluster baseada experimentalmente em parâmetros cinéticos (K_{cat} , K_M , V_{max} , k_i) e valor de Concentração Letal para 50% de uma população (CL_{50}) comprovam que inibidores covalentes não são seletivos frente a espécies *off-target* (ENGDAHL, 2015). Por outro lado, é possível inibir a AChE mutante seletivamente por meio de interações $\pi - \pi$, especialmente com a unidade indólica Trp286, e ligações de hidrogênio com pequenas moléculas (ENGDAHL *et. al.*, 2016; KNUTSSON *et. al.*, 2018).

Por fim, segundo Carlier e colaboradores (2008) outras diferenças estruturais em dois loops na entrada da enzima, numa região conhecida como “sítio ativo gorge”, confere seletividade por interações de natureza hidrofóbicas com compostos potencialmente inibidores frente à AgAChE, a qual apresenta cerca de 80% de similaridade com a AChE do *Aedes aegypti* (AgAChE), de acordo com resultados de homologia estrutural do web servidor BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (MCGINNIS e MADDEN, 2004).

2.7. Reação de Morita-Baylis-Hillman: aspectos históricos e escopo multivariado

Em 1968 Morita e colaboradores descreveram uma nova reação entre compostos acrílicos e aldeídos catalisada por tricicloexilfosfina, obtendo-se produtos vinílicos com 70% a 90% de rendimento (MORITA, 1968). Em 1972, Anthony B. Baylis e Melville E. D. Hillman desenvolveram e patentearam uma variação dessa reação utilizando como catalisador uma amina terciária (BAYLIS, 1972) a qual foi nomeada “Reação de Baylis-Hillman” em 1988 por Drewes and Roos (SIEGFRIED e GREGORY, 1988).

Ressalta-se que essa metodologia sintética tem sido amplamente estudada em diversas áreas de fronteira da química, sendo os produtos dessa reação (adutos) blocos de construção de moléculas com aplicação em química de materiais e sistemas biológicos, tendo em vista seu caráter polifuncional (LANGER, 2000; BASAVIAH *et al.*, 2003 e 2010).

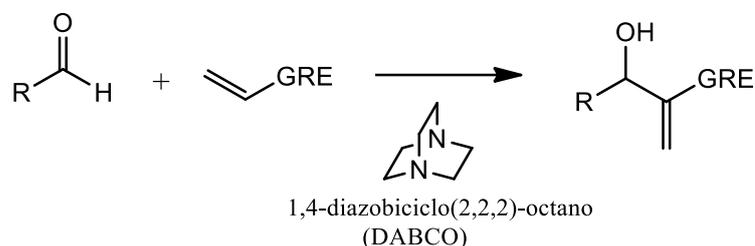
Especificamente em relação a este último, destaca-se que somente 14 anos após a sua descoberta por Morita é que o potencial desta reação passou a ser explorado na síntese de monoterpenos de origem natural (DREWES e EMSLIE, 1982), continuando atualmente a ser extensivamente aplicada na química medicinal (REDDY e RAO, 2018; LIMA-JUNIOR e VASCONCELLOS, 2012).

Nesse sentido, entre os diversos fatores que tornam essa metodologia largamente adotada em muitos ramos da química, sublinha-se a fácil disponibilidade comercial dos materiais de partida; a sua natureza de economia de átomo, enquadrando-se entre os princípios da química verde, ainda mais por não utilizar metal como catalisador, podendo ocorrer sem a utilização de solvente e à temperatura ambiente (WEI e SHI, 2013; SAIKIA e SARMA, 2010).

2.7.1. Definição geral

A metodologia de Morita-Baylis-Hillman (MBH) é uma reação entre a posição α de alcenos ativados, em que os Grupos Retiradores de Elétrons (GRE) podem ser ésteres, nitrilas, cetonas e amidas, entre outros (acrilato de metila, acrilonitrila e metil vinil cetona, acrilamida, por exemplo) e um carbono eletrofílico sp^2 (aldeídos) na presença de um catalisador, geralmente aminas terciárias ou fosfinas, levando à formação de moléculas polifuncionalizadas (esquema 2).

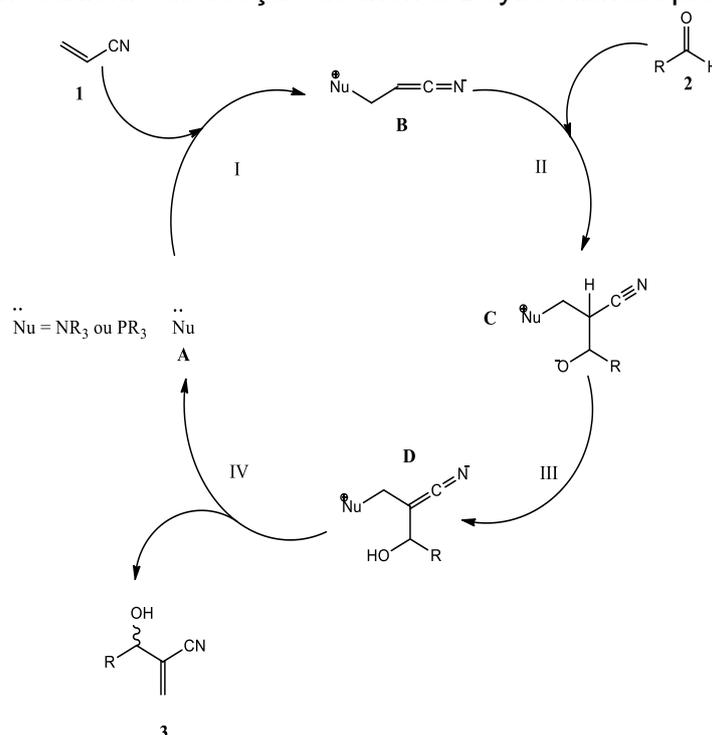
Esquema 2: Reação de MBH



2.7.2. Mecanismo

Entre as várias propostas mecanísticas para a reação de MBH, destaca-se a primeira delas apresentada por Hill e Isaacs, que envolve 4 etapas. Primeiramente, há uma adição de Michael do catalisador (**A**) ao sistema α,β -insaturado (**1**), gerando o intermediário zwitteriônico **B**. Em seguida, ocorre uma condensação aldólica para a formação do alcóxido **C**, sendo a etapa lenta da reação. O enolato **D**, por sua vez, é produzido por meio de um equilíbrio ácido-base intramolecular (etapa III). Por fim, o aduto **3** é gerado através de uma eliminação do tipo E₂ (etapa IV)¹, regenerando-se o catalisador **A** (esquema 3).

Esquema 3: Mecanismo da reação de Morita-Baylis-Hillman proposto por Hill e Isaacs.

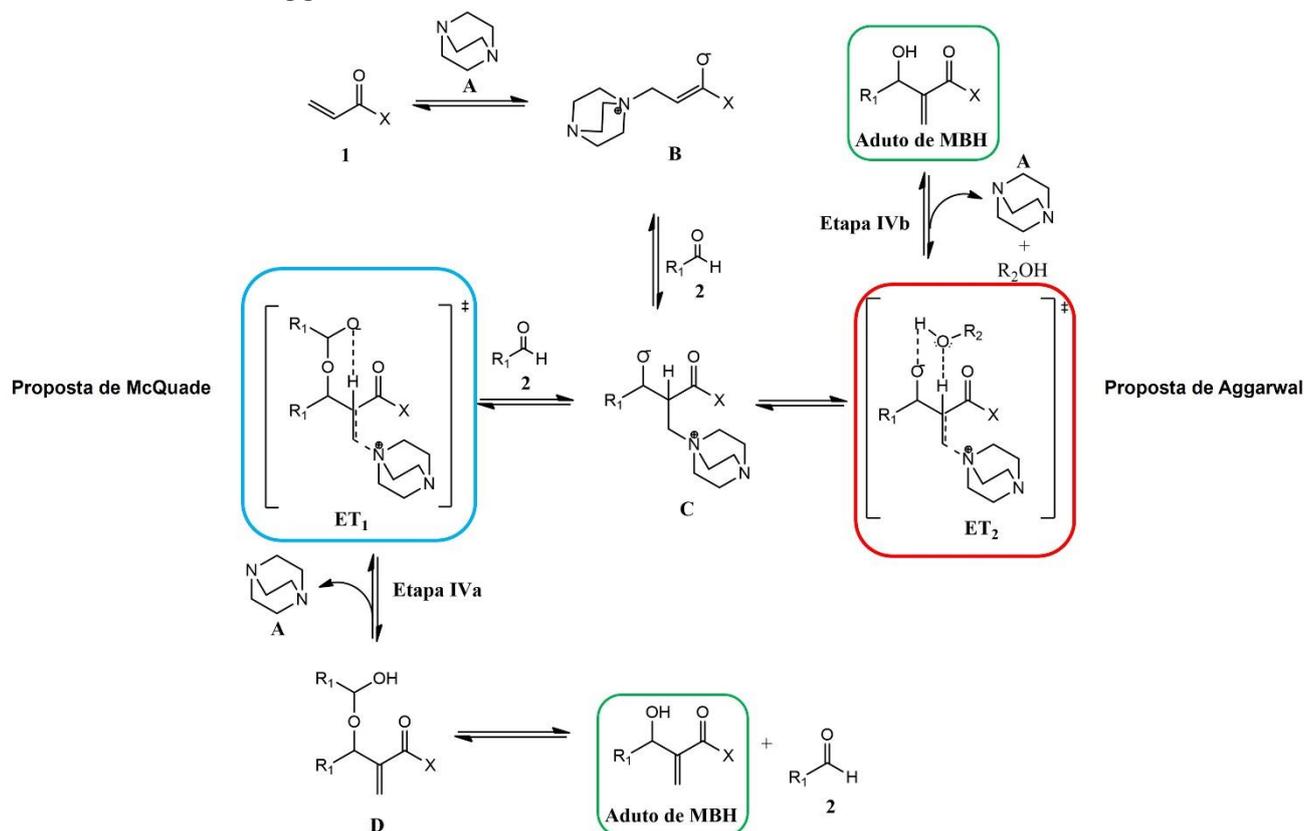


¹ As etapas **III** e **IV** podem ser compreendidas como uma única reação de eliminação do tipo E1cB auxiliada pelo DABCO, que atua como uma base de Lewis.

Ressalta-se que a etapa limitante da reação de MBH ainda é um centro de debates, o que leva a diferentes sugestões de mecanismos por diversos pesquisadores. Nesse sentido, a proposta de Hill e Isaac foi reavaliada por estudos mecanísticos desenvolvidos por McQuade (PRICE, *et. al.*, 2005) e também por Aggarwall *et. al.* (2005), em que o primeiro discute a reação de MBH na ausência de uma espécie doadora de próton (AGGARWAL *et al.*, 2002 (a) e 2003 (b)), ao contrário do segundo (AMARANTE *et al.*, 2009, SANTOS *et. al.*, 2004).

Em geral, ambos concordam que a etapa limitante da reação corresponde a uma transferência de próton, exceto se a reação ocorrer com aldeídos alifáticos e iminas, segundo análises computacionais (PRICE, 2005). Para McQuade *et. al.*, uma segunda molécula de aldeído **2** assiste na eliminação do catalisador **A** através de um estado de transição de seis membros (**ET₁**), que também é formado no mecanismo proposto por Aggarwall *et. al.* (2005) na presença de espécie prótica (esquema 4). Em suma, tal processo de transferência é corroborado por estudos de Amarante *et. al.* (2009) por meio de espectroscopia de Massas com Ionização por Electrospray (ESI-MS) (CARRASCO-SANCHEZ *et al.*, 2009).

Esquema 4: Natureza dual da reação de MBH segundo as propostas por McQuade e Aggarwal.



OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Planejar e sintetizar adutos de Morita-Baylis-Hillman para avaliação de potencial atividade larvicida frente ao vetor *Aedes aegypti*.

3.2. Objetivos específicos:

- i. Sintetizar compostos com potencial ação biológica por meio da reação de Morita-Baylis-Hillman;
- ii. Avaliar a atividade larvicida contra larvas do vetor *Aedes aegypti*;
- iii. Realizar análise morfológica das larvas sob ação dos adutos de MBH,
- iv. Verificar o possível mecanismo de ação dos adutos promissores por meio de estudo *in silico*.
- v. Discutir a Relação Estrutura-Atividade (REA) dos compostos sintetizados e avaliados.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As cromatografias em camada delgada foram realizadas em cromatoplaças de vidro com dimensões de 10 x 5 cm, utilizando-se sílica-gel 60 PF₂₅₄ adquirida comercialmente pela Merck, numa espessura de 0,25mm. Essas foram preparadas no Laboratório de Química Orgânica Aplicada a Materiais e Compostos Bioativos - LMC, da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Por fim, realizou-se a interpretação das placas CCD por meio de luz de radiação ultravioleta (UV-vis) no comprimento de onda (λ) de 254nm e 364 nm.

4.2. Cromatografia em Coluna (CC)

A maioria dos compostos sintetizados foi purificada por meio de CCC. Para tanto, utilizou-se sílica gel 60 (0,063 – 0,2 mm, MERK) e eluente conveniente de acordo com a característica de cada composto. As frações obtidas durante a purificação foram coletadas em vidros de penicilina de 10mL, sendo reunidas aquelas correspondentes ao produto puro e o eluente rotaevaporado.

4.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR)

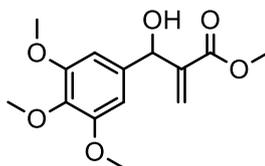
Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro modelo FTLA2000-102-ABB, do fabricante ABB Bomem com acessório de janela de KBr de 32mm de largura e 3mm de espessura, num intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , com médias de 16 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

4.4. Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono (RMN ^{13}C) foram obtidos pelo Núcleo de Análises e Pesquisa em Ressonância Magnética Nuclear (NAPRMN) em um equipamento Bruker Ascend 600,

na frequência de 600 MHz e 150 MHz respectivamente. Na preparação das amostras foi utilizado clorofórmio deuterado (CDCl_3), adquirido comercialmente pela Cambridge Isotope Laboratories, contendo Tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. As multiplicidades dos sinais de absorção de energia dos núcleos de hidrogênio nos espectros de RMN ^1H estão indicadas de acordo com a seguinte convenção: s (simpleto), d (dubleto), t (tripleto) e m (multiplete). Os deslocamentos químicos são expressos em partes por milhão (escala δ) e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz). Por fim, utilizou-se o software TopSpin 3.5pl 7 (2018-2019) (BRUKER BioSpin GmbH) para análise dos espectros de ^1H e ^{13}C .

4.5. Procedimento reacional para a preparação dos adutos de MBH



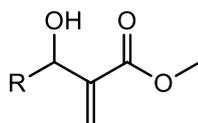
metil 2-hidroxi(3,4,5-trimetoxifenil)metil)acrilato (**3a**)

Em um balão de 50mL foram adicionados 98,1 miligramas de 3,4,5-trimetoxibezaldeído, 0,5mL de acrilato de metila (5,5 mmol) e 98 mg de DABCO (1 equivalente) diluídos em 1mL de metanol (MeOH), sob agitação e à temperatura ambiente por 96 horas (4 dias). O andamento da reação foi verificado por CCD e após seu fim, a mistura reacional foi diluída em clorofórmio (CHCl_3) e, em seguida, em solução de HCl a 10% (2 x 20mL). A fase orgânica foi seca com NaSO_4 e concentrada sob pressão reduzida. Por fim, o produto foi purificado em CCC (eluente: Hexano/acetato 70:30) (COELHO *et. al.*, 2002).

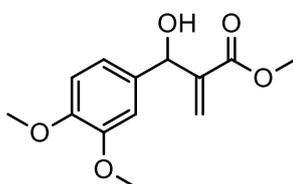
Líquido viscoso amarelo, 35% de rendimento. **RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)):** 6,6 (s, 2H); 6,3 (s, 1H); 5,8 (s, 1H); 5,5 (s, 1H); 3,8 (s, 9H); 3,8 (s, 3H).

^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 167,02 (C=O), 153,4 (2C, aromático), 142,0 (C), 137,7 (C, aromático), 137,0 (C, aromático), 126,3 (CH_2 , vinílico), 10,8 (2CH, aromático), 73,4 (CH, centro estereogênico), 27,6 CH), 60,9 (CH_3), 56,3 (2 CH_3), 52,2 (CH_3 , éster).

IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3457, 2960, 1724, 1596, 1330, 1128.



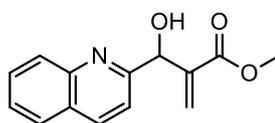
Em um balão de 50mL foram adicionadas quantidades equimolares de aldeído e acrilato de metila (0,5 mmol) com 20% de DABCO a temperatura ambiente. O andamento da reação foi verificado por CCD e após seu fim, a mistura reacional foi diluída com água destilada (50mL) e extraída com acetato de etila (3 x 50mL). A fase orgânica foi seca com NaSO₄ e concentrada sob pressão reduzida. Por fim, o produto foi purificado em CCC (eluente: Hexano/acetato 70:30). (SAIKIA, M.; SARMA, J. C, 2010).



metil 2-((3,4-dimetoxifenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3b**)

Sólido amorfo branco, 45% de rendimento. **RMN ¹H (600 MHz, CD₃OH, δ (ppm))**: 6,93 (s, 1H); 6,90 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H); 6,84 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); 6,33 (s, 1H); 5,85 (s, 1H); 5,53 (s, 1H); 3,90 (d, *J* = 4,7 Hz, 6H); 3,74 (s, 3H).

¹³C (150 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): δ 167,2 (C=O), 149,4 (aromático), 149,0 (aromático), 142,5 (vinílico), 134,3 (aromático), 126,0 (vinílico), 119,3 (aromático), 111,4 (aromático), 110,3 (aromático), 73,3 (estereocentro), 56,23 (metoxila), 56,20 (metoxila), 52,23 (C, éster).

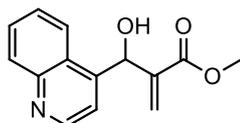


metil 2-(hidroxi(quinolin-2-il)metil)acrilato (**3c**)

Óleo vermelho, 92 % de rendimento. **RMN ¹H (600 MHz, CD₃Cl₃, δ (ppm))**: 8,1 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); 8,1 (d, *J* = 8,5, 1H); 7,8 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); 7,7 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H); 7,6 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H); 7,5 (d, *J* = 8,5, 1H); 6,4 (s, 1H); 6,0 (s, 1H); 5,8 (s, 1H); 3,8 (s, 3H).

^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): δ 167,0 (C=O), 159,7 (aromático), 146,7 (aromático), 142,1 (vinílico), 137,5 (aromático), 130,2 (aromático), 129,2 (aromático), 128,0 (aromático), 127,9 (aromático), 127,0 (vinílico), 119,2 (aromático), 72,2 (estereocentro), 52,3 (C, éster).

IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3444, 2970, 1644, 1378, 1087, 885.

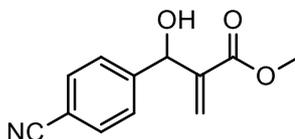


metil 2-(hidroxi(quinolin-4-il)metil)acrilato (**3d**)

Líquido laranja escuro, 95% de rendimento. **RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)):** 9,2 (s, 1H); 8,6 (s, 1H); 8,1 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H); 8,0 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,7 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H); 7,6 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H); 6,4 (s, 1H); 6,3 (s, 1H); 5,7 (s, 1H); 3,6 (s, 1H).

^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): δ 153,1 (C=O); 141,7 (vinílico); 130,5; 128,2; 127,0 (vinílico); 123,3; 68,9 (estereocentro); 52,1 (C, éster).

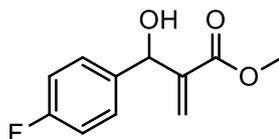
IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3344, 2922, 1737, 1615, 1436, 1248.



metil 2-((4-cianofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3e**)

Líquido translúcido, 99% de rendimento **RMN ^1H (600 MHz, CD_3OH , δ (ppm)):** 7,7 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H); 7,5 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,3 (s, 1H); 6,3 (s, 1H); 6,0 (s, 1H); 5,6 (s, 1H); 3,7 (s, 3H),

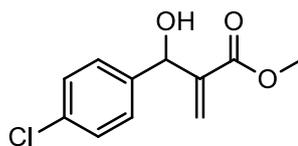
^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): δ 166,1 (C=O), 148,1 (aromático), 142,8 (aromático), 131,8 (2C, aromático), 127,7 (2C, aromático), 124,5 (vinílico), 118,3 (vinílico), 110,8 (aromático), 71,0 (estereocentro), 50,9 (C, éster).

metil 2-((4-fluorofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3f**)

Líquido translúcido, 99% de rendimento. **RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, δ (ppm))**: 7,3 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H); 7,0 (t, *J* = 8,6 Hz, 2H); 6,3 (s, 1H); 6,3 (s, 1H); 5,8 (s, 1H); 5,5 (s, 1H); 3,7 (s, 3H).

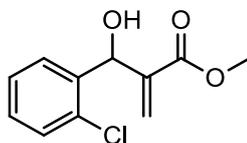
¹³C (150 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): δ 167,0 (C=O); 163,5 (aromático); 142,5 (vinílico); 137,6 (aromático); 128,7 (2C, aromático); 126,2 (vinílico); 115,6 (2C, aromático); 72,8 (estereocentro), 52,7 (C, éster).

IR (*v*_{max}/cm⁻¹): 3405, 2981, 1724, 1639, 1226, 1054.

metil 2-((4-clorofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3g**)

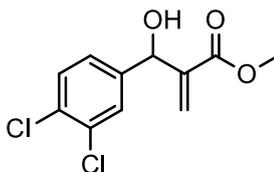
Óleo amarelo, 98% de rendimento. **RMN ¹H (600 MHz, CD₃OH, δ (ppm))**: 7,32 (d, *J* = 8,64 Hz, 2H); 7,29 (d, *J* = 8,70, 2H); 6,3 (t, *J* = 1,2 Hz, 1H); 6,0 (t, *J* = 1,4 Hz, 1H); 5,53 (s, 1H); 3,7 (s, 3H); 3,3 (s, 1H).

IR (*v*_{max}/cm⁻¹): 3432, 2960, 1718, 1152.

metil 2-((2-clorofenyli)(hidroxi)metil)acrilato (**3h**)

Óleo amarelo, 98% de rendimento. **RMN ¹H (600 MHz, CD₃OH, δ (ppm))**: 7,5 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H); 7,4 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H); 7,3 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H); 7,3 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H); 6,3 (s, 1H); 6,0 (s, 1H); 5,7 (s, 1H); 3,71 (s, 3H).

IR (*v*_{max}/cm⁻¹): 3432, 2952, 1725, 1639, 1440, 1060, 763.

metil 2-((3,4-diclorofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3i**)

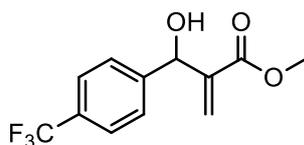
Líquido amarelo, 99% de rendimento. **RMN ¹H (600 MHz, CD₃OH, δ (ppm))**: 7,5 (s, 1H); 7,4 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 7,3 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 6,3 (s, 1H); 6,1 (s, 1H); 5,5 (s, 1H); 4,9 (s, 1H); 3,7 (s, 3H),

IR (ν_{max}/cm⁻¹): 3446, 2973, 1718, 1386, 1060.

metil 2-((4-bromofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3j**)

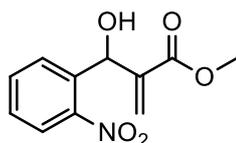
Líquido translúcido, 95% de rendimento. **RMN ¹H (600 MHz, CD₃OH, δ (ppm))**: 7,5 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H); 7,3 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H); 6,3 (s, 1H); 5,8 (s, 1H); 5,5 (s, 1H); 3,7 (s, 3H).

¹³C (150 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): δ 166,9 (C=O), 142,0 (aromático), 140,7 (vinílico), 131,9 (2C, aromático), 128,6 (vinílico), 126,6 (aromático), 122,1 (2C, aromático), 73,1 (estereocentro), 52,3 (3C, éster).

metil 2-(hidroxi(4-(trifluorometil)fenil)metil)acrilato (**3k**)

Sólido translúcido, 95% de rendimento. **RMN ¹H (600 MHz, CD₃OH, δ (ppm))**: 7,6 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H); 7,5 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H); 6,3 (s, 1H); 5,9 (s, 1H); 5,6 (s, 1H); 3,7 (s, 3H).

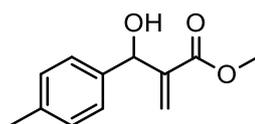
¹³C (150 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): δ 166,5 (C=O); 147,0 (aromático); 139,3 (vinílico); 129,8 (aromático); 127,3 (vinílico); 125,3 (2C, aromático); 124,9 (2C, aromático); 124,88 (CF₃); 71,5 (estereocentro); 45,93 (3C, éster).

metil 2-(hidroxi(2-nitrofenil)metil)acrilato (**3l**)

Óleo amarelo escuro, 99% de rendimento. **RMN ¹H (600 MHz, CD₃OH, δ (ppm))**: 8,0 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 7,8 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H); 7,7 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H); 7,6 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H); 6,4 (s, 1H); 6,2 (s, 1H); 5,7 (s, 1H); 3,7 (s, 3H),

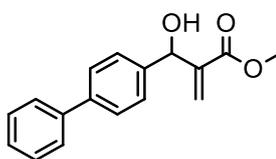
¹³C (150 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 166,4 (C=O), 148,4 (aromático), 140,9 (vinílico), 136,2 (aromático), 133,4 (aromático), 128,9 (aromático), 128,7 (aromático), 126,4 (vinílico), 124,6 (aromático), 67,7 (estereocentro), 52,2 (C, éster).

IR (*v*_{max}/cm⁻¹): 3403, 2958, 1725, 1637, 1531, 1359, 1054.

metil 2-(hidroxi(*p*-tolil)metil)acrilato (**3m**)

Rendimento de 25%. **RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, δ (ppm))**: 7,3 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H); 7,5 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H); 6,4 (s, 1H); 5,9 (s, 1H); 5,6 (s, 1H); 3,7 (s, 3H); 2,4 (s, 3H),

¹³C (150 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 166,8 (C=O), 138,4 (aromático), 137,5 (aromático), 129,1 (2C, aromático), 126,5 (2C, aromático), 125,8 (2C, vinílico), 73,1 (estereocentro), 51,9 (metil), 21,1 (grupo metil, éster).

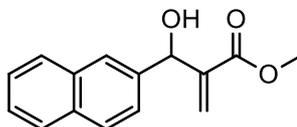
metil 2-([1,1'-bifenil]-4-il(hidroxi)metil)acrilato (**3n**)

Sólido amorfo branco, 72% de rendimento. **RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, δ (ppm))**: 7,5 (m, *J* = 8,2 Hz, 4H); 7,4 (m, *J* = 8,1 Hz, 4H); 7,3 (m, *J* = 8,5 Hz, 1H); 6,3 (s, 1H); 5,9 (s, 1H); 5,6 (s, 3H).

¹³C (150 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 167,1 (C=O), 142,3 (aromático), 141,1 (aromático), 140,7 (vinílico), 129,1 (aromático), 127,7 (vinílico), 127,5 (aromático), 127,4

(aromático), 127,4 (aromático), 126,5 (vinílico), 73,.4 (estereocentro), 52,3 (grupo metil, éster).

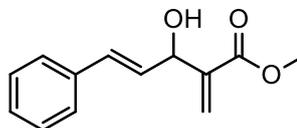
IR (ν_{max}/cm^{-1}): 3347, 2980, 1718, 1630, 1432, 1043.



metil 2-(hidroxi(naftalen-2-il)metil)acrilato (**3o**)

Sólido branco, 25% de rendimento. **RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)):** 7,9 (s, 1H); 7,8 (d, $J = 8,0$ Hz, 3H); 7,5 (d, $J = 8,0$ Hz, 3H); 6,4 (s, 1H); 5,9 (s, 1H); 5,7 (s, 1H); 3,7 (s, 3H); 3,1 (s, 1H).

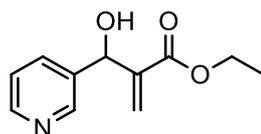
^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 167,2 (C=O), 142,3 (aromático), 138,9 (aromático), 136,6 (aromático), 133,4 (aromático), 128,55 (aromático), 128,47 (aromático), 126,7 (aromático), 126,5 (vinílico), 126,4 (aromático); 125,0 (aromático); 73,8 (estereocentro), 52,3 (C, éster).



(*E*)-metil 3-hidroxi-2-metileno-5-fenilpent-4-enoato (**3p**)

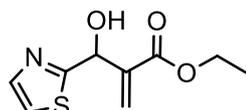
Óleo amarelo, 85% de rendimento. **RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)):** 7,4 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H); 7,3 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 7,2 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H); 6,6 (d, $J = 16$ Hz, 1H); 6,29 (d, $J = 6,2$ Hz, 1H); 6,27 (d, $J = 16$ Hz, 1H); 5,9 (s, 1H); 5,5 (s, 1H); 3,8 (s, 3H).

^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 167,0 (C=O); 141,8 (vinílico); 136,8 (aromático), 131,7 (aromático), 129,7 (aromático), 128,8 (vinílico), 128,1 (aromático), 126,9 (aromático), 125,9 (vinílico); 72,1 (estereocentro); 52,2 (C, éster).

etil 2-(hidroxi(piridin-3-il)metil)acrilato (**4q**)

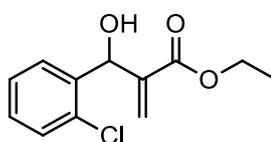
Líquido incolor, rendimento de 70 %. **RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, δ (ppm))**: 8,5 (s, 1H); 8,4 (dd, *J* = 4,8 Hz e 1,5 Hz, 1H); 7,9 (dt, *J* = 8,0 Hz e 1,8 Hz, 1H); 7,4 (dt, *J* = 7,3 Hz e 5,1 Hz, 1H); 6,4 (s, 1H); 6,0 (s, 3H); 5,6 (s, 1H); 4,2 (q, *J* = 7,0, 2H); 1,3 (t, *J* = 7,0, 3H),

¹³C (150 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 165,9 (C=O), 148,7 (aromático), 148,3 (aromático), 141,7 (aromático), 137,3 (vinílico), 134,5 (aromático), 126,1 (vinílico), 123,4 (aromático), 70,9 (C, estereocentro), 61,0 (grupo metileno), 14,0 (grupo metil).

etil 2-(hidroxi(tiazol-2-il)metil)acrilato (**4r**)

Óleo, rendimento de 90%. **RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, δ (ppm))**: 7,3 (d, *J* = 3,0 Hz, 2H); 7,7 (d, *J* = 3,0 Hz, 2H); 6,5 (s, 1H); 6,1 (s, 1H); 5,8 (s, 1H); 4,2 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H); 1,3 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H),

¹³C (150 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 172,6 (C=O), 166,0 (aromático), 142,3 (aromático), 139,8 (vinílico), 127,7 (vinílico), 119,7 (aromático), 71,8 (estereocentro), 61,6 (grupo metileno), 14,0 (grupo metil).

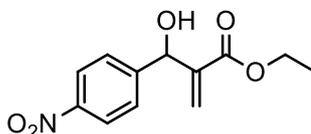
etil 2-((2-clorofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**4s**)

Óleo incolor, 90% de rendimento. **RMN ¹H (600 MHz, CD₃Cl₃, δ (ppm))**: 7,5 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H); 7,3 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,3 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H); 7,2 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H); 6,3 (s, 1H); 6,0 (s, 1H); 5,6 s, 1H); 4,2 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H); 1,3 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H),

¹³C (150 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 166,6 (C=O), 140,9 (aromático), 138,4 (vinílico), 133,0 (aromático), 129,5 (aromático), 129,0 (aromático), 128,2 (aromático), 127,0

(aromático), 126,6 (aromático), 69,4 (estereocentro), 61,1 (grupo metileno), 14,0 (grupo metil).

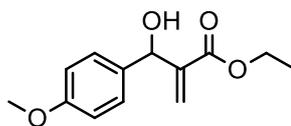
IR (ν_{max}/cm^{-1}): 3448, 2981, 1714, 1629, 1034.



etil 2-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)acrilato (**4t**)

Óleo amarelo, 96% de rendimento. **RMN ^1H (600 MHz, CD_3Cl_3 , δ (ppm)):** 8,2 (d, $J=8,8$ Hz, 2H); 7,6 (d, $J=8,6$ Hz, 2H); 6,4 (s, 1H); 5,5 (s, 1H); 5,6 (s, 1H); 4,2 (m, $J=7,1$ Hz, 2H); 1,3 (t, $J=7,1$ Hz, 3H),

^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 166,0 (C=O), 148,7 (C, aromático), 147,5 (C, aromático), 141,3 (2C, aromático), 127,3 (2C, aromático), 127,0 (C, vinílico), 123,6 (2C, aromático), 72,9 (C, estereocentro), 61,3 (C, éster), 14,0 (C, éster).



etil 2-(hidroxi(4-metoxifenil)metyi)acrilato (**4u**)

Óleo amarelo, 81% de rendimento. **RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)):** 7,3 (d, $J=9,0$ Hz, 2H); 6,9 (d, $J=9,0$ Hz, 2H); 6,4 (s, 1H); 5,8 (s, 1H); 5,5 (s, 1H); 4,2 (q, $J=7,0$ Hz, 2H); 3,8 (s, 1H); 1,3 (t, $J=7,0$ Hz, 3H),

^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 167,5 (C=O), 159,5 (aromático), 142,2 (alceno), 133,6 (aromático), 128,8 (2C, aromático), 127,7 (vinílico), 114,5 (2C, aromático), 72,1 (estereocentro), 55,8 (C, grupo p-metoxi) 61,7 (grupo metileno), 14,2 (grupo metil).

4.6. Avaliação da atividade larvicida

As análises foram realizadas no insetário do Laboratório de Química Orgânica Aplicada a Materiais e Compostos Bioativos - LMC, da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os vetores foram mantidos à temperatura de 27 ± 2 °C e $80 \pm 4\%$ de umidade, em água isenta de cloro, por um fotoperíodo de 12h. As larvas foram alimentadas com ração para gato durante todo o seu desenvolvimento.

Os bioensaios foram realizados sob uma abordagem qualitativa e quantitativa em triplicata. Para os testes qualitativos foram aplicadas as concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL e 5 µg/mL, empregando-se larvas do quarto estágio (L4). Para tanto, as soluções foram preparadas diluindo-se as amostras em 330 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), seguida da adição de água destilada até completar um volume de 100mL. Subsequentemente, alíquotas de 20 mL da solução teste foram transferidas para recipientes descartáveis de 50mL, adicionando-se, em seguida, 20 larvas.

Com base nos parâmetros da Organização Mundial de Saúde, o grau de mortalidade foi computado em 24 e 48h, tendo como controle positivo e negativo, respectivamente, o temefós (3µg/mL) e DMSO (330 µL). Assim, a percentagem de mortalidade seguiu os seguintes critérios: mortalidade superior a 75% considera-se o composto promissor; entre 50% e 75% parcialmente promissor; entre 25% e 50% fracamente promissor e inferior a 25% inativo (WHO, 2005). A atividade larvicida foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Percentagem de mortalidade das larvas} = \frac{\text{Número de larvas mortas}}{20} \times 100$$

Após os ensaios qualitativos, conduziu-se uma abordagem quantitativa, a fim de confirmar a ação larvicida dos ésteres e calcular a Concentração Letal que elimina 50% de uma população (CL₅₀), computando-se a mortalidade das larvas após 48 horas.

4.7. Análise microscópica de luz

Larvas do 4º instar de *Aedes aegypti* foram submetidas à solução de DMSO (0,33% v/v, controle negativo) e 100 µg / mL de **3n** e **4s**, cujos experimentos foram conduzidos

em triplicata. 24 horas após o tratamento, 3 larvas dos grupos controle negativo e tratado foram coletadas aleatoriamente e adicionadas a um tubo de polietileno com 5,0 mL de etanol (EtOH) e colocadas em uma lâmina de microscópio à temperatura ambiente para análise em microscopia de luz. As observações morfológicas foram feitas com um microscópio Olympus CX40 (aumento de 10X) equipado, com o auxílio de um celular Moto G3, com de câmera 13MP e resolução 720 x 1280px.

4.8. Estudos *in silico*

4.8.1. *In silico* Target Fishing: Predição de alvos moleculares

A fim de identificar possíveis alvos biológicos dos compostos sintetizados, aplicou-se a técnica de “target fishing” baseado na estrutura dos compostos que apresentaram promissora ação larvicida. Para tanto, utilizou-se o web servidor “Similarity Ensemble Approach (SEA) (<https://sea.bkslab.org/>)”. Desta forma, selecionaram-se os potenciais alvos moleculares em comum previstos entre os compostos promissores. Logo mais, aplicou-se a técnica de modelagem por homologia que será descrita na seção seguinte (KEISER *et al.*, 2007; SALVATORE *et. al.*, 2021).

4.8.2. Modelagem Molecular por Homologia Estrutural

Conduziu-se uma análise comparativa entre a sequência de aminoácidos da AaAChE com aquelas armazenadas na plataforma do BLAST, a fim de se encontrar um template para a construção do modelo da AaAChE (VYAS *et. al.*, 2012). Para tanto, obteve-se a sequência peptídica desta enzima na base de dados do UNIPROT (código: Q6A2E2). Logo mais, realizou-se uma busca de sequência homóloga através do método heurístico do webservidor BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Em seguida, o modelo foi gerado através da plataforma SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) (WATERHOUSE *et. al.*, 2018).

Logo mais, o refinamento da estrutura da enzima em nível atômico foi realizado segundo protocolo do servidor Fragment-Guided Molecular Dynamics (FG-MD)

(<https://zhanglab.dcmdb.med.umich.edu/FG-MD/>) (ZHANG *et. al.*, 2011). Por fim, para a avaliação da qualidade do modelo gerado, foi utilizado web servidor ProSA (Protein Structure Analysis) (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) (WIEDERSTEIN e SIPPL, 2007), gráfico de Ramachandran (MANNIGE *et. al.*, 2010) e o webservidor Verify 3D (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/Verify3D/>), a fim de se verificar o ambiente químico de cada resíduo no modelo.

4.8.3. Docking Molecular

Os estudos de docking molecular dos compostos foram realizados no programa GOLD V5.1 (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csddiscovery/components/gold/>) (COLE *et. al.*, 2005) em computador PC Windows. Inicialmente, os adutos foram desenhados no programa *Discovery Studio Visualizer* versão v19.1.0.18287 (BIOVIA, 2017), salvando-se os arquivos na extensão. mol2. Esses, por sua vez, tiveram suas energias minimizadas pelo programa de livre acesso MOPAC (versão 2016) utilizando-se o método semi-empírico PM7 (STEWART, 2013 e 2016) através da interface gráfica do *software* Mercury, que está incluído no pacote computacional CCDC GOLD. Os comandos usados durante a otimização foram: MMOK, XYZ, CHARGE = 0.

Como modelo para a validação do protocolo de docking molecular, inicialmente para o procedimento de *redocking*, foi utilizado a estrutura da AChE do *Aedes aegypti* (AgAChE) obtida por homologia estrutural a partir da AChE do *Anopheles gambiae* (AgAChE) (PDB: 6ARY) como template, a qual apresenta cerca de 80% de similaridade com a AgAChE, segundo dados de alinhamento do webservidor BLAST. Logo, as coordenadas referentes à caixa de busca foram introduzidas como: x: -59.65, y: 58.859 e z: 17.319 (sítio ativo), de acordo com a literatura. O centro de um raio de busca de 10 Å.

Ademais, os átomos aceptores e doadores de ligações de hidrogênio foram tratados como acessíveis ao solvente; os ligantes com ligações flexíveis e removida as moléculas de água, exceto aquelas que contribuem na interação entre o ligante e a enzima.

Em suma, avaliaram-se as quatro diferentes funções de pontuações: *Chemical Piecewise Linear Potential* (CHEMPLP), *GoldScore*, *Astex Statistical Potential* (ASP)

e *ChemScore*, selecionando-se aquela apresentou um valor de desvio de *Root-Mean-Square (RMSD)* $\leq 2,0$. Por fim, os mesmos parâmetros usados na avaliação de *redocking* foram empregados no estudo de docking rígido com os adutos, cujos resultados para cada ligante foram analisados usando o *software* gratuito Discovery Studio Visualizer (v19.1.0.18287) e Pymol (v0.99) para verificação das interações intermoleculares.

4.8.4. Análise de propriedades físico-químicas e relação estrutura-atividade dos adutos MBH.

As propriedades físico-químicas de adutos de MBH sintetizados foram previstas usando as regras de semelhança de pesticidas definidas por Hao *et al.* (2011), cujos descritores (Peso Molecular (MW), lipofilicidade (ClogP), número de aceptores e doadores de ligações hidrogênio (nALH e nDLH, respectivamente), número de ligações rotativas (nLROT), número de ligações aromáticas (nLAR)) foram avaliados através do plataforma web “Insecticide Physicochemical-properties Analysis Database (InsectiPAD)” (<http://chemyang.ccnuc.edu.cn/ccb/database/InsectiPAD/>), que abrange mais de 495 inseticidas aprovados e mais de 22.200 propriedades físico-químicas associadas (JIA *et al.*, 2019).

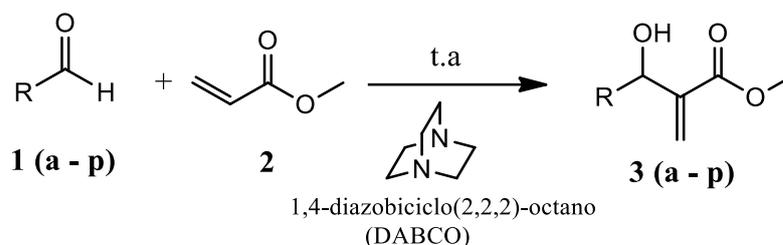
RESULTADOS E DISCUSSÕES

5. RESULTADOS E DICUSSÕES

5.1. Preparação dos adutos de Morita-Baylis-Hillman

De modo geral, entre os compostos sintetizados, obteve-se a maioria com rendimentos satisfatórios, conforme o esquema 5. Por meio desta metodologia, empregou-se 0,5 mmol de aldeído e cerca de 5,1 mmol de acceptor de Michael sob a influência de 0,5 mmol de DABCO como catalizador à temperatura ambiente.

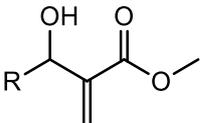
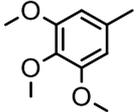
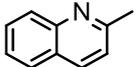
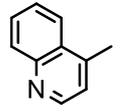
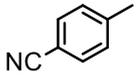
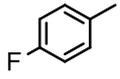
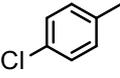
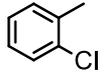
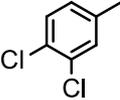
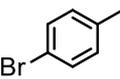
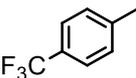
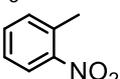
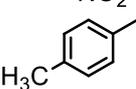
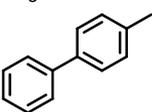
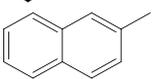
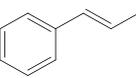
Esquema 5: Metodologia para a preparação dos adutos de MBH.



Fonte: Autor, 2022.

Nesse sentido, empregaram-se aldeídos aromáticos e acrilato de metila, para obtenção de adutos com variedade estrutural (tabela 1), e o tempo reacional variou em função da natureza do eletrófilo. Desta maneira, aldeídos aromáticos com grupos retiradores de elétrons, tais como grupo nitro e nitrila por exemplo, diminuem a energia do Orbital Molecular Desocupado (LUMO) da carbonila, tornando-a mais eletrofílica, o que favorece a adição aldólica, levando um menor tempo reacional e bons rendimentos.

Tabela 1: Resultados obtidos na síntese dos adutos de MBH.

Entrada	 3 (a - p) Aduto	Tempo reacional (horas)	Rendimento (%)
3a		96	35
3c		72	92
3d		72	95
3e		24	97
3f		36	99
3g		48	98
3h		12	98
3i		10	99
3j		50	95
3k		6	99
3l		3	99
3m		120	20
3n		60	70
3o		96	25
3p		40	85

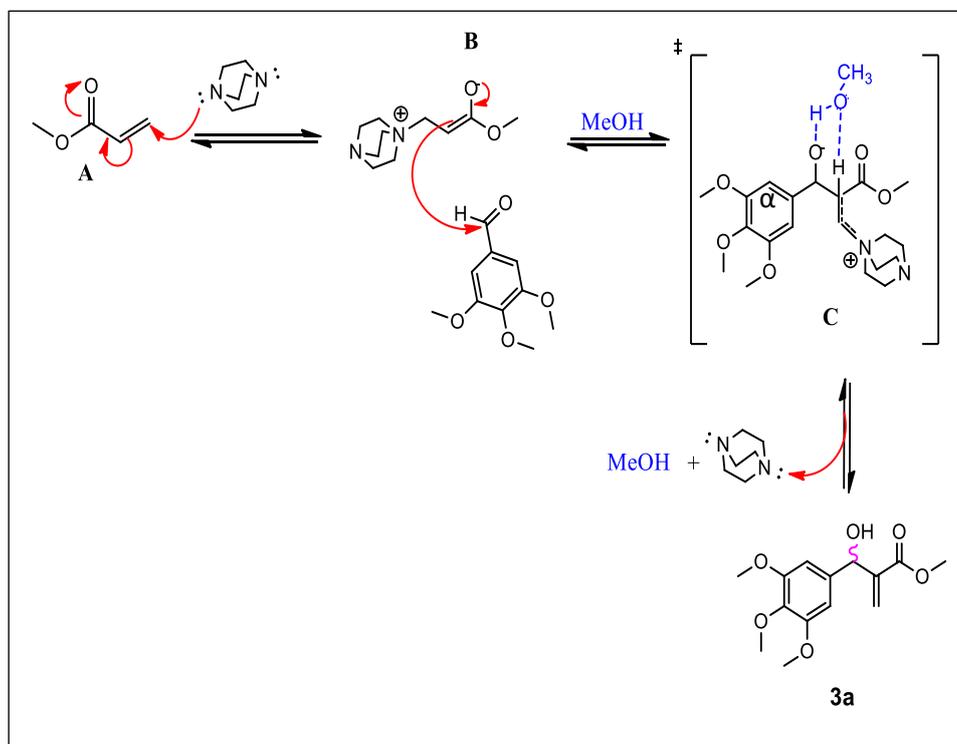
Fonte: Autor, 2022.

Por outro lado, grupos doadores de elétrons em aldeídos aromáticos prolongam o tempo de conversão dos adutos. Nesse sentido, transformações sintéticas

aceleradas por meio de ligações de hidrogênio têm encontrado grande aplicabilidade em diversas metodologias reacionais (ŘEZÁČ e HOBZA, 2016; ZHAO *et. al.*, 2016; AGGARWAL *et. al.*, 2002). Souza *et. al.* (2008) estudaram este parâmetro na reação de MBH, obtendo resultados satisfatórios em sistemas de mistura de água e solventes orgânicos (SOUZA *et. al.*, 2008). Nesse seguimento, foi aplicado tal metodologia na síntese de **3a**. Contudo, obteve-se um melhor resultado, em termos de tempo, apenas com a utilização de um solvente prótico, que neste caso foi metanol.

Outrossim, de acordo com estudos mecanísticos de Aggarwal (ver esquema 4), pode-se propor um mecanismo para a formação deste aduto, conforme esquema 6. Ressalta-se que tais estudos são corroborados por análises computacionais e experimentais conduzidos por Plata e Singleton (2015), segundo os quais o álcool promove transferência de próton da posição alfa, em C, para o alcóxido através de um sistema cíclico de seis membros. Em resumo, o mecanismo envolve uma sequência de adição de Michael (A), reação aldólica (B), a partir da qual gera-se um centro estereogênico, e eliminação.

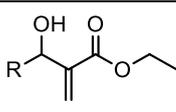
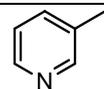
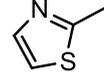
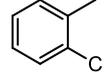
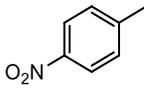
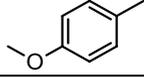
Esquema 6: proposto de mecanismo reacional para a formação do aduto.



Destaca-se que todas as demais reações foram conduzidas sem a utilização de solvente (SAIKIA e SARMA, 2010). Além de tudo, é importante ressaltar que os adutos **3m** e **3n** e **4q** a **4u** (tabela 2) foram disponibilizados pelo Grupo de Pesquisa do Professor Fernando Coelho da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Além do mais, em relação ao conceito verde e economia de átomos da reação de MBH, diversas pesquisas têm demonstrado a sua versatilidade sob condições livre de solvente (MACK e SHUMBA, 2007), com rendimentos satisfatórios, como pode ser constatado por meio dos resultados apresentados na tabela 1 e 2. Em suma, nessa circunstância pode-se inferir que o mecanismo proposto por McQuade possivelmente governa o andamento da reação, com a formação de um intermediário hemiacetal (ver esquema 4) (SAIKIA e SARMA, 2010).

Tabela 2: síntese dos adutos de MBH com acrilato de etila.

Código	 4 (p - t) Aduto	Tempo reacional (horas)	Rendimento (%)
4q		7	70
4r		0.5	90
4s		5	90
4t		4	96
4u		48	81

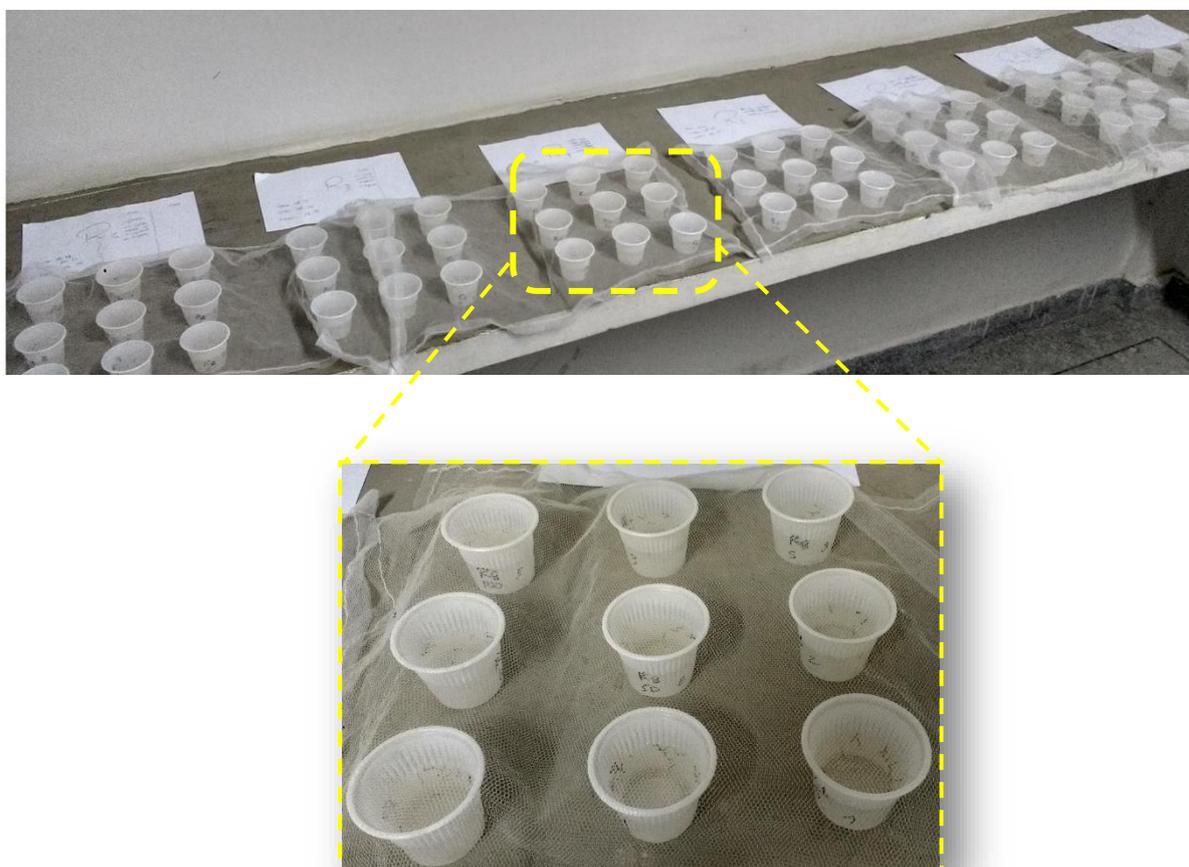
Fonte: Autor, 2022

5.2. Avaliação da atividade larvicida

De acordo com as orientações preconizadas pela OMS (2005), inicialmente foi realizado uma avaliação preliminar, com o propósito de se verificar a atividade

larvicida dos adutos de MBH frente a larvas no 4^o estágio (L4) de desenvolvimento biológico do vetor *Aedes aegypti* (figura 13).

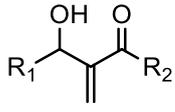
Figura 13: Realização de ensaio larvicida.



Fonte: Autor, 2022

Desta maneira, de acordo com a tabela 3 verifica-se que entre os adutos avaliados, quatro apresentam promissora ação larvicida, conforme classificação proposta por Cheng e colaboradores (2003), sendo o composto **3n** (com a unidade *p*-bifenila) o mais ativo entre eles. Ademais, verificou-se outros dois adutos como parcialmente larvicidas promissores: **3j** (com substituinte bromo na posição *para*) e **3p** (com o grupo cinamoil).

Tabela 3: Resultado do ensaio qualitativo de atividade larvica na concentração de 100 µg/mL.

 Aduto (R ₁)	Grupo alcóxido (R ₂)	Mortalidade (% ± SD) *		Grau de atividade
		24h	48h	
3a	OCH ₃	8,33 ± 0,60	16,67 ± 1,02	I
3b		10,00 ± 0,10	18,33 ± 0,78	I
3c		6,67 ± 0,58	15,00 ± 1,00	I
3d		8,33 ± 0,58	16,67 ± 1,53	I
3e		10,00 ± 0,00	18,33 ± 0,58	I
3f		8,33 ± 0,10	16,67 ± 0,15	I
3g		46,67 ± 2,08	81,67 ± 1,16	P
3h		16,67 ± 0,58	21,67 ± 0,58	I
3i		18,33 ± 1,53	26,27 ± 1,56	I
3j		25,00 ± 0,30	51,67 ± 0,90	PP
3k		16,67 ± 0,50	33,33 ± 0,45	I
3l		10,00 ± 0,13	25,00 ± 0,20	I
3m		6,67 ± 0,58	10,00 ± 0,00	I
3n		53,33 ± 2,08	93,33 ± 0,58	P
3o		68,33 ± 1,02	88,33 ± 0,75	P
3p		60,00 ± 0,98	71,67 ± 0,90	PP
4q	OCH ₂ CH ₃	6,67 ± 0,58	15,00 ± 0,58	I
4r		5,00 ± 0,00	10,00 ± 1,00	I
4s		40,00 ± 1,53	85,00 ± 1,73	P
4t		15,00 ± 1,00	16,67 ± 0,58	I
4u		18,33 ± 1,05	21,67 ± 0,95	I

*Média das três repetições com desvio padrão (média, ±; n = 3) DP, na concentração de 100 µg/mL;

Todas as médias apresentaram diferença significativa baixa (p <0,05).

I: inativo

PP: Parcialmente Promissor

P: Promissor

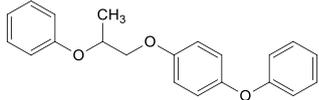
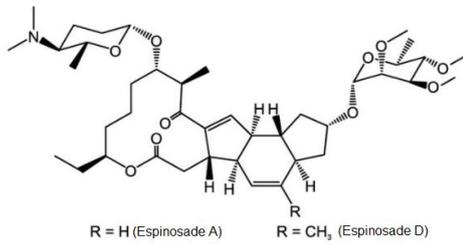
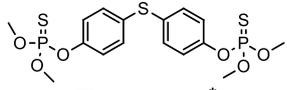
Fonte: Autor, 2022.

Logo, para as moléculas que apresentaram mortalidade acima de 25% realizaram-se testes quantitativos para a obtenção da Concentração Letal para 50% e 90% de uma população (CL₅₀ e CL₉₀), conforme apresentado na tabela 4. Ressalta-se que não se encontra descrito na literatura informações quanto à aplicabilidade e/ou avaliação larvica de adutos de MBH, o que torna inédito os resultados obtidos neste estudo.

Ademais, para fins comparativos calculou-se a CL₅₀ do inseticida natural espinosade, o qual leva a tremores, paralisia e, conseqüentemente, a morte de insetos pela ação neurotóxica excitatória nos receptores nicotínicos de acetilcolina

(SALGADO, 1998; GENG *et. al.*, 2013). Também foi avaliado a ação larvicida do inseticida sintético piriproxifeno, um homólogo do hormônio juvenil do inseto que atua na fase de pupa do vetor (GWALTNEY-BRANT, 2013).

Tabela 4: Avaliação quantitativa da atividade larvicida dos adutos de MBH frente às larvas do *Aedes aegypti* no 4º estágio após 48 hs.

Composto	Concentração (µg/mL) (95% IC)		χ^2
	CL ₅₀	LC ₉₀	
3g	88,17 (88,15 – 88,19)	120,30 (105,20 – 151,98)	1,94
3n	41,35 (35,39 – 48,12)	74,47 (64,42 – 109,39)	1,56
3o	77,74 (71,84 – 84,49)	110,05 (100,01 – 145, 15)	1,89
4s	86,65 (77,80 – 96,78)	118,27 (100,55 – 184,87)	8,82
 Piriproxifeno	1,75 (1,25 – 1,99)	3,58 (2,99 – 4,95)	0,25
 Espinosade	0,020 (0,010 – 1,03)	0,720 (0,52 – 1,22)	0,12
 Temefos*	4,25 (3,25 – 4,94)	7,39 (6,20 – 9,94)	0,22

IC - 95% Intervalo de Confiança; CL – Concentração Letal; χ^2 (Chi) – Grau de validação; * Controle positivo

Fonte: Autor, 2022.

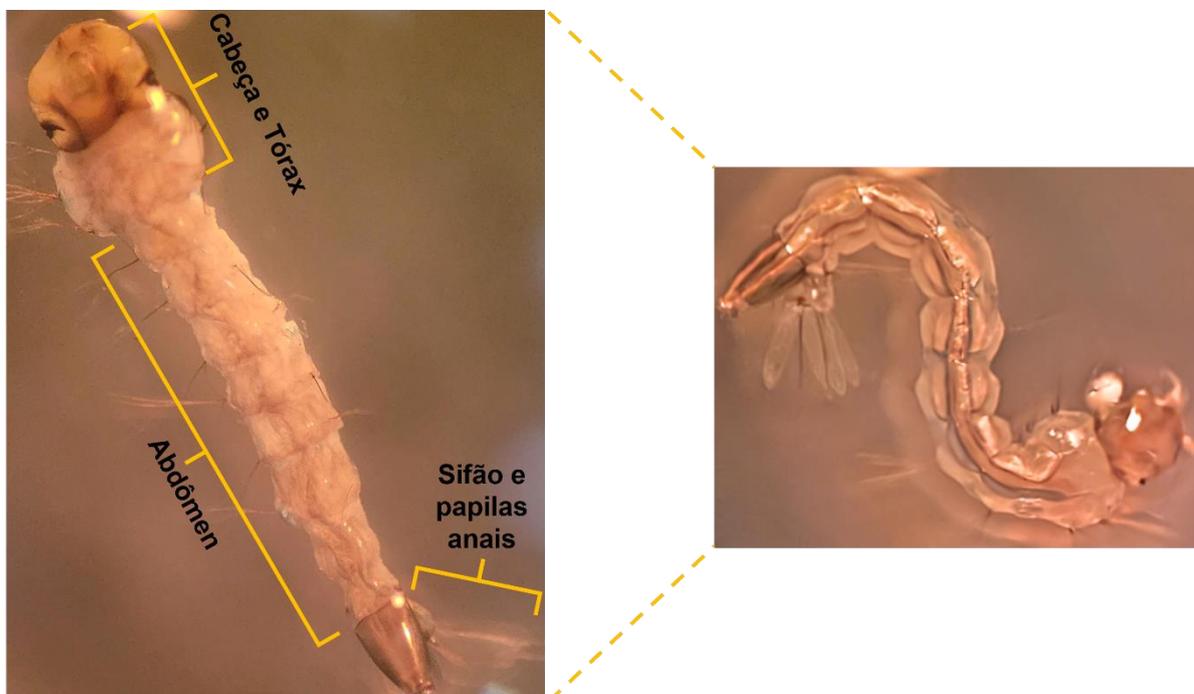
Ressalta-se um aumento no valor de CL₅₀ para o controle positivo (temefós) em relação ao valor reportado na literatura (CL₅₀ de 3,0 µg/mL), o que pode estar relacionado à metabolização acelerada deste composto pelas larvas do vetor, assim como mutação no alvo enzimático (GALEN *et. al.*, 2019). Por outro lado, este

composto ainda sim apresenta um maior efeito larvicida em comparação com os adutos promissores, entre os quais **3n** (com *p*-bifenila) é o mais ativo entre os compostos avaliados, com um menor valor de CL₅₀ (tabela 4). Em seguida, **3o**, com a unidade naftaleno (conhecido pela sua atividade larvicida (DUA *et. al.*, 2013; EVERTON *et. al.*, 2020)) apresentou uma ação moderadamente mais pronunciada que aqueles adutos clorados: **3g** (*p*-cloro) e **4s** (*o*-cloro).

5.3. Análise morfológica

A morfologia normal da larva do *Aedes aegypti* no seu 4^o estágio de desenvolvimento biológico exposta ao controle negativo (solução de DMSO) apresentava um aspecto morfológico comum, com as estruturas preservadas e desenvolvidas, tais como cabeça, tórax e região do abdômen (figura 14).

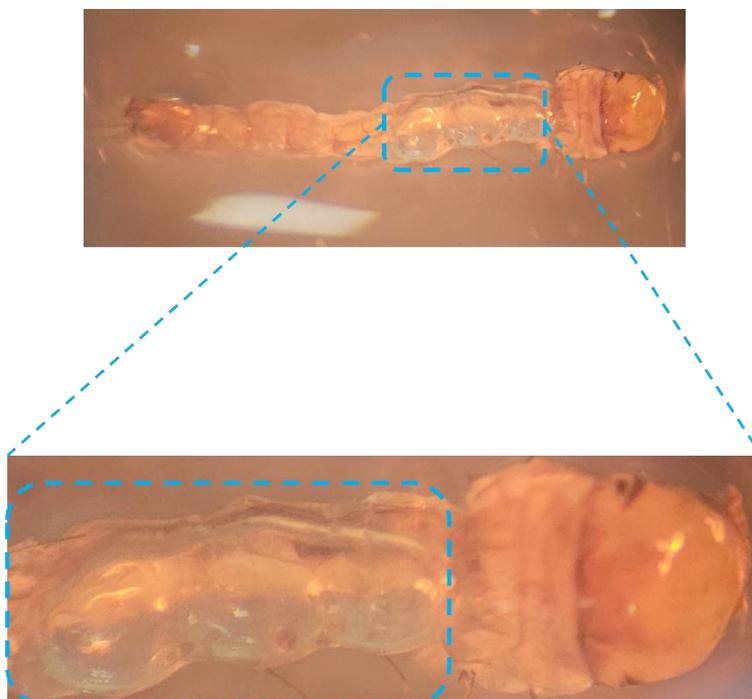
Figura 14: Larva do *Ae. aegypti* 4^o no estágio sob o controle negativo.



Fonte: Próprio autor, 2022.

Contudo, quando exposta à solução-teste com o composto **3n** verifica-se que a região do abdômen da larva sofre sérios danos (figura 15). Ressalta-se que nessa área encontra-se o intestino médio, cujas células epiteliais apresentam funções vitais, tais como controle de pH, secreção de enzimas digestivas, absorção de nutrientes, armazenamento de lipídios e carboidratos (CLEMETS,1992; WIGGLESWORTH, 1942; NISHIURA *et. al.*, 2007).

Figura 15: Larva do *Ae. aegypti* 4^o no estágio em solução de 100 ppm do composto **3n**.



Fonte: Autor, 2022.

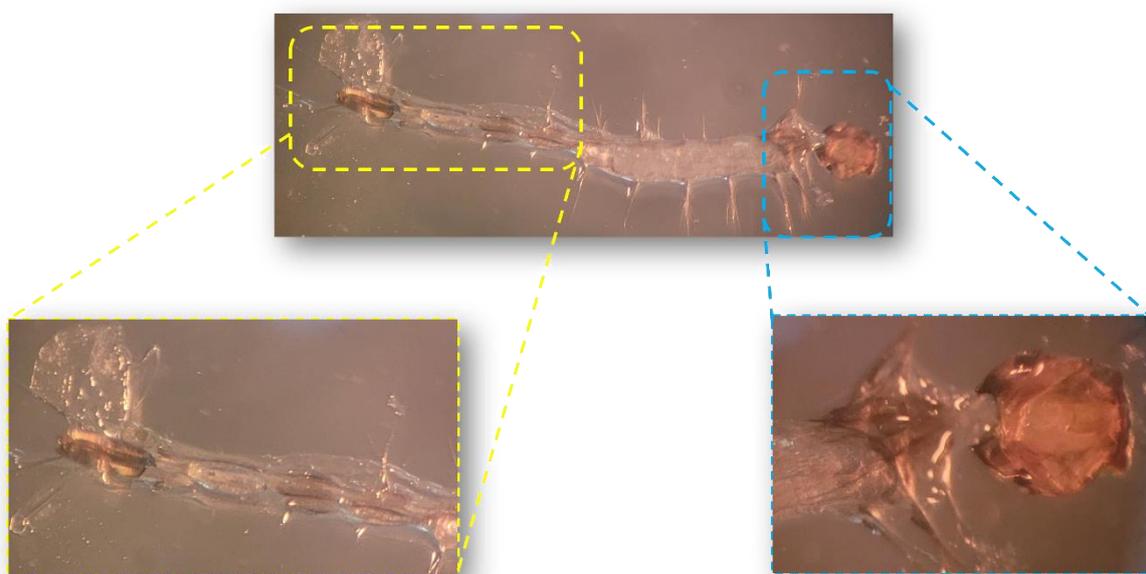
Ademais, é importante destacar que a larva deste vetor e os demais insetos possuem um mecanismo de defesa para proteção do sistema digestivo, conhecido como Membrana Peritrófica (MP) (WHITEN *et. al.*, 2018; SUWANMANEE *et. al.*, 2009) que o protege contra abrasão e ataques de patógenos oriundos de alimentos contaminados, envolvendo-os assim que estes adentram o trato gastrointestinal.

Baseado nas observações experimentais sugere-se que o composto **3n** possivelmente interfere na formação da MP. Desta forma, estando diretamente em

contato com o tecido epitelial, o aduto **3n** provavelmente leva a uma resposta degenerativa nas células do aparelho digestivo.

Tal pressuposto também estende-se à possível ação do composto **4s**, visto que foi observado deterioração no abdômen anterior e, além do mais, os tecidos internos do tórax apresentam nítida degeneração (figura 16), onde encontra-se órgão específicos responsáveis pela síntese da MP e regulação da passagem de alimento: células da cardia e seco gástrico (CLARK *et. al.*, 1999; LEÓDIDO *et. al.*, 2013; SHAO *et. al.*, 2001).

Figura 16: Visão ampliada das regiões degeneradas da larva do *Ae. aegypti* em solução de 100 ppm do aduto **4s**.



Fonte: Autor, 2022.

5.4. *In silico* Target Fishing: Predição de alvos moleculares

“Target fishing”, também conhecido como identificação de alvos moleculares, é uma técnica computacional emergente, principalmente devido à alta demanda em termos financeiro, tempo e meios experimentais. Esta técnica emprega ferramentas de bioinformática e algoritmos de *machine learning* na predição de alvos biológicos para uma dada molécula a partir de sua estrutura química, utilizando-se informações

disponíveis em banco de dados de moléculas biologicamente ativas frente a alvos conhecidos (JENKINS *et al.*, 2006; WANG e XIE, 2014).

Desta forma, realizou-se uma análise prospectiva de target fishing para a identificação de alvos moleculares potenciais baseados na estrutura dos compostos **3g**, **3n**, **3o** e **4s** por meio do webserver “Similarity ensemble approach (SEA)” (<https://sea.bkslab.org/>), o qual se baseia no princípio da similaridade química (KEISER *et al.*, 2007; SALVATORE *et al.*, 2021). Logo, o *pool* dos possíveis alvos em comum para estes adutos encontra-se descrito na tabela 5, abrangendo 14 putativos alvos moleculares. Além do mais, empregou-se análise de docking molecular (proteínas obtidas por homologia molecular) a fim de avaliar aquele alvo que apresenta uma maior energia de interação com o aduto **3n**.

Tabela 5: Previsão de possíveis alvos biológicos a partir da estrutura química dos adutos MBH.

Candidatos a alvo ^a	Descrição	Código
AAEL014199	Dihidropirimidina desidrogenase	DPD
Q16QD7	Hidrolases de epóxido	EH's
Q170R4	Proteína quinase dependente de cGMP	PKG
A0A6I8T5H3	Enzima conversora de angiotensina	ACE
A0A6R8GJR6	Metalo-endopeptidase de membrana (Neprilisina)	MME
A0A1S4F8B3	(s)-2-hidroxiácido oxidase	HAO2
Q6A2E2	Acetilcolinesterase	AChE
J9HT37	Fosfotransferase	PT
Q177Y4	Família de Proteínas de ligação a ácidos graxos	FABP
A0A1S4EXS1	Glutathiona S-transferases	GSTs
Q17CF0	Histona deacetilase	HDAC
A0A1S4FMW6	Catepsina B	CTSB
A0A0P6IWW9	Putative-lisosomal	PAP
Q17LB3	L-fuconato desidratase	FucD

^aNome de entrada UniProt

Fonte: Autor, 2022.

De acordo com os dados apresentados na tabela 5, observa-se uma maior afinidade com a dihidropirimidina desidrogenase, enzima limitante de velocidade da via catabólica da uracila na biossíntese de β -alanina (MORSMAN *et al.*, 2000; SPARREBOOM *et al.*, 2002). Richardson *et al.* (2010) demonstram importantes funções fisiológicas desta enzima na biologia de insetos, como no processo de

esclerotização da cutícula, o qual requer N- β -alanil dopamina (formada por β -alanina e dopamina). Ademais, atribui-se outras finalidades cruciais à β -alanina, tais como na síntese de carcinina (N- β -alanil histimina) que atua visão e, principalmente, na regulação da eclosão de pupas.

A inspeção visual das interações envolvidas nos complexos receptor-ligante revela a importância das interações hidrofóbicas (tabela 6). Contudo, tendo em vista mudanças conformacionais durante o processo de reconhecimento molecular, faz-se necessário estudos complementares de Dinâmica Molecular a fim de selecionar um melhor alvo biológico em função de uma estimativa da energia livre de interação proteína-ligante (RICHARDSON *et. al.*, 2010; IVETAC e MCCAMMON, 2011).

Tabela 6: Alvos potenciais dos adutos MBH frente ao *Ae. aegypti*.

Código	FitScore^a	Interações inter(intra)moleculares
DPD	86,51	P215 (CH -- π 2,39 Å), L244 (aquil-alquil 3,67 Å), T511 (OH -- O)
EH's	84,71	M35 (CH -- O 2,67 Å), E37 (CH -- O [2,99 Å] e OH -- O [1,99 Å]), H61 (CH -- π 3,87), E62 (CH -- O 2,85 Å, H65 (OH -- N 3,00) Å, HO -- Zn -- O=C 2,40 Å)
PKG	80,52	V524 (alquil – alquil 3,57 Å), R529 (NH – O=C 1,95 Å)
ACE	76,93	Q566 (NH-- O 2,58 Å), H600 (N -- HO 2,77 Å), E624 (O-- HO 2,11 Å), Y736 (OH -- OH 2,04 Å), OH -- Zn -- O=C 1,55 Å e 2,61 Å respectivamente, H ₂ O -- O 1,53 Å.
GSTs	75,36	H41 (OH -- N 2,03Å), H53 (C=O -- CH 2,89Å), R212 (C=O -- HN [2,02 Å], π -- cátion [3,55Å], π -- alquil 3,95Å)
MME	74,60	A566 (C=O-- HO 1,59 Å e CH -- O=C 2,68 Å), H610 (π - π stack 3,78 Å)
AChE	71,95	W212 (π – alquil 3,83 Å), S250 (LH 2,03 Å), Y456 (LH 2,32 Å)
HAO2	65,46	Y24 (CH -- OH 2,69 Å), P78 (CH ₃ -- O=C [2,6 Å] e alquil-alquil [3,84 Å]), T78 (CH -- O=C 2,44 Å), A79 (NH -- O=C 2,58 Å), R165 (HO -- NH 2,64 Å), R258 (HO-- NH 1,65 Å)
PT	59,86	K59 (HO -- NH 2,06 Å), L153 (NH -- π 3,33 Å), N203 (NH - π 2,75 Å), E259 (π -- CO ⁻ 3,18 Å)
FABP	55,58	H ₂ O -- C=O (2,10 Å) e H ₂ O -- OH (2,02 Å)
HDAC	46,09	S5 (OH -- O=C 2,86 Å), H4 (π -- HN 2,89 Å), K287 (C=O -- HN 1,92 Å)
CTSB	45,66	V263 (aquil-alquil 3,61 Å), L283 (CH ₃ -- O=C 2,51Å), (G284 (C=O -- HC 2,51 Å)
PAP	45,23	L201 (C=O -- CH 2,12 Å), D204 (CH -- CO ⁻ 2,07 Å), D282 (π -- CO ⁻ 3,72 Å), V283 (π – alquil 3,97 Å)
FucD	7,44	G32 (CH ₃ -- O=C 2,66 Å), L64 (π -- alquil 3,76 Å), E311 (π -- CO ⁻ [3,57 Å], OH -- CO ⁻ 1,73Å), Mg -- HO (1,91Å)

^aFunção CHEMPLP no Programa Gold.

5.5. Modelagem por Homologia Estrutural: construção do modelo da AaAChE

Durante o processo evolutivo, estruturas tridimensionais de proteínas homólogas são fortemente conservadas (CHANDONIA, 2005). Contudo, as suas superfícies apresentam certas divergências, regiões denominadas de “loop”, onde há algumas possíveis lacunas, apresentando, por isso, grande variabilidade estrutural (LEE, 2010).

Porém, ainda que a modelagem por homologia gere modelos relativamente menos exatos que os métodos experimentais, tais como cristalografia de raios-X ou espectroscopia de RMN, a homologia é de grande utilidade na biologia molecular a fim de propor e verificar possíveis hipóteses (LIU, 2011) e sítio de ligação de um certo ligante (ZHOU, 1999), entre outros.

Em vista disso, a técnica de homologia vem sendo muito utilizada em muitas áreas da Química Medicinal e Biologia Estrutural, especialmente em casos que a elucidação do alvo biológico ainda não se encontra experimentalmente resolvida (FRANÇA, 2015). Logo, modelos da biomacromolécula (proteína) podem ser construídos por comparação da similaridade de sequências de aminoácidos com as de proteínas homólogas com estruturas empiricamente determinadas, o que constitui em um processo de várias etapas.

Nesse contexto, e tendo em vista que grande parte dos atuais inseticidas comerciais atuam no sistema nervoso central, realizou-se a modelagem estrutural com a acetilcolinesterase (AChE) (LI *et. al.*, 2020). Logo, inicialmente a sequência completa de aminoácidos da AChE (*ace-1*) do *Aedes aegypti* (EF209048) (MORI *et. al.*, 2007) foi obtida na base de dados do UNIPROT (código: Q6A2E2) (<https://www.uniprot.org/>), realizando-se em seguida uma busca de sequência homóloga através do método heurístico do webserver BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (figura 17). Logo, observou-se que a AChE do *Anopheles gambiae* apresenta uma identidade sequencial de 80%, dentro da faixa aceitável (“threshold” de 30%) (VITKUP *et. al.*, 2001; D’ALFONSO, *et. al.*, 2001) sendo, portanto, esta selecionada para a construção do modelo da AaAChE.

Figura 17: Resultado da busca de sequência homóloga da AaAChE pelo webserver BLAST.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1182 bits(3059)	0.0	Compositional matrix adjust.	593/738(80%)	637/738(86%)	44/738(5%)
Query 1	MEIRGLITRLLGPCHI--RHLILCSLGIYSILV-----QSVHCRHHDIGSSTA---HQL-				49
Sbjct 1	MEIRGL L+G + R + L LG+ ++L+ V RHH++ + A HQL				57
Query 50	-----GSKYSQSSSLSSS-----SQSSSSLVEDPV----LNKDSDAFF				83
Sbjct 58	S+ +QS SL+S S SS ED V L+KD+DAFF				117

Fonte: Web software BLAST, 2022.

Desta maneira, uma vez obtido o alinhamento entre a sequência-alvo e a sequência-molde, realizou-se a construção do modelo da AgAChE por homologia estrutural através do webserver SWISS-MODEL (WATERHOUSE *et. al.*, 2018) (<https://swissmodel.expasy.org/>). Para tanto, foi selecionado como template da AgAChE resolvida por cristalografia de raios-X e depositada no PDB sob o código 6ARY (<https://www.rcsb.org/>), com resolução de 2.26 Å.

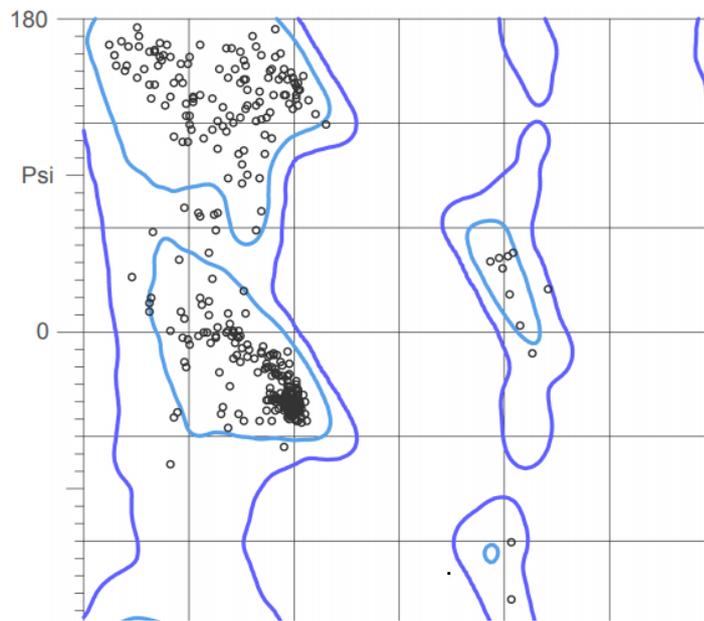
Ressalta-se que é possível que modelos por homologia apresentem maus contatos atômicos e enovelamentos inadequados, principalmente nos loops (SALI e BLUNDELL, 1993), sendo por isso necessária a sua otimização. Para tanto, realizou-se o refinamento do modelo pela plataforma do Laboratório de Bioinformática Zhang Lab da Michigan University, segundo a metodologia Fragment-Guided Molecular Dynamics Simulation (FD-MD) (<https://zhanglab.dcmf.med.umich.edu/FG-MD/>) (FAN e MARK, 2004).

Logo mais, um processo posterior de validação foi realizado para avaliar a qualidade estereoquímica do modelo gerado e certos parâmetros como ângulos torcionais da cadeia principal (ϕ e ψ), ângulos torcionais das cadeias laterais (Chi) e impedimentos estéricos. Para isto, foi utilizado o gráfico de Ramchandran gerado pelo Molprobit (<http://molprobit.biochem.duke.edu/>) (CHEN *et. al.*, 2010).

Além do mais, para que o modelo seja considerado aceitável, pelo menos 90% dos resíduos devem se encontrar em regiões permitidas neste gráfico, cuja restrição não se aplica a aminoácidos de glicina (pois não possuem cadeia lateral), prolina (uma

vez que o C α encontra-se ligado à cadeia lateral) e resíduos localizados nas extremidades (carboxi-terminal e amino-terminal) (LASKOWSKI *et. al.*, 1993). Desse modo, o modelo gerado da AaAChE apresenta todos os resíduos em regiões permitidas, conforme a figura 18 abaixo.

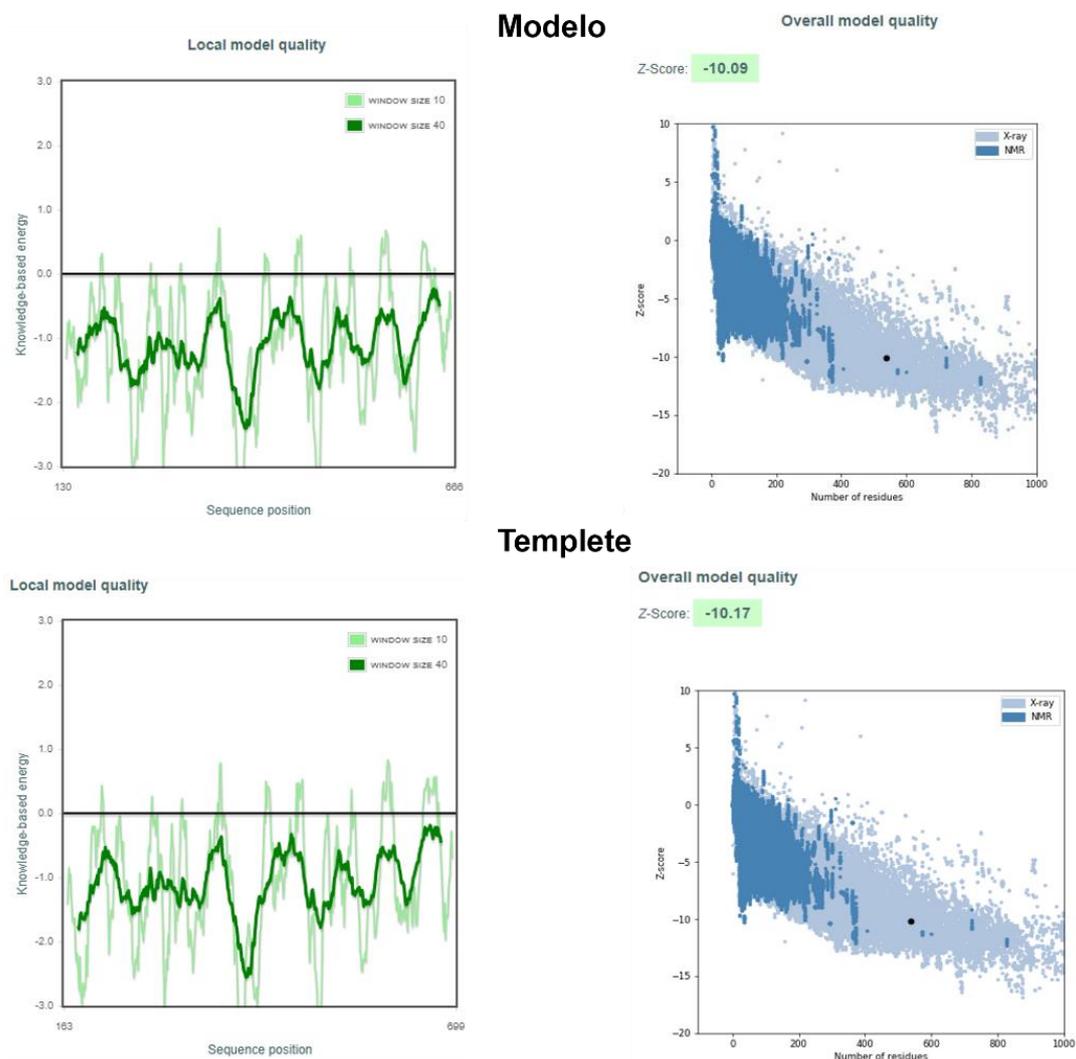
Figura 18: Gráfico de Ramachandran para a distribuição dos ângulos diedros Phi (φ) e Psi (Ψ) do modelo da AaAChE.



Fonte: Elaborado a partir do *web software* pelo Molprobit, 2022

Outras ferramentas foram utilizadas para avaliação da qualidade do modelo da enzima, como o ProSa-web (WIEDERSTEIN e SIPPL, 2007), que calcula qualidade geral (estrutura tridimensional da proteína), indicando através de um valor de Z-score, e local (posição dos resíduos de aminoácidos na sequência), em que valores positivos neste gráfico equivalem as possíveis regiões com erros estruturais. Logo, conforme a figura 19 a diferença de valor de Z-score entre o modelo e o template é de 0,08. Ressalta-se que quanto menor for esta diferença melhor é a qualidade do modelo, uma vez que este score representa as coordenadas atômicas dos C α da estrutura.

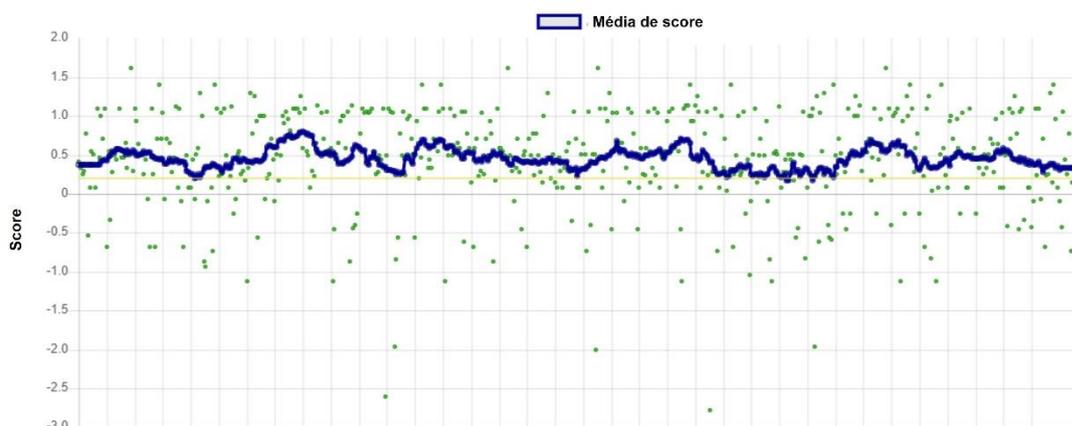
Figura 19: Verificação da qualidade do modelo da AaAChE pelo servidor ProSa-Web.



Fonte: Adaptado pelo autor gráficos gerados pelo web servidor ProSa-web, 2022.

Por fim, também se verificou o modelo pela ferramenta Verify 3D, a qual confere score em relação ao ambiente químico de cada resíduo no modelo com base em uma matriz de análise estatística envolvendo modelos experimentais depositados no PDB (EISENBERG *et. al.*, 1997). Logo, observa-se que 99,44% dos resíduos apresentam valor médio de score de $\geq 0,02$, o que se encontra dentro dos níveis aceitáveis (maior que zero) (figura 20).

Figura 20: Representação do perfil 3D do modelo AaAChE.



Fonte: Gráfico gerado pelo web servidor VERIFY3D. Adaptado pelo autor, 2022.

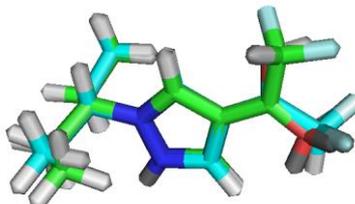
5.6. Docking molecular

A fim de analisar a energia de interação e conformação dos adutos mais promissores com a AaAChE, alvo biológico amplamente descrito na literatura no desenvolvimento de potenciais inseticidas, estudos de docking foram realizados por meio do programa GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking), o qual apresenta uma função de score baseada em campo de força, que considera a energia interna do ligante, assim como a energia de interação receptor-ligante (HALPERIN *et. al.*, 2002; BROOIJMANS e KUNTZ, 2003).

Inicialmente, a validação da eficiência dos cálculos de *docking* foi realizada a fim de verificar a acurácia do programa em reproduzir a conformação bioativa do ligante cristalográfico, processo denominado de *redocking*. Ressalta-se que a simulação do modo de interação empírico é considerada aceitável desde que o RMSD (Root Mean Square Deviation) (ou seja, entre o ligante em sua pose cristalográfica e sua conformação obtida logo após o *docking*) seja menor que 2.0 Å (BROOIJMANS e KUNTZ, 2003).

Para tanto, destaca-se que, a princípio, desenhou-se a estrutura molecular do ligante cristalográfico (nativo do complexo com PDB ID: 6ARY) no programa Discovery Studio, sendo otimizada com o método semi-empírico PM7 por meio do *software* MOPAC através da interface gráfica do programa Mercury. Logo, o menor valor de RMSD calculado foi de 0,196 para a função de pontuação ChemPLP (figura 21).

Figura 21: Validação do cálculo de *docking* do programa GOLD por meio do procedimento de *redocking*. Em azul celeste é representado a conformação bioativa do ligante cristalográfico em sobreposição com a pose gerada pelo *software*, ligante em verde.

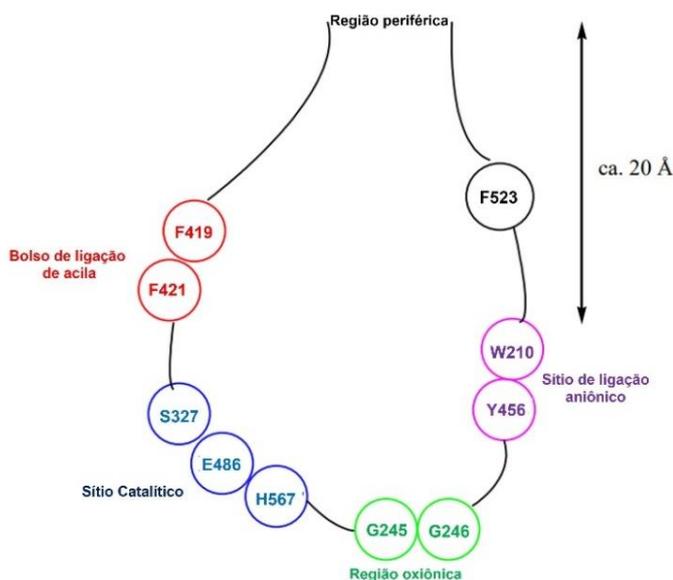


Fonte: Figura gerado pelo *software Pymol*, 2022.

Posteriormente, o inseticida de referência temefós, inibidor da AChE, foi ancorado no sítio de ligação desta enzima (AaAChE, modelo) aplicando-se o mesmo protocolo de otimização descrito anteriormente, sendo este procedimento também executado para os adutos **3n** e **4s**. Desta forma, obtiveram-se os valores de energias de interação ligante/receptor (tabela 7). Em vista disto, acredita-se que o mecanismo de ação dos adutos de MBH não se sucede pela via de inibição da AaAChE. Contudo, estudos experimentais, como determinação da atividade enzimática por meio do ensaio de Ellman e cálculo de inibição enzimática, faz-se necessário a fim de melhor compreender o meio de ação destes compostos.

O estudo de *docking* revelou interação hidrofóbica ocorrendo entre o grupo metila presente no temefós e no aduto **3g** e a H⁵⁶⁷ (2,1 Å e 2,81 Å, respectivamente), resíduo de aminoácido pertencente ao sítio catalítico da enzima (figura 22).

Figura 22: Representação esquemática das principais regiões de interação na AaAChE.



Fonte: Bacalhau et. al. (2016). Aptado pelo autor, 2022.

Além do mais, observa-se, de uma maneira geral, que os adutos apresentaram interações semelhantes com o sítio de ligação aniônico da AaAChE por meio de ligação de hidrogênio entre o resíduo Y⁴⁵⁶ e os adutos **3n** e **4s** (2,32 Å e 2,07 Å, respectivamente) e interação π – alquil (3,73 Å) com **3g**. O composto de referência, por sua vez, interage com este aminoácido através de interação π – sigma (2,67 Å) (tabela 7 e figura 23).

Tabela 7: Valores de *FitScore* e interações ligante/receptor entre os adutos, o composto de referência e a AaAChE.

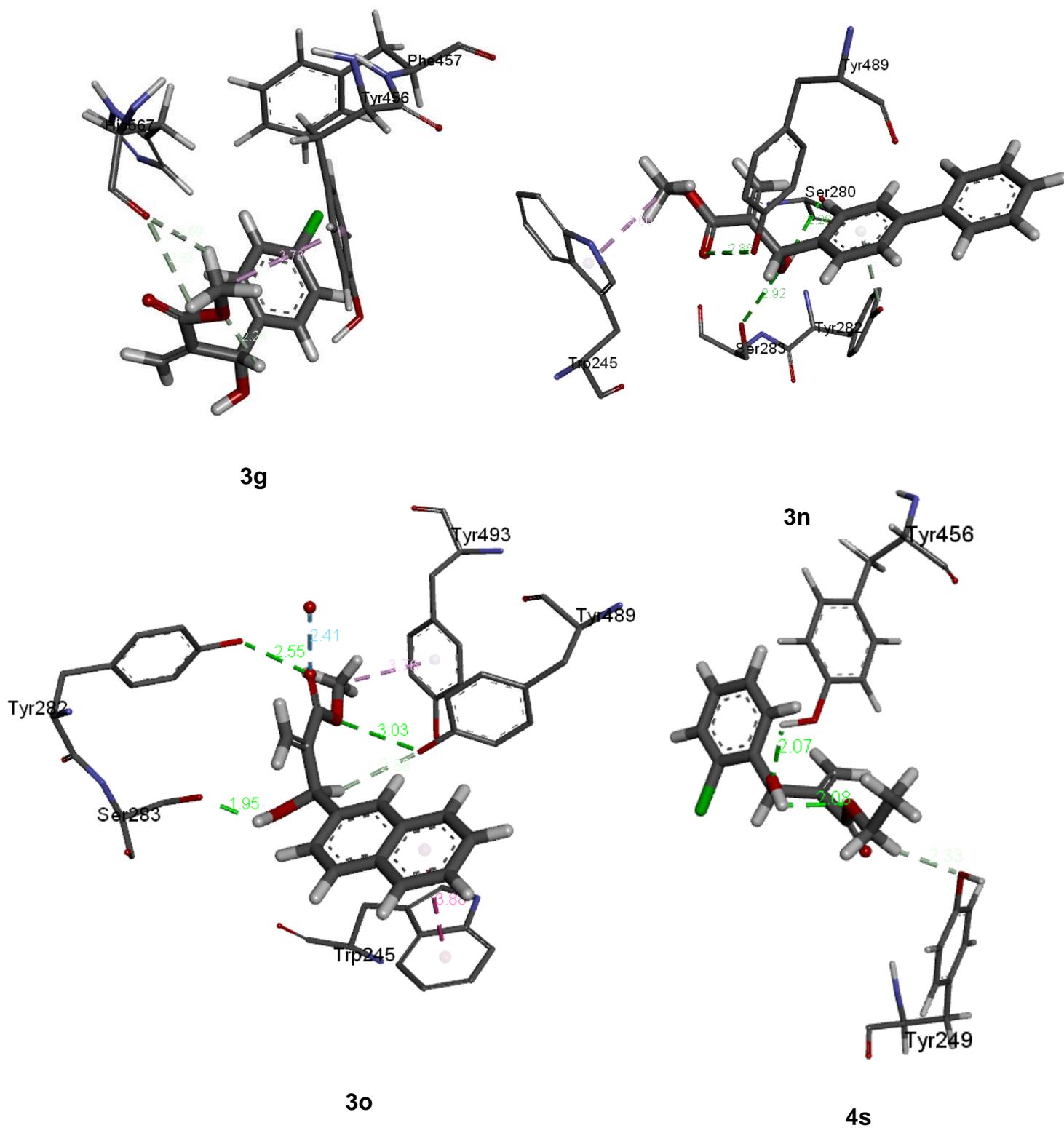
Composto	<i>FitScore</i>				Interações inter(intra)moleculares*
	Éster		Ácido		
	Enantiômeros				
	R	S	R	S	
Temefós	74,57				D200 (LH 2,91 Å e π -sigma 2,49), W212 (π -sigma, 2,84 Å), Y449 (Ligação de Hidrogênio (LH) 2,04 Å), W408 (π – enxofre 3,58 Å), Y456 (π - sigma 2,67 Å).
3g	50,77	59,70	47,45	49,15	Y456 (π -alquil 3,73 Å), H567 (LH não convencional 2,69 Å e 2,93 Å), Y456 (π – alquil 3,73 Å). LH não convencional intramolecular (2,24 Å).
3n	67,61	71,95	63,10	64,85	W245 (π – alquil 3,60 Å), S280 (LH 2,28 Å), Y282 (π – LH não convencional 3,18 Å), S283 (LH 2,92 Å), Y489 (LH 2,86 Å).
3o	59,63	63,53	58,94	63,23	W245 (π stack 3,86 Å), Y282 (LH 2,55 Å), Y283 (LH 1,95 Å), Y493 (π – alquil 3,76 Å), Y489 (LH 3,03 Å e LH não convencional 2,88 Å).
4s	55,65	53,83	49,89	51,32	Y249 (LH não convencional 2,33 Å), Y456 (LH 2,07 Å). LH intramolecular (2,08 Å).

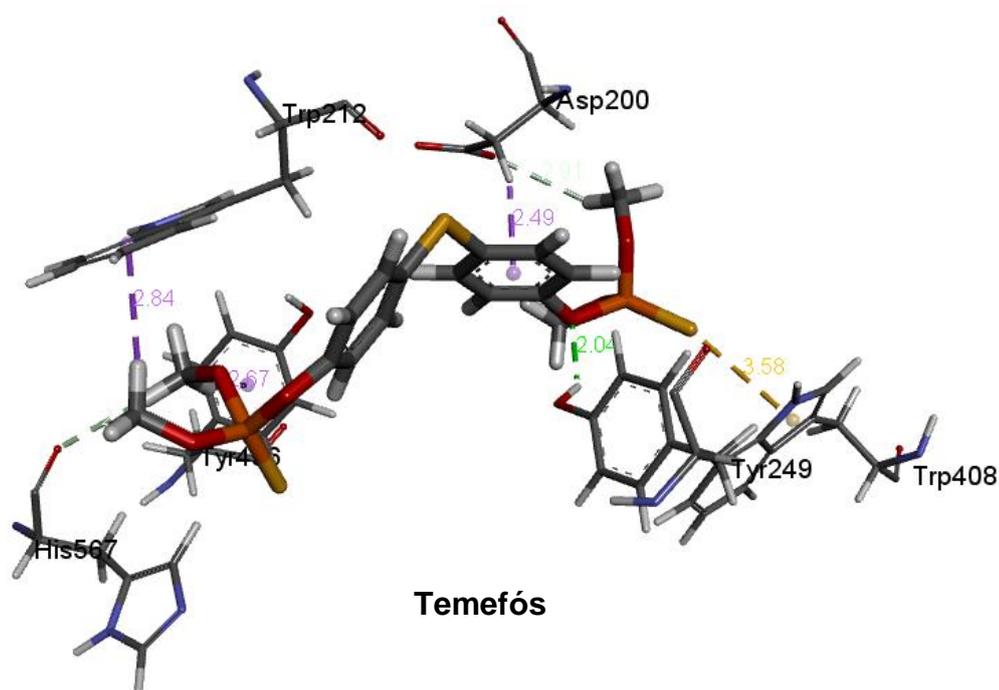
LH: Ligação de Hidrogênio.

*Interações com os adutos em sua forma enantiomérica S.

Fonte: Autor, 2022.

Figura 23: Visualização das interações do composto de referência (temefós) e os adutos **3g**, **3n**, **3o** e **4s** (enantiômeros S) com a AaAChE.





Fonte: Imagens elaboradas a partir do *software* Discovery Studio. Autor, 2022.

5.7. Avaliação *in silico* de propriedades físico-químicas: Relação Estrutura-Atividade

A descoberta de um inseticida seletivo e ambientalmente seguro depende da seleção de um candidato promissor durante o estágio inicial do desenvolvimento biorracional de pesticidas. Desta forma, estudos evidenciam uma relação intrínseca entre biodisponibilidade e suas propriedades físico-químicas, quais sejam: Massa Molecular (MM), Lipofilicidade (ou Logaritmo do Coeficiente de Partição –CLogP), número de Doadores e Aceptores de Ligação de Hidrogênio (nDLH, nALH), número de Ligações Rotacionáveis (nLRot) e número de Ligações Aromáticas (nLAr) (DAVID, 2017).

Ressalta-se que apesar de inseticidas e fármacos apresentarem ação frente a macromoléculas em sistemas biológicos, ambos apresentam características de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade significativamente diferentes. Nesse sentido, ao contrário de fármacos, faz-se necessário levar em

consideração fatores ambientais no desenvolvimento de inseticidas (vento, luz solar, chuva, entre outros), uma vez que estes são aplicados *outdoors* (HAO, G. et. al, 2011; SHIMSHONI, et. al., 2019).

Desta forma, entre os parâmetros físico-químicos mencionados destaca-se o nLAr, relacionado à fotoestabilidade e o CLogP que não apenas é correlacionado à difusão passiva através da bicamada lipídica da membrana celular, mas principalmente afeta a permeabilidade na cutícula lipofílica do inseto. Assim, comparando-se com a regra de Lipinski ($MM \leq 500$, $ClogP \leq 5$, $nALH \leq 10$, $nDLH \leq 5$), inseticidas devem apresentar um maior valor de CLogP e um menor valor de MM (HAO *et. al.*, 2011).

Portanto, a fim de avaliar possíveis candidatos a pesticidas, Hao et. al. (2011) propuseram a seguinte regra: $MM \leq 435$ Da, $ClogP \leq 6$, $nALH \leq 6$, $nDLH \leq 2$, $nROT \leq 9$, e $nLAR \leq 17$. Logo, avaliou-se o perfil inseticida dos adutos sintetizados por meio do servidor web gratuito InsectPAD (<http://chemyang.ccnu.edu.cn/ccb/database/InsectiPAD/index.php/home/index>) (JIA *et. al.*, 2019).

De acordo com a tabela 10, os adutos de MBH encontram-se dentro dos limites acima mencionados, exceto em relação ao espinosad que não se enquadra na faixa deste parâmetro, bem como no tocante à massa molecular (MM).

Tabela 8: Avaliação dos parâmetros físico-químicos dos adutos MBH.

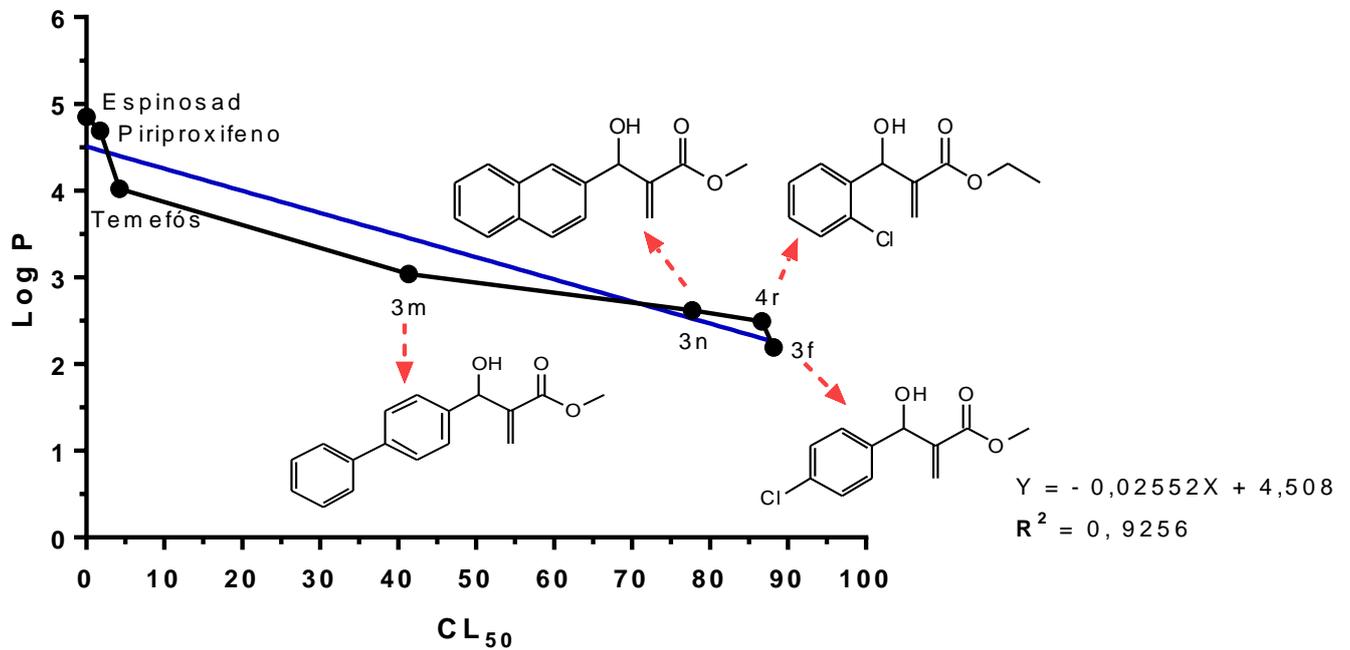
Composto	MM	ClogP	nDLH	nALH	nLRot	nLAR	
3a	282,29	1,62	1	6	7	6	
3b	252,26	1,66	1	5	6	6	
3c	243,26	1,90	1	4	4	10	
3d	243,26	1,89	1	4	4	10	
3e	217,22	1,02	1	4	4	6	
3f	210,20	1,98	1	4	4	6	
3g	226,66	2,19	1	3	4	6	
3h	226,66	2,18	1	3	4	6	
3i	261,10	2,72	1	3	4	6	
3j	271,11	2,54	1	3	4	6	
3k	260,21	2,50	1	6	5	6	
3l	237,61	0,90	1	5	5	6	
3m	206,24	2,00	1	3	4	6	
3n	268,31	3,04	1	3	5	12	
3o	242,27	2,62	1	3	4	10	
3p	218,25	2,57	1	3	5	6	
4q	207,23	1,17	1	4	5	6	
4r	213,25	1,24	1	4	5	5	
4s	240,68	2,49	1	3	5	6	
4t	251,24	1,24	1	5	6	6	
4u	236,26	2,00	1	3	4	6	
Piriproxifeno	320,38	4,69	0	3	7	18	
EspinosaD	A	731,46	4,90	0	11	9	0
	D	745,48	4,80	0	11	9	0
Temefós	466,47	4,02	0	6	10	12	

MM: Massa Molecular; **CLog P:** Coeficiente de Partição; **nDLH** e **nALH:** número de Doadores e Receptores de Ligação de Hidrogênio, respectivamente; **nLRot:** número de Ligações Rotacionáveis; **nLAR:** número de ligações aromáticas.

Fonte: Autor, 2022.

Contudo, observa-se uma intrigante relação linear entre o CLog P e a ação larvívica dos adutos promissores e os controles com seus respectivos valores de CL₅₀ (gráfico 1). Logo, infere-se que a lipofilicidade é o parâmetro físico-químico de grande relevância na atividade biológica dos compostos avaliados frente às larvas do *Aedes aegypti*, tendo em vista que para formação do complexo ligante-receptor no sítio de ação, inicialmente faz-se necessário a difusão do composto através da cutícula do inseto, que é composta de quitina. Por isso, ele deve apresentar um equilíbrio entre hidrofiliabilidade e lipofilicidade (WEBB e GREEN, 1945; WATERBEEMD, 1993; TESTA, 2000).

Gráfico 1: Avaliação estrutura – atividade pela relação linear entre lipofilicidade e ação larvica dos compostos MBH.



Fonte: Autor, 2022.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia aplicada para a síntese dos compostos apresentados neste trabalho forneceu adutos em rendimentos globais satisfatórios, exceto o composto **3a**, que de certa forma já se esperava devido à natureza do reagente limitante (3,4,5-trimetoxibenzaldeído).

Por meio dos bioensaios larvicidas, constatou-se a efetividade dos adutos de MBH frente às larvas L4 do vetor *Aedes aegypti*, destacando-se **3n**. Este e os demais adutos, por sua vez, ocasionaram escurecimento na região do abdômen do inseto, o que evidenciou uma resposta degenerativa em seu tecido epitelial, o que levanta a hipótese de provável destruição do natural mecanismo de defesa do vetor através da Membra Peritrófica.

Ademais, em relação aos estudos *in silico*, ressalta-se que construção do modelo da AaAChE por homologia estrutural foi realizado com sequência homóloga de uma estrutura resolvida por difração de raio X depositadas no PDB (AgAChE, PDB ID:6ARY). Logo, após o processo de refinamento e validação, os estudos de *docking* molecular com a AaAChE possibilitaram uma compreensão da importância da natureza das interações não-covalentes para formação de um complexo relativamente estável enzima-ligante.

Em suma, com base nos resultados de *docking* molecular, pode-se inferir que os adutos de MBH não agem pela via de inibição deste alvo biológico.

PERSPECTIVAS

7. PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar simulação de Dinâmica Molecular a fim de estimar o possível alvo molecular baseado na menor energia livre de interação ligante-proteína (ΔG);
- ✓ Avaliar a influência do aceptor de Michael na ação larvicida, realizando-se reação de redução, caracterização e posterior teste biológico;
- ✓ Avaliar o impacto ecotoxicológico dos adutos de Morita-Baylis-Hillman.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. G.; JACOBS-LORENA, M. Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 667–671, jul. 2004.

AFT, R. L.; MUELLER, G. C. Hemin-mediated oxidative degradation of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 1, p. 301–305, 10 jan. 1984.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manifestações envolvendo a aplicação da vacina contra a dengue, 2017. Disponível em: <<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/111522/3613595/Tema+de+Destaque++Novembro+Dezembro+2017/c64fc913-6b39-4e06-92d9-a485e1af174d?version=1.2>>. Acesso em: 25 jul. 2021.

AGGARWAL, V. K. et al. Rate Acceleration of the Baylis–Hillman Reaction in Polar Solvents (Water and Formamide). Dominant Role of Hydrogen Bonding, Not Hydrophobic Effects, Is Implicated. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 2, p. 510–514, 27 dez. 2001.

AGGARWAL, V. K.; EMME, I.; FULFORD, S. Y. Correlation between pKa and Reactivity of Quinuclidine-Based Catalysts in the Baylis–Hillman Reaction: Discovery of Quinuclidine as Optimum Catalyst Leading to Substantial Enhancement of Scope. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 692–700, 4 jan. 2003.

AGGARWAL, V. K.; FULFORD, S. Y.; LLOYD-JONES, G. C. Reevaluation of the Mechanism of the Baylis–Hillman Reaction: Implications for Asymmetric Catalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 11, p. 1706–1708, 4 mar. 2005.

AGRAWAL, S.; et. al. Two essential peritrophic matrix proteins mediate matrix barrier functions in the insect midgut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.49, p. 24-34, 2014.

ALOUT, H.; WEILL, M. Amino-acid substitutions in acetylcholinesterase 1 involved in insecticide resistance in mosquitoes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, n. 1-3, p. 138–141, set. 2008.

ALONSO-PALOMARES, L.A., et. al. Molecular Basis for Arbovirus Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Intervirology**, v.61, n.6, p. 255-264, 2018.

AMARANTE, G. W. et al. Dualistic Nature of the Mechanism of the Morita–Baylis–Hillman Reaction Probed by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 8, p. 3031–3037, 13 mar. 2009.

ANDRÉ, et. al. Mosquito Adaptation to the Extreme Habitats of Urban Construction Sites, **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 8, p. 607-614, 2019.

ANGLERÓ-RODRÍGUEZ, Y. I. et al. An *Aedes aegypti*-associated fungus increases susceptibility to dengue virus by modulating gut trypsin activity. **eLife**, v. 6, p. e28844, 5 dez. 2017.

APTE-DESHPANDE, A.D., et. al. *Serratia odorifera* mediated enhancement in susceptibility of *Aedes aegypti* for chikungunya virus. **Indian J Med Res**, v.139, n. 5, p. 762-8, 2014.

BARRES, B.; et. al. Trends and Challenges in Pesticide Resistance Detection. **Trends Plant Sci**, 2016, v. 21, n. 10, p.834–853.

BASAVAIHAH, D.; RAO, A. J.; SATYANARAYANA, T. Recent Advances in the Baylis–Hillman Reaction and Applications. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 3, p. 811–892, mar. 2003.

BASAVAIHAH, D.; REDDY, B.S.; BADSARA, S.S. Recent contributions from the Baylis-Hillman reaction to organic chemistry. **Chem Rev**, 2010, v.110, n. 9, p. 5447-674

BAYLIS, A.B.; HILLMAN, M.E.D.; **German Patent** 2155113, 1972.

BECKER, N. et al. **Mosquitoes and Their Control**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010.

Boletim Epidemiológico Vol. 52 - Nº 23 — Português (Brasil) (BE-23). Disponível em: <https://www.gov.br/saude/ptbr/centraisdeconteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2021/boletim_epidemiologico_svs_23.pdf/view>. Acesso em: 04 jul. 2021.

Boletim Epidemiológico Vol. 52 - Nº3 — Português (Brasil). Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2021/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf/view>. Acesso em: 05 jul. 2021.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde**, 2007, v. 16, n. 4, p. 279-293.

BRADLEY, T. J. Physiology of osmoregulation in mosquitoes. **Ann. Rev. Entomol**, 1987, v. 32, p.439-462.

BRADLEY, T. J.; STUART, A. M.; SATIR, P. The ultrastructure of the larval Malpighian tubules of a saline-water mosquito. **Tissue Cell**, 1982, v. 14, n. 4, p.759-773.

BRADLEY, T. J.; PHILLIPS, J. E. The secretion of hyperosmotic fluid by the rectum of a saline-water mosquito larva *Aedes taeniorhynchus*. **J Exp. Biol**, 1975, v.63, n. 2, p.331-342.

BRADLEY, T. J.; PHILLIPS, J. E. The effect of external salinity on drinking rate and rectal secretion in the larvae of the saline-water mosquito *Aedes taeniorhynchus*. **J. Exp. Biol**, 1977, v. 66, n. 1, p. 97-110.

BRASIL. Manual sobre Medidas de Proteção à Saúde dos Agentes de Combate às Endemias - Volume 1 - Arboviroses transmitidas pelo *Aedes aegypti* — Português, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoessvs/dengue/manual_protecao_agentes_endemias.pdf/view>. Acesso em: 12 mar. 2022.

BHATT, S., et. al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, 2013, v. 25, n. 496, p. 504-7.

BRATHWAITE DICK, O. et al. The History of Dengue Outbreaks in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 584–593, 3 out. 2012.

BROWN, M.R.; RAIKHEL, A.S.; LEA, A.O. Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. **Tissue Cell**, 1985, v. 17, n. 5, p. 709-711.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I.D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**. 2003, v. 32, p. 335-73.

CARRIER, P.R. et. al. Towards a species-selective acetylcholinesterase inhibitor to control the mosquito vector of malaria, *Anopheles gambiae*. **Chem Biol Interact**, 2008, v. 175, n. 1-3, p. 368-75.

CAREY, D.E. Chikungunya, and dengue: a case of mistaken identity? **Journal Hist Med Allied Sci**, 1971, v. 3, n. 26.

CHEUNG, J. et al. Structure of the G119S Mutant Acetylcholinesterase of the Malaria Vector *Anopheles gambiae* Reveals Basis of Insecticide Resistance. **Structure**, v. 26, n. 1, p. 130-136.e2, 2 jan. 2018.

CHOUIN-CARNEIRO, T. et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004543, 3 mar. 2016.

CARRASCO-SANCHEZ, V.; SIMIRGIOTIS, M.; SANTOS, L. The Morita-Baylis-Hillman Reaction: Insights into Asymmetry and Reaction Mechanisms by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 14, n. 10, p. 3989–4021, 12 out. 2009.

CARRINGTON, L. B. et al. Reduction of *Aedes aegypti* Vector Competence for Dengue Virus under Large Temperature Fluctuations. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 4, p. 689–697, 3 abr. 2013.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). Chikungunya vírus, 2020. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>>. Acesso em: jul. 2021.

CLARK, T.M.; KOCH, A.; MOFFETT, D.F. The anterior and posterior 'stomach' regions of larval *Aedes aegypti* midgut: regional specialization of ion transport and stimulation by 5-hydroxytryptamine. **J Exp Biol**, 1999, v. 203, n. 3, p. 247-52.

CLARK, J. M. Effects and mechanisms of action of pyrethrin and pyrethroid insecticides. In: **Handbook of Neurotoxicology**. New York: Humana Press p. 511–546, 1995. ISBN 978-0-89603-795-3.

CLEMENTS, A.N. **The Biology of Mosquitoes**. In: Development, Nutrition and Reproduction. Vol. 1. London: Chapman & Hall, 1992.

Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates - 1st Edition. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/books/clinical-and-experimental-toxicology-of-organophosphates-and-carbamates/ballantyne/978-0-7506-0271-6>>. Acesso em: 12 mar. 2022.

COLE, J. C. C., NISSINK, W. M., J., TAYLOR, R. Protein,- Ligand Docking Virtual Screening with GOLD. **Drug Discovery Series**, 379–415, 2005.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. **Editora FIOCRUZ**, 1994.

COPELAND, R. A.; HARPEL, M. R.; TUMMINO, P. J. Targeting enzyme inhibitors in drug discovery. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 11, n. 7, p. 967–978, jul. 2007.

COELHO, F.; et. al. Ultrasound in Baylis–Hillman reactions with aliphatic and aromatic aldehydes: scope and limitations. **Tetrahedron**, 2002, v. 58, n. 37, p. 7437–7447.

CHANDONIA, J.-M.; BRENNER, S. E. Implications of structural genomics target selection strategies: Pfam5000, whole genome, and random approaches. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 58, n. 1, p. 166–179, 1 nov. 2004.

CHENG, S. S.; et. al. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**, 2003, v.89, n. 1, p. 99-102.

CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12–21, 21 dez. 2009.

D'ALFONSO, G.; TRAMONTANO, A.; LAHM, A. Structural Conservation in Single-Domain Proteins: Implications for Homology Modeling. **Journal of Structural Biology**, v. 134, n. 2-3, p. 246–256, maio 2001.

Dengue vaccine: WHO position paper, September 2018 – Recommendations. **Vaccine**, nov. 2018.

DA SILVEIRA, L. T. C.; TURA, B.; SANTOS, M. Systematic review of dengue vaccine efficacy. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, 28 ago. 2019.

Dassault Systèmes BIOVIA. Discovery Studio Modeling Environment, 2017. Dassault Systèmes; San Diego, CA, USA: 2017.

DAVID, M. D. Insecticide ADME for support of early-phase discovery: combining classical and modern techniques. **Pest Management Science**, v. 73, n. 4, p. 692–699, 19 ago. 2016.

DINIZ, M. M. C. DE S. L. et al. Resistência de *Aedes aegypti* ao temefós e desvantagens adaptativas. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, p. 775–782, 1 out. 2014.

Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue - Brasília/ DF • 2009 — Português (Brasil). Disponível em: <https://www.gov.br/saude/ptbr/centraisdeconteudo/publicacoes/publicacoessvs/dengue/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf/view>. Acesso em: 28 jul. 2021.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 0, 2017.

DREWES, S. E.; EMSLIE, N. D. Necic acid synthons. Part 1. Total synthesis of integerrineic acid. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 0, p. 2079–2083, 1 jan. 1982.

D'SILVA, N. M.; O'DONNELL, M. J. The gastric caecum of larval *Aedes aegypti* : stimulation of epithelial ion transport by 5-hydroxytryptamine and cAMP. **The Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 4, p. jeb172866, 7 dez. 2017.

DUA, V. K. et al. Insecticidal and genotoxic activity of *Psoralea corylifolia* Linn. (Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, 4 fev. 2013.

DUBRULLE, M. et al. Chikungunya Virus and *Aedes* Mosquitoes: Saliva Is Infectious as soon as Two Days after Oral Infection. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. e5895, 12 jun. 2009.

ENGDAHL, C. et al. Acetylcholinesterases from the Disease Vectors *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*: Functional Characterization and Comparisons with Vertebrate Orthologues. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0138598, 8 out. 2015.

ENGDAHL, C. et al. Discovery of Selective Inhibitors Targeting Acetylcholinesterase 1 from Disease-Transmitting Mosquitoes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 9409–9421, 7 out. 2016.

EVANS, H. C.; ELLIOT, S. L.; BARRETO, R. W. Entomopathogenic fungi and their potential for the management of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Americas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 3, p. 206–214, mar. 2018.

EVERTON, G. O. et al. Larvicidal activity opposite *Aedes aegypti* of the essential oil of the dry leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae). **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e5529119967–e5529119967, 26 nov. 2020.

EISENBERG D, LÜTHY R, BOWIE JU. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods Enzymol**, 1997, v. 277, p.396-404.

FAN, H.; MARK, A. E. Refinement of homology-based protein structures by molecular dynamics simulation techniques. **Protein science**, 2004, v.13, n.1, p.211–220.

FARIA, Á. B. DE C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais A review of some insecticide groups used in forest pest integrated management. **AMBIÊNCIA**, v. 5, n. 2, p. 345–358, 14 nov. 2009.

FONGNIKIN, A., et al. Efficacy of Fludora® Fusion (a mixture of deltamethrin and clothianidin) for indoor residual spraying against pyrethroid-resistant malaria vectors: laboratory and experimental hut evaluation. **Parasites Vectors**, 2020, v. 13, n. 1, p. 1-11.

FONSECA, E. O. L. 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. Serv. Saude, Brasília**, 2019, v.28, n.1.

FONTENILLE, D.; POWELL, J.R. From Anonymous to Public Enemy: How Does a Mosquito Become a Feared Arbovirus Vector? **Pathogens**, 2020, v.9, n. 4.

FRANÇA, S.B.; et. al. Larvicidal activity and in silico studies of cinnamic acid derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2021, v. 44.

FRANÇA, T.C. Homology modeling: an important tool for the drug discovery. **J Biomol Struct Dyn**, 2015, v. 33, n. 8, p. 1780-93.

GALATI, S. et al. Recent Advances in In Silico Target Fishing. **Molecules**, v. 26, n. 17, p. 5124, 24 ago. 2021.

GALEN, J. et. al. Overcoming insecticide resistance through computational inhibitor design. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2019, v. 116, n. 42, p. 21012-21021.

GENG, C.; WATSON, G. B.; SPARKS, T. C. Nicotinic Acetylcholine Receptors as Spinosyn Targets for Insect Pest Management. **Advances in Insect Physiology**, p. 101–210, 2013.

GLENN, J. D.; KING, J. G.; HILLYER, J. F. Structural mechanics of the mosquito heart and its function in bidirectional hemolymph transport. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 4, p. 541–550, 29 jan. 2010.

GOULSON, D. Call to restrict neonicotinoids. **Science**, 2018, v 60, n. 6392, p. 973.

GOLDBERG, L.J.; MARGALIT J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergei unguilata*, *Culex univittata*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquito News (USA)**, 1977, v. 37, n. 3, p.355-358.

GREAVES, A. K.; LETCHER, R. J. A review of organophosphate esters in the environment from biological effects to distribution and fate. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 2017, v. 98, n. 1, p. 2–7.

GUBLER, D. J., Vasilakis, N., & Musso, D. History and Emergence of Zika Virus. **The Journal of infectious diseases**, 2017, v. 216, n. 10, p. S860–S867.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin Microbiol Rev.**, 1998, v. 3, n. 11, p. 480-96.

GWALTNEY-BRANT, S. M. Atypical Topical Spot-On Products. **Small Animal Toxicology**, p. 741–754, 2013.

HALPERIN, I. et. al. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. **Proteins**. 2002, v. 47, n. 4, p., 409-43.

HAO, G., DONG, Q., YANG, G. A Comparative Study on the Constitutive Properties of Marketed Pesticides. **Mol Inform.** 2011 Jun;30(6-7):614-22. doi: 10.1002/minf.201100020.

HEGEDUS, D.; et. al. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annu Rev Entomol**, 2009, v. 54.

HILL, J. S.; ISAACS, N. S. **Tetrahedron Lett**, 1986.

HILL, J. S.; ISAACS, N. S. **J. Phys. Org. Chem**, p. 285-288, 1990. c) KAPOOR, Y.;

HORIKOSHI, R.; TOMIZAWA, M Trend in Development of Nicotinic Insecticides, In: **Trend in Pesticide Discovery Research-Development of Safer and Environmentally Friendly Pesticides**, 2018.

HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R. (2002). The druggable genome. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2002, v. 1, n. 19, p. 727–730.

HONÓRIO, N. A. et. al. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, 2015, v. 31, n. 5, p. 906.

IHARA, M. MATSUDA, K. Neonicotinoids: molecular mechanisms of action, insights into resistance and impact on pollinators. **Curr Opin Insect Sci**, 2018, v. 30, p. 86-92.

IVETAC, A., MCCAMMON J., A. Molecular recognition in the case of flexible targets, 2011, **Curr Pharm Des** 17:1663–1671.

IWAMURA, T., GUZMAN-HOLST, A.; MURRAY, K.A. Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. **Nat Commun**, 2020, v.11, n. 2130.

JIA, C.-Y. et al. InsectiPAD: A Web Tool Dedicated to Exploring Physicochemical Properties and Evaluating Insecticide-Likeness of Small Molecules. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, n. 2, p. 630–635, 8 jan. 2019.

JENKINS, L. J., BENDER, A., DAVIES, J. W. In silico target fishing: Predicting biological targets from chemical structure, Drug Discovery Today: **Technologies**, 2006, vol 3, Issue 4, p. 413-421.

KEISER, M. J. et al. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 197–206, fev. 2007.

KOBINGER, G., RACINE, T. ZIKA VIRUS. **Methods and Protocols**. Canada, Quebec. Springer, 2020, ISSN 1940-6029.

KRAEMER, M.U.G., et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Nat Microbiol**, 2019, v. 4, p. 854–863.

KUFAREVA, I.; ABAGYAN, R. (2012). Methods of protein structure comparison. **Methods in molecular biology**, v. 857, p. 231–257, 2012.

KUMAR, K. Morita-Baylis-Hillman reaction: scope and significance. **J Pharm Chem Chem Sci.**, 2018, v. 2, n. 1, p. 11-20.

KNUTSSON S. et. al. Noncovalent Inhibitors of Mosquito Acetylcholinesterase 1 with Resistance-Breaking Potency. **J Med Chem**, 2018, v.61, n. 23, p. 10545-10557.

KUMAR, S.; KAUSHIK, G.; VILLARREAL-CHIUI, J. F. Scenario of organophosphate pollution and toxicity in India: A review. **Environmental Science and Pollution Research**, 2016, v.23, n. 10, p. 9480–9491.

KUMAR, V., et. al. (2013). Spectroscopic methods for the detection of organophosphate pesticides—A preview. **Current World Environment Journal**, 2021, v.8, n. 2, p. 313–318.

LANGER, P. New Strategies for the Development of an Asymmetric Version of the Baylis-Hillman Reaction. **Angew Chem Int Ed Engl**, v.39, n. 17, p. 3049-3052, 2000.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1 abr. 1993.

LEE, J.; et. al. Protein loop modeling by using fragment assembly and analytical loop closure **Proteins**, v. 78, n. 16, p. 3428-36, 2010.

LEE, S.; KIM, J.; LEE, S. Floating of the lobes of mosquito (*Aedes togoi*) larva for respiration. **Sci Rep**, v. 7, n. 43050, 2017.

LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. (EDS.). **Biology of the Insect Midgut**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1996.

LEMOS, A.B., et. al. Histological and histochemical characterization of the midgut of healthy *Aedes aegypti* larvae. *Annual research & review in biology*, v. 22, p.1-15, 2018.

LEÓDIDO, A.C.M.; ORTIGÃO M., R.; MARTINS, G.F. The ultrastructure of the *Aedes aegypti* heart. **Arthropod Struct Dev**. v. 42, n. 6, p539-550, 2013.

LIMA-JUNIOR, C.G.; VASCONCELLOS, M.L. Morita-Baylis-Hillman adducts biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. **Bioorg Med Chem**, 2012, v. 20, n. 13, p. 3954-71.

LI, X. et al. Review on Structures of Pesticide Targets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7144, 28 set. 2020.

LIU, T.; TANG, G.W.; CAPRIOTTI, E. Comparative modeling: the state of the art and protein drug target structure prediction. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 14, n. 6, p. 532-47, 2011.

LOWE, R., et. al. The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. **Int J Environ Res Public Health**, v. 1, n. 15, 2018.

MACK, J.; SHUMBA, M. Rate enhancement of the Morita–Baylis–Hillman reaction through mechanochemistry. **Green Chem.**, v.9, n. 4, p. 328–330, 2007.

MACRAE, C. F. et al. Mercury 4.0: from visualization to analysis, design and prediction. **Journal of Applied Crystallography**, v. 53, n. 1, p. 226–235, 1 fev. 2020.

MAHER, D. J.; CONNON, S. J. Acceleration of the DABCO-promoted Baylis–Hillman reaction using a recoverable H-bonding organocatalyst, **Tetrahedron Letters**, v. 45, n. 6, p. 1301-1305, 2007.

MANNIGE, R. V.; KUNDU, J.; WHITELAM, S. The Ramachandran Number: An Order Parameter for Protein Geometry. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0160023, 4 ago. 2016.

MARTÍN, S. J. L., et. al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 1, n. 82, p. 128–135, 2010.

MCELROY, K.L., et. al. Characterization of the antigen distribution and tissue tropisms of three phenotypically distinct yellow fever virus variants in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 8, n.5, 2008.

MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server, p. W20–W25, 1 jul. 2004.

MCGREGOR, B.L.; CONNELLY C.R.A Review of the Control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Continental United States. **Journal of Medical Entomology**, v. 58, n.1, p. 10-25, 2021.

MEURER-GRIMES, B.; CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Pyrethrum Flowers. Production, Chemistry, Toxicology, and Uses. **Brittonia**, v. 48, n. 4, p. 613, out. 1996.

MNIF, W., et. al. Effect of endo-crine disruptor pesticides: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.8, n. 6, p.2265-2303, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE Secretaria de Vigilância em Saúde Informe Epidemiológico da Dengue Análise de situação e tendências -2010. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&alias=917-novos-dados-da-dengue-no-brasil-2010-7&category_slug=dengue-964&Itemid=965>. Acesso em: 12 abr. 2021.

MOFFETT, S.B.; MOFFETT, D.F. Comparison of immonoractivity to serotonin, FMRFamide and SCPb in the gut and visceral nervous system of larvae, pupae and adults of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **J Insect Sci**, v. 5, n. 1, p. 20, 2005.

MORI, A.; et. al. Molecular cloning and characterization of the complete acetylcholinesterase gene (Ace1) from the mosquito *Aedes aegypti* with implications for comparative genome analysis. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 7, p. 667–74, 2007.

MORITA, K.; SUZUKI, Z.; HIROSE, H. A Tertiary Phosphine-catalyzed Reaction of Acrylic Compounds with Aldehydes. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v.41, n. 11, p. 2815, 1968.

MORSMAN, J. M. et al. Evaluation of dihydropyrimidine dehydrogenase activity in South-west Asian, Kenyan and Ghanaian populations. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 50, n. 3, p. 269–272, set. 2000.

MULLA, M.S.; FEDERICI, B.A.; DARWAZEH, H.A. Ede L. Field evaluation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against floodwater mosquitoes. **Applied Environmental Microbiology**, V. 43, N. 6, P. 1288-1293, 1982.

MULLIGAN I.I.I. F. S.; SCHAEFER, C. H.; WILDER, WH. Efficacy and persistence of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* H.14 against mosquitoes under laboratory and field conditions. **Journal of Economic Entomology** 1980.

MISYURA, L.; et. al. A comparison of aquaporin expression in mosquito larvae (*Aedes aegypti*) that develop in hypo-osmotic freshwater and iso-osmotic brackish water. **PLoS One**, v. 15, n.8, 2020.

NISHIURA, J.T.; et. al. Modulation of larval nutrition affects midgut neutral lipid storage and temporal pattern of transcription factor expression during mosquito metamorphosis. **J Insect Physiol**, v. 53, p. 47–58, 2007.

OASHI, T.; et. al. Automated Selection of Compounds with Physicochemical Properties to Maximize Bioavailability and Druglikeness. **J. Chem. Inf. Model**, v. 51, n. 1, p. 148-158, 2011.

OLIVEIRA, J. P. G. et al. Morita-Baylis-Hillman Reaction with 7-Chloroquinoline Derivatives-New Compounds with Potential Anticancer Activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 347-354, 2021.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Manual para aplicação de borrifação residual em áreas urbanas para o controle do *Aedes aegypti***. Washington, D.C.: OPAS; 2019.

Pan American Health Organization (PAHO). **Integrated Management Strategy for Dengue Prevention and Control in the Region of the Americas**, 2018.

PAVIA, D.L., et. al. **Introdução à Espectroscopia**. 4th ed. Cengage Learning, 2010.

PAHO WHO | Chikungunya | 2017. Disponível em: <https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdfmore&cid=8975&Itemid=40931&lang=en>. Acesso em: jul. 2021.

PLATA, R.E.; SINGLETON, D.A. A case study of the mechanism of alcohol-mediated Morita Baylis-Hillman reactions. The importance of experimental observations. **J Am Chem Soc**, v.137, n. 11, p. 3811-26., 2015.

Philippines says anti-dengue vaccine may be connected to three deaths. **Reuters**, 2 fev. 2018. Disponível em: <<https://www.reuters.com/article/sanofi-dengue-philippines-idINKBN1FM0S6>>. Acesso em: 23 jul. 2021.

PINTO, J.; et al. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in three populations of *Aedes aegypti* from Peru. **Parasites Vectors**, v. 12, n. 494, 2019.

PINKAS, A., et. al. An avian model for ascertaining the mechanisms of organophosphate neuroteratogenicity and its therapy with mesenchymal stem cell transplantation. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 50, p. 73–81, 2015.

POOPATHI, S.; TYAGI, B. The Challenge of Mosquito Control Strategies: from Primordial to Molecular Approaches. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 1, n. 2, p. 51-65, 2006.

POWELL, J.R., et. al. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*—a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 11–17, 2013.

POWELL, J.R.; GLORIA-SORIA, A.; KOTSAKIOZI, P. Recent history of *Aedes aegypti*: Vector genomics and epidemiology records. **Bioscience**, v.68, p. 854–860, 2018.

PRICE, K. E.; et. al. **Org. Lett**, v. 7, p. 147-150, 2005.

- PRICE, K. E.; et. al. **J. Org. Chem**, v. 70, p. 3980-3987, 2005.
- RAMSAY, J. A. Osmotic regulation in mosquito larvae. **J. Exp. Biol**, v. 27, n. 2, p. 145-157, 1950.
- REDDY, T. N.; RAO, V. J. Importance of Baylis-Hillman adducts in modern drug discovery, **Tetrahedron Letters**, v. 59, n.30, p. 2859-2875, 2018.
- ŘEZÁČ, J.; HOBZA, P. Benchmark Calculations of Interaction Energies in Noncovalent Complexes and Their Applications. **Chem Rev**. v. 116, n. 9, p. 5038-71, 2016.
- REYNOSO-LÓPEZ, J. E. E. A. et.al. *Metarhizium robertsii* in combination with *Trichoderma asperellum* reduce the malathion doses used to control ambrosia beetles: the case of *Xyleborus affinis*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 0, n. 0, p. 1-18, 2021.
- RICHARDSON, G. et al. An examination of aspartate decarboxylase and glutamate decarboxylase activity in mosquitoes. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 7, p. 3199–3205, 16 out. 2009.
- RICHARDSON, K., et. al. Thermal sensitivity of *Aedes aegypti* from Australia: empirical data and prediction of effects on distribution. **J Med Entomol**, v. 48, n. 4, p. 914-23, 2011.
- ROSE, R.I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerg. Infec. Dis.**, v. 7, n. 1, p. 17-23, 2001.
- RUEDA, L. M. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission. **Zootaxa**, v. 589, n. 1, p. 1, 3 ago. 2004.
- RYTER, S.W.; TYRRELL, R.M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 2, p. 289-309, 2000.
- SALAZAR, M.I., et. al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC Microbiol**, v.7, n.1, 2007.
- SALGADO, V. L. Studies on the Mode of Action of Spinosad: Insect Symptoms and Physiological Correlates. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 60, n. 2, p. 91–102, jul. 1998.
- SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, v. 234, p. 779-815, 1993.
- SAIKIA, M.; SARMA, J. C. (2010). Baylis–Hillman reaction under solvent-free conditions—Remarkable rate acceleration and yield enhancement. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 88, n. 12, p. 1271–1276, 2010.

SALMASO, V.; MORO, S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 22 ago. 2018.

SANTOS, L. S., et. al. Probing the mechanism of the Baylis–Hillman reaction by electrospray ionization mass and tandem mass spectrometry. **Angewandte Chemie International Edition**, v.43, n. 33, p. 4330-4333, 2004.

SAÚDE, O. P.-A. DA. Documento técnico para a implementação de intervenções baseado em cenários operacionais genéricos para o controle do *Aedes aegypti*. 30 out. 2019.

SHAO, L.; DEVENPORT, M.; JACOBS-LORENA, M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. **Arch Insect Biochem Physiol**. v. 47, n. 2, p. 119-25, 2001.

SHIMSHONI, J. A. et al. Pesticide distribution and depletion kinetic determination in honey and beeswax: Model for pesticide occurrence and distribution in beehive products. **PLOS ONE**, v. 14, n. 2, p. e0212631, 20 fev. 2019.

SIEGFRIED, E. D.; GREGORY, H.P. Roos, Synthetic potential of the tertiary-amine-catalysed reaction of activated vinyl carbanions with aldehydes. **Tetrahedron**, v. 44, n. 15, p. 4653-4670, 1988.

SILVA, N.M.; SANTOS, N.C.; MARTINS, I.C. Dengue and Zika Viruses: Epidemiological History, Potential Therapies, and Promising Vaccines. **Trop Med Infect Dis**, v. 5, n. 4, 2020.

SODERLUND, D. M. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. **Archives of toxicology**, v. 86, n. 2, p. 165-181, 2012.

SOUZA, R. O. M. A. de; et. al. The Morita–Baylis–Hillman reaction in aqueous–organic solvent system, **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 41, p. 5902-5905, 2008.

SODERLUND, D. M. **Chapter 77 - Toxicology and Mode of Action of Pyrethroid Insecticides**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012374367100077X?via%3Di%3Dhub>>. Acesso em: 13 mar. 2022.

SUN, L., Xu, et. al. Developmental exposure of zebrafish larvae to organophosphate flame retardants causes neurotoxicity. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 55, p. 16–22, 2016.

SUWANMANEE, S., et. al. Peritrophic membrane structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes after infection with dengue virus type 2 (D2-16681). **Applied Entomology and Zoology**, v. 44, p. 257-265, 2009.

SMITH, Wilder; A.; Macary, P. Dengue: challenges for policy makers and vaccine developers. **Current infectious disease reports**, v.5, n. 16, p. 404, 2014.

SPARREBOOM, A. et al. Clinical trial design: incorporation of pharmacokinetic, pharmacodynamic, and pharmacogenetic principles. **Anticancer Drug Development**, p. 329–351, 2002.

SPONG, K. E.; ANDREW, R. D.; ROBERTSON, R. M. (2016). Mechanisms of spreading depolarization in vertebrate and insect central nervous systems. **Journal of neurophysiology**, v. 116, n. 3, p. 1117–1127, 2016.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **J. Mol. Modeling**, v. 19, p.1-32, 2013.

Stewart Computational Chemistry - MOPAC Home Page. Disponível em: <<http://openmopac.net/>>.

STOBBART, R. H. The effect of some anions and cations upon the fluxes and net uptake of chloride in the larva of *Aedes aegypti* (L.), and the nature of the uptake mechanisms for sodium and chloride. **J. Exp. Biol**, v. 47, n. 1, p. 35- 57, 1967.

TAPPEL, A.L. Unsaturated lipide oxidation catalyzed by hematin compounds. **J Biol Chem**, v. 217, n. 2, p. 721-33, 1955.

TERRADAS, G.; et. al. Family level variation in *Wolbachia*-mediated dengue virus blocking in *Aedes aegypti*. **Parasit Vectors**, v. 10, n.1, p. 622, 2017.

TESTA, B.; et. al. The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples. **Perspect. Drug Discov. Des.** 2000, 19, 179–211

TOLEDO, M. et al. Probability of dengue transmission and propagation in a non-endemic temperate area: conceptual model and decision risk levels for early alert, prevention, and control. **Parasites Vectors**, v.12, n.38, 2019.

UNSWORTH, J. et al. The Battle for a Sustainable Food Supply. **Sustainable Agrochemistry**, p. 13–84, 2019.

Van de Waterbeemd, H. Calculation of drug lipophilicity—The hydrophobic fragmental constant approach. **Quant. Struct. Act. Relatsh.** 1993, 12

VINCENT, S.H.; et. al. The influence of heme-binding proteins in heme-catalyzed oxidations. **Arch Biochem Biophys**, v. 265, n. 2, p. 539-50, 1988.

VINCENT, S.H. Oxidative effects of heme and porphyrins on proteins and lipids. **Semin Hematol**, v. 26, n. 2, p.105-13, 1989.

VITKUP, D.; et. al. Completeness in structural genomics. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 08, p. 559-566, 2001.

VYAS, V. K.; et. al. (2012). Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 74, n. 1, p. 1–17, 2012.

WANG, L.; XIE, X. Q. Computational target fishing: what should chemogenomics researchers expect for the future of *in silico* drug design and discovery? *Future Medicinal Chemistry*, March 2014, vol 6(3): 247–249. doi:10.4155/fmc.14.5.

WATERHOUSE, A., et. al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*, 46, n; W1, p. W296-W303, 2018.

WATTS, D.M., et. al. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *Am J Trop Med Hyg*, v. 36, n. 1, p. 143-52, 1987.

WEBB, J. E., GREEN, R. A. On the penetration of insecticides through the insect cuticle, *J. Exp. Biol.* 22 (1945) 8–20.

WEILL, M. et. al. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*, v 423, n. 6936, p.136-7, 2003.

WHITFORD, F. **The Pesticide Marketplace**. Disponível em: <<https://mdc.itap.purdue.edu/item.asp?itemID=18901>>. Acesso em: 13 mar. 2022. Acesso em: jun. 2021.

WHITEN, S. R.; et. al. Characterization of the adult *Aedes aegypti* early midgut peritrophic matrix proteome using LC-MS. *PLoS one*, v. 13, n. 3, 2018.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. Web Server, p. W407–W410, 8 maio 2007.

WIGGLESWORTH, V.B. The storage of protein, fat, glycogen and uric acid in the fat body and other tissues of mosquito larvae. *J Exp Biol*, v.19, p. 56–77, 1942.

WILSON, A. L.; et. al. (2020). The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 14, n. 1, 2020.

WHO SCIENTIFIC GROUP ON ARTHROPOD-BORNE AND RODENT-BORNE VIRAL DISEASES; ORGANIZATION, W. H. **Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases : report of a WHO scientific group [meeting held in Geneva from 28 February to 4 March 1983]**. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/39922>>. Acesso em: 13 mar. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global insecticide use for vector-borne disease control: a 10-year assessment [2000-2009]**. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/44670>>. Acesso em: 13 mar. 2022.

WEI, Y.; SHI, M. Recent advances in organocatalytic asymmetric Morita-Baylis-Hillman/aza-Morita-Baylis-Hillman reactions. *Chem Rev*, v. 113, n. 8, p. 6659-90, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Prequalification Team Vector Control Decision Document: Cielo ULV Adulticide Space Spray Prequalification Team – Vector Control Group (PQT-VC) Access to Medicines, Vaccines and Pharmaceuticals (MVP). Geneva: WHO, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012: summary for decision-makers.** Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/78102>. Acesso em: 05 jul. 2021.

WORLD. **Zika virus.** Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>. Acessado em: 13 jul. 2021.

XUE, L.; FANG, X.; HYMAN, J.M. Comparing the effectiveness of different strains of *Wolbachia* for controlling chikungunya, dengue fever, and zika. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 7, 2018.

YACTAYO, S., et. al. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. **The Journal of infectious diseases**, v. 214, n.5, p. S441–S445, 2016.

ZHANG, J.; LIANG, Y.; ZHANG, Y. Atomic-Level Protein Structure Refinement Using Fragment-Guided Molecular Dynamics Conformation Sampling. **Structure**, V. 19, p. 1784-1795, 2011.

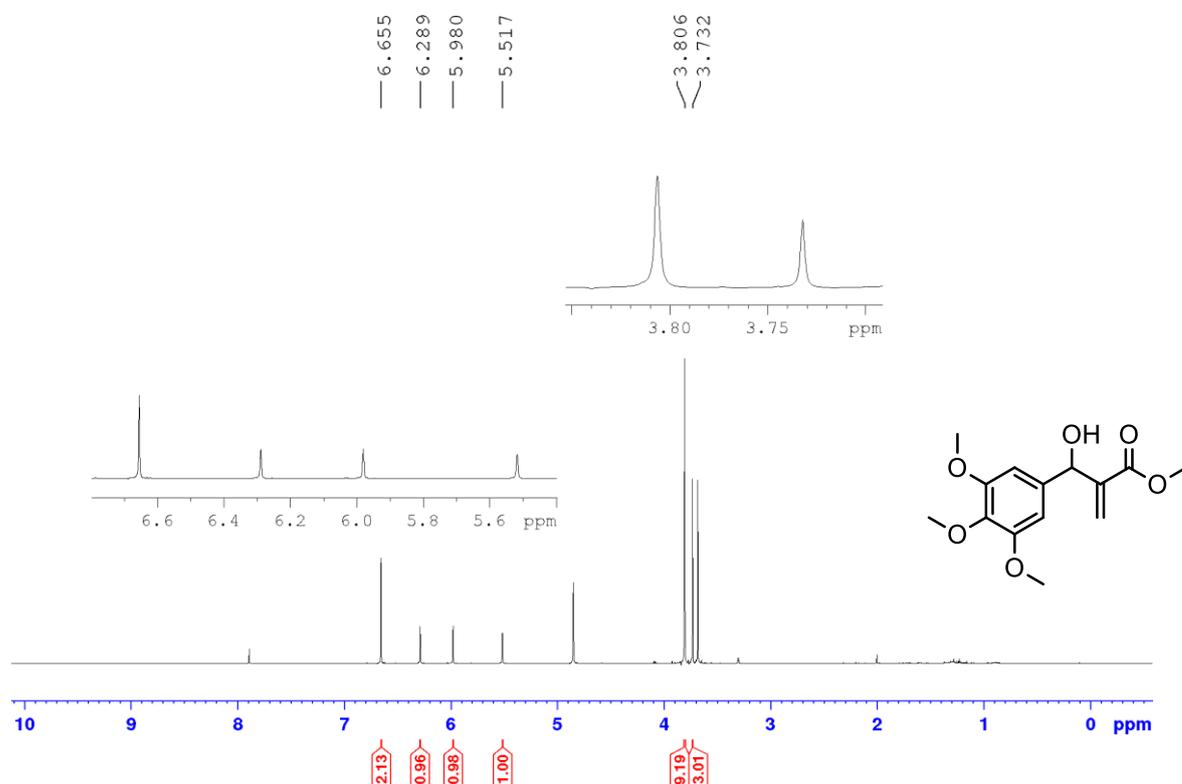
ZHAO, Y., et. al. Unorthodox Interactions at Work. **J Am Chem Soc**, v.138, n. 13, p. 4270-7, 2016.

ZHOU, Y.; JOHNSON, M.E. Comparative molecular modeling analysis of-5-amidinoindole and benzamidine binding to thrombin and trypsin: specific H-bond formation contributes to high 5-amidinoindole potency and selectivity for thrombin and factor Xa. **J Mol Recognit**, v. 12, n. 4, p. 235-41, 1999.

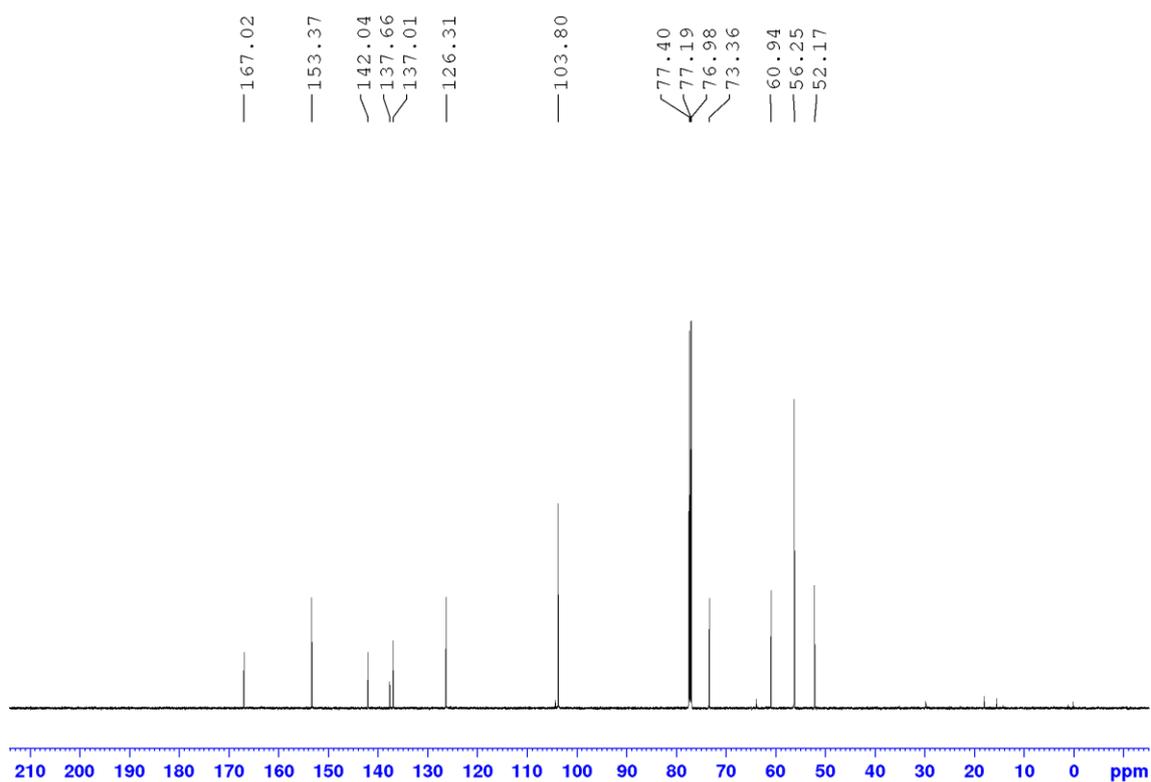
ZARA, A. L. de S. A., et. al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 25, n. 2, 2016.

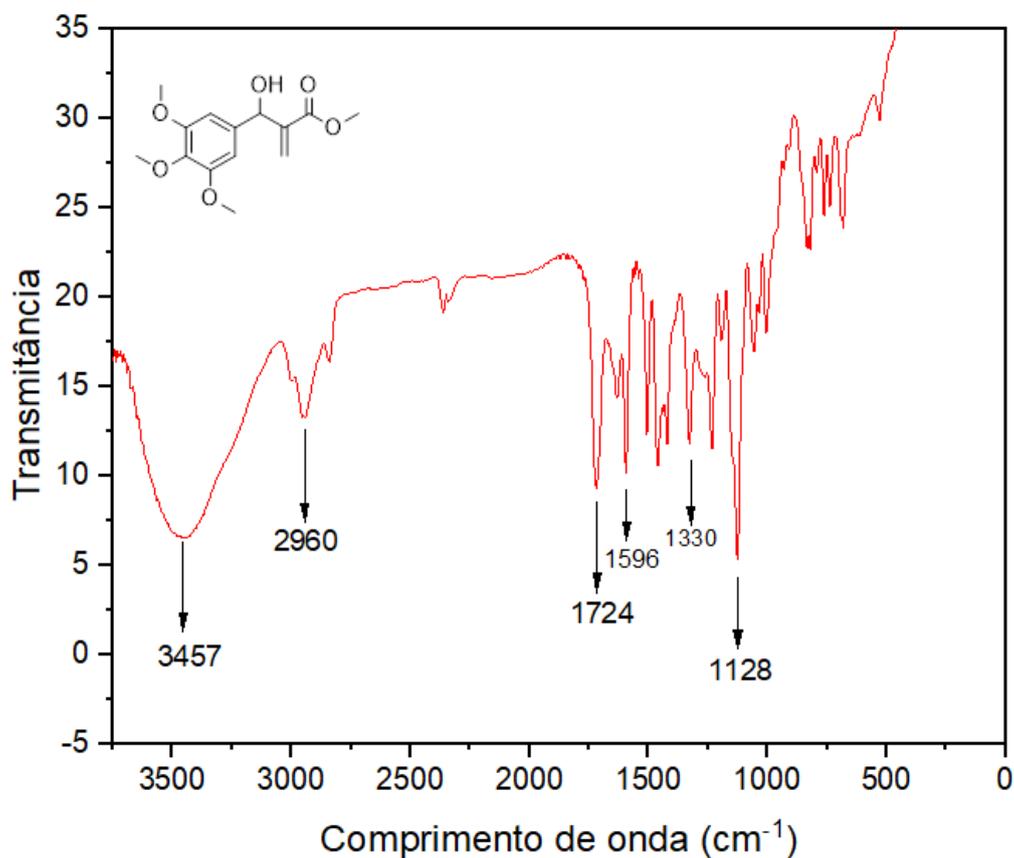
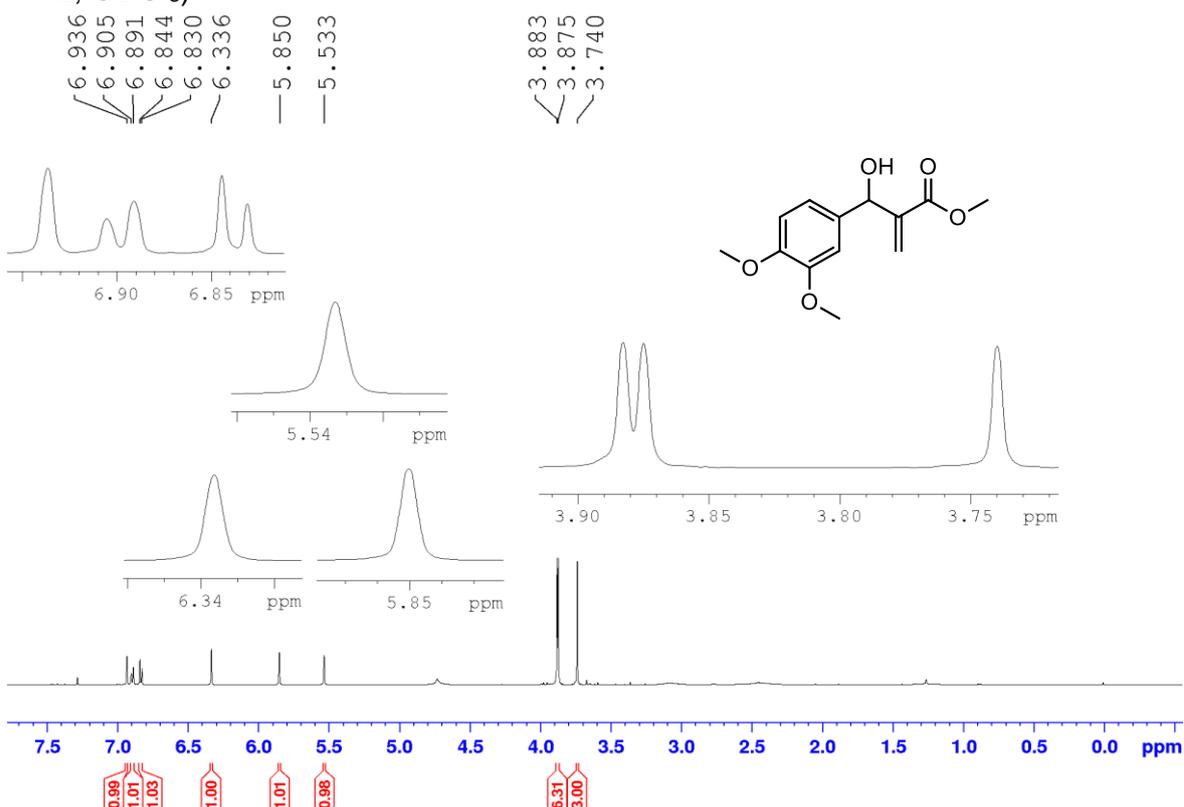
ANEXOS: Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e de Infravermelho (FTIR).

Espectro de RMN de ^1H do metil 2-(hidroxi(3,4,5-trimetoxifenil)metil)acrilato (**3a**) (600 MHz; CD_3OD).

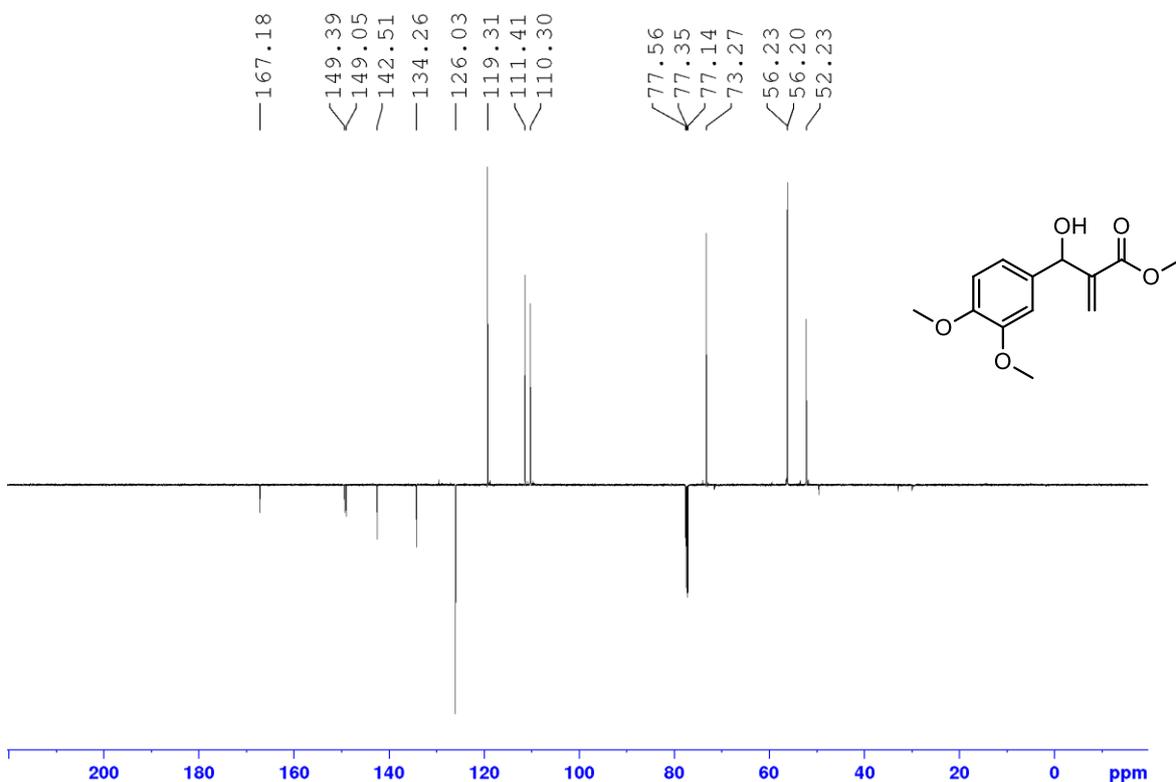


Espectro de RMN de ^{13}C do metil 2-(hidroxi(3,4,5-trimetoxifenil)metil)acrilato (**3a**) (600 MHz; CDCl_3).

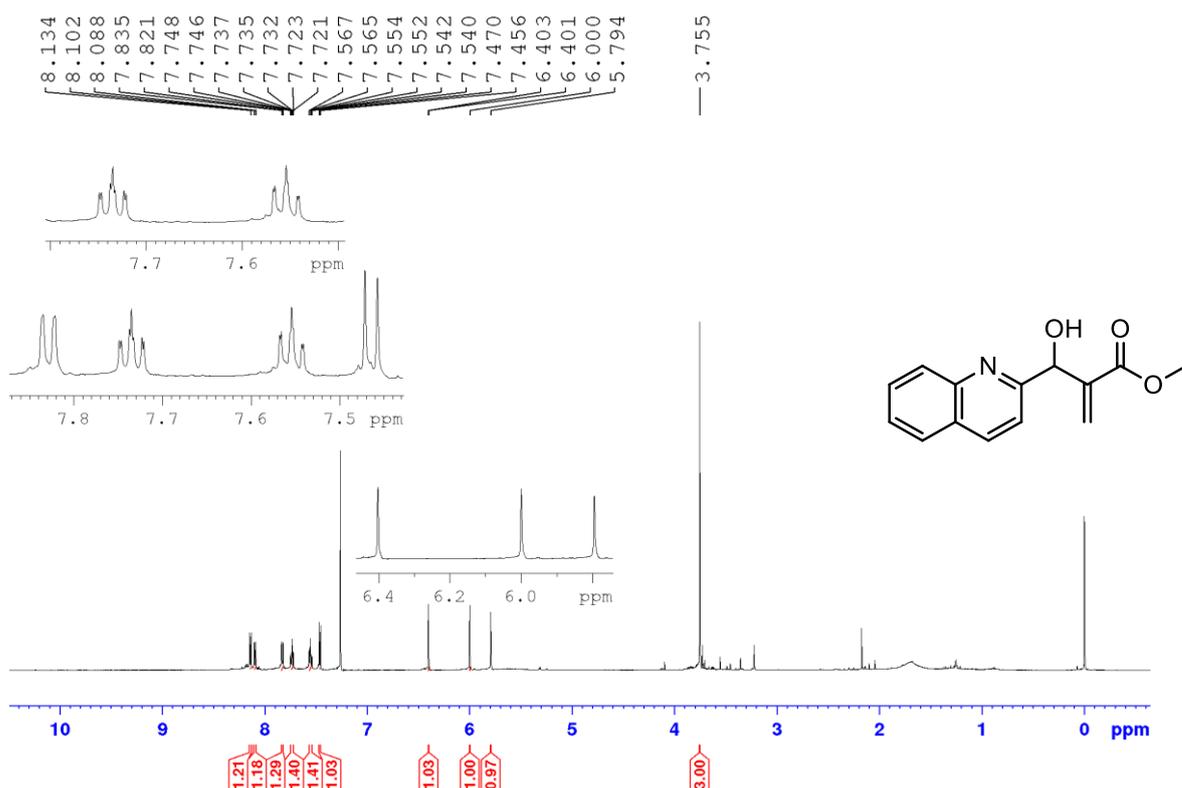


Espectro de IR (KBr) do metil 2-(hidroxi(3,4,5-trimetoxifenil)metil)acrilato (**3a**)Espectro de RMN de ^1H do metil 2-((3,4-dimetoxifenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3b**) (600 MHz; CDCl_3).

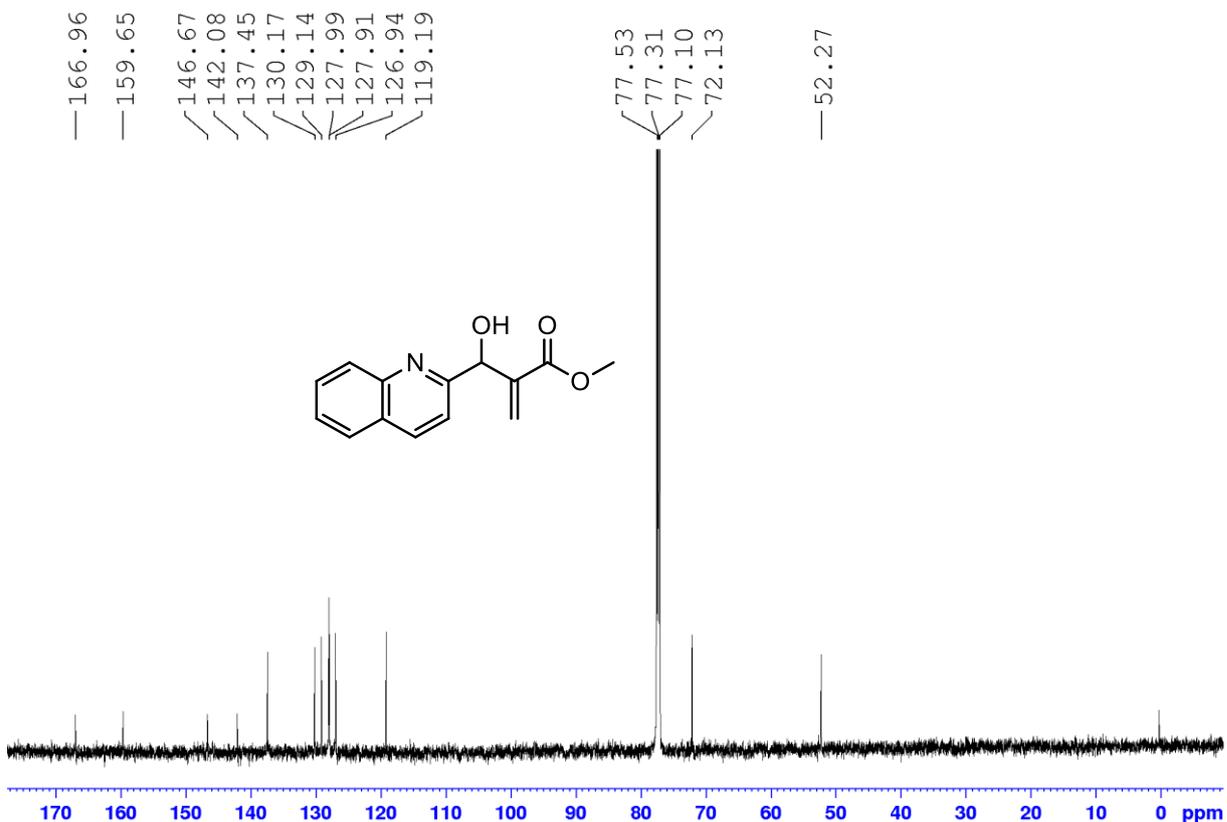
Espectro de RMN de ^{13}C do metil 2-((3,4-dimetoxifenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3b**) (600 MHz; CDCl_3).



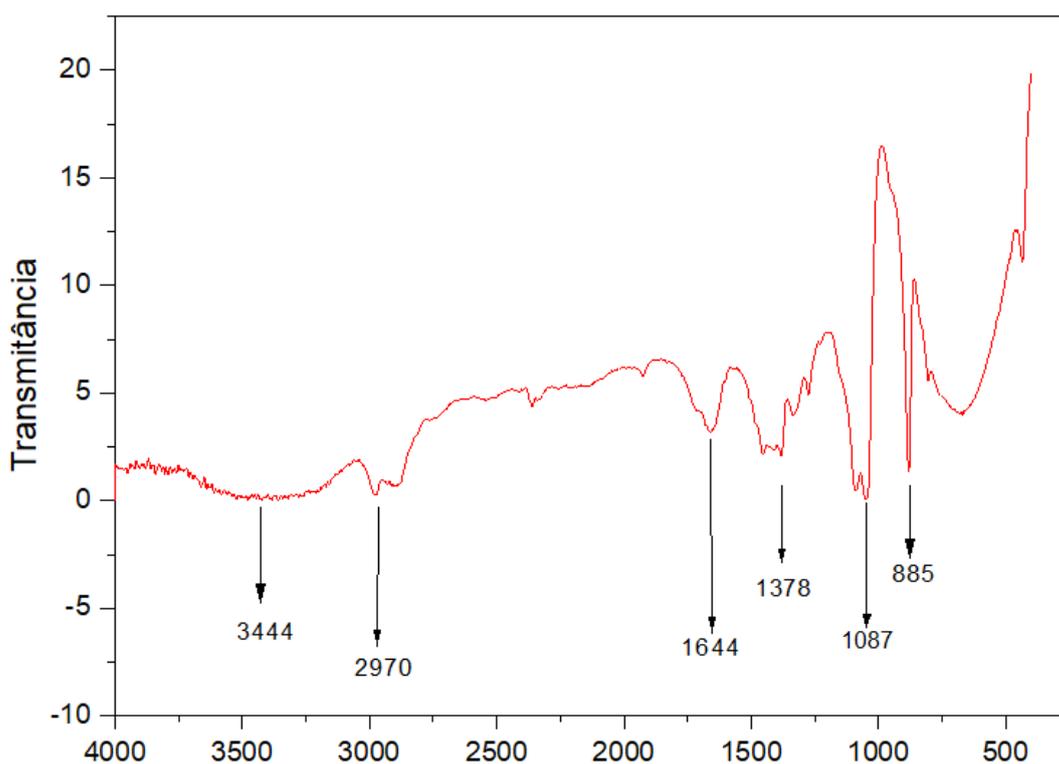
Espectro de RMN de ^1H do metil 2-(hidroxi(quinolin-2-il)metil)acrilato (**3c**) (600 MHz; CDCl_3).



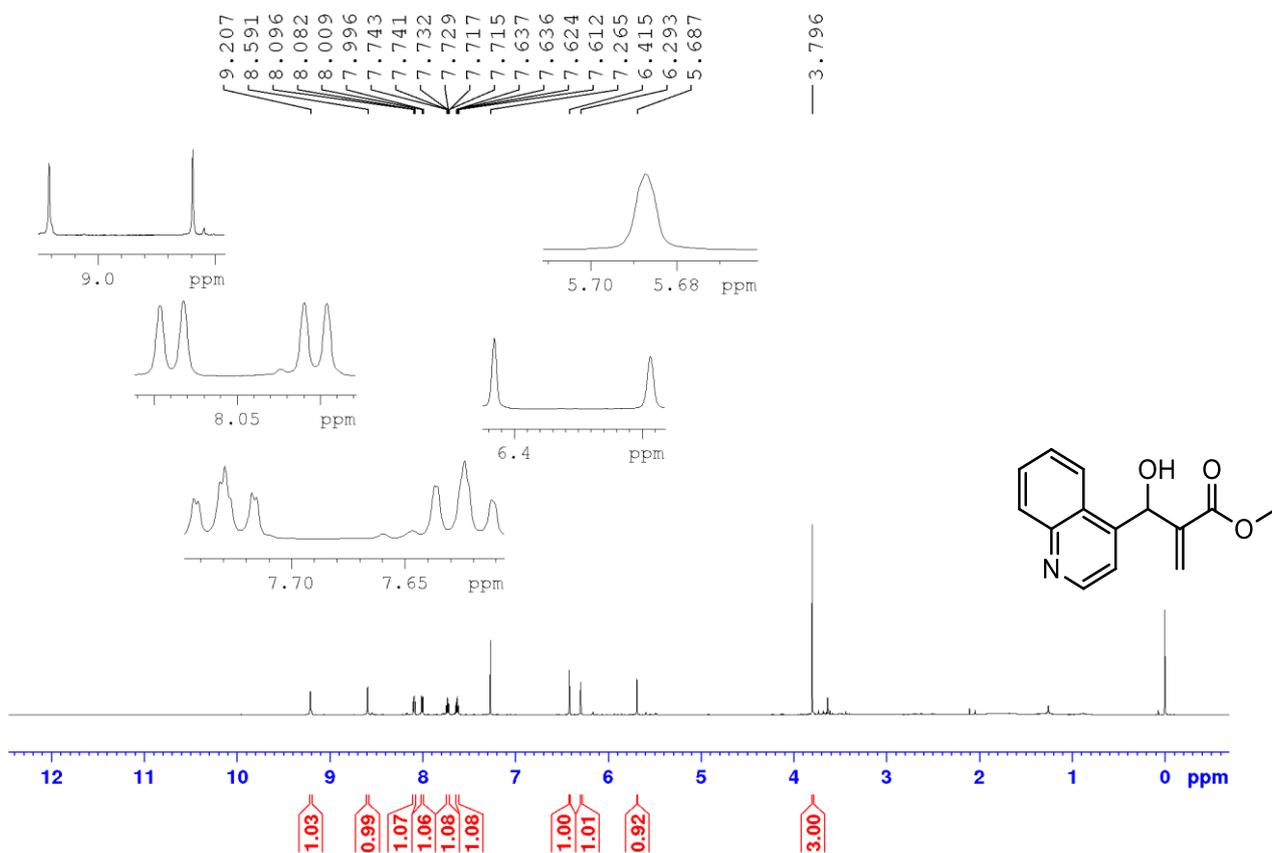
Espectro de RMN de ^{13}C do metil 2 metil 2-(hidroxi(quinolin-2-il)metil)acrilato (**3c**) (600 MHz, CDCl_3).



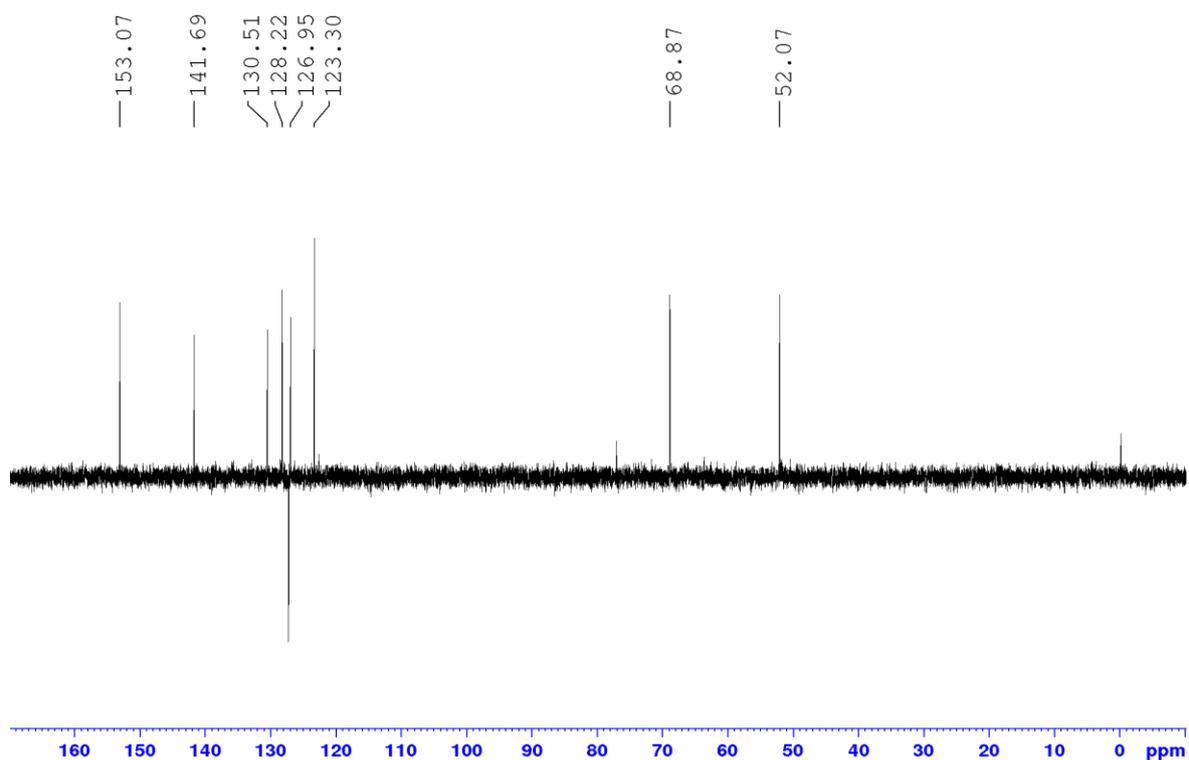
Espectro de IR (KBr) do metil 2 metil 2-(hidroxi(quinolin-2-il)metil)acrilato (**3c**)

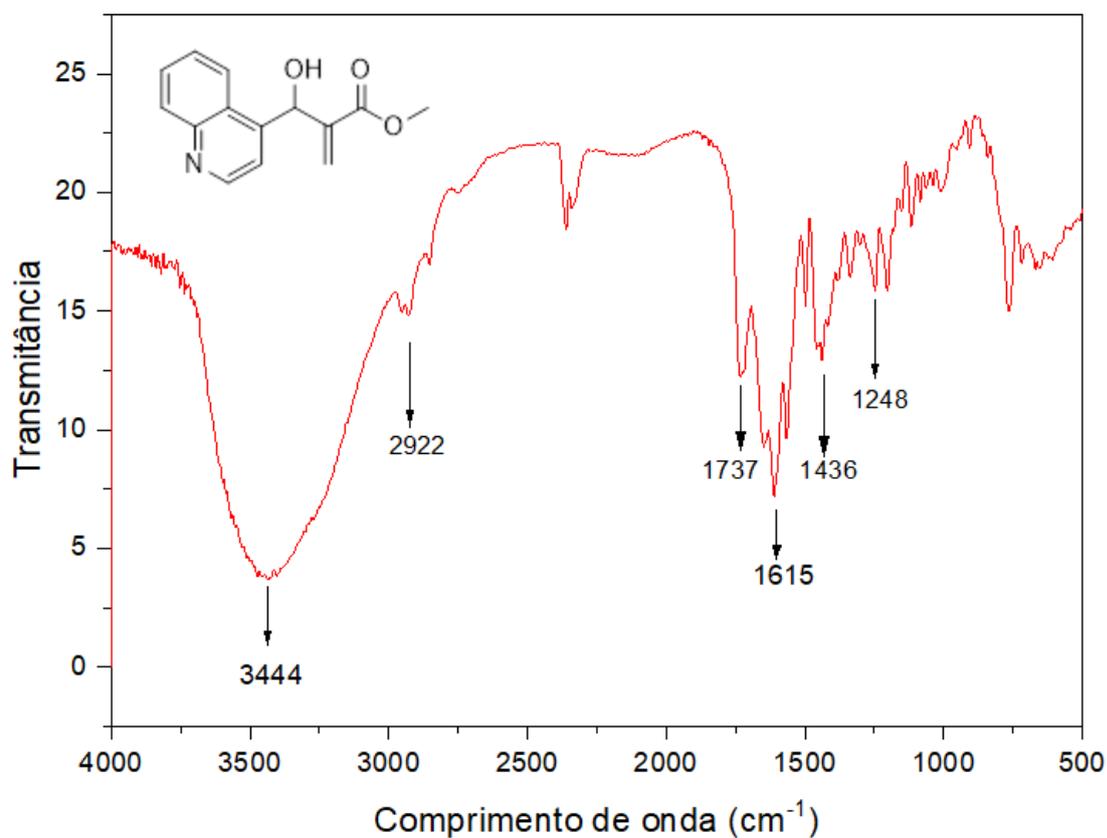
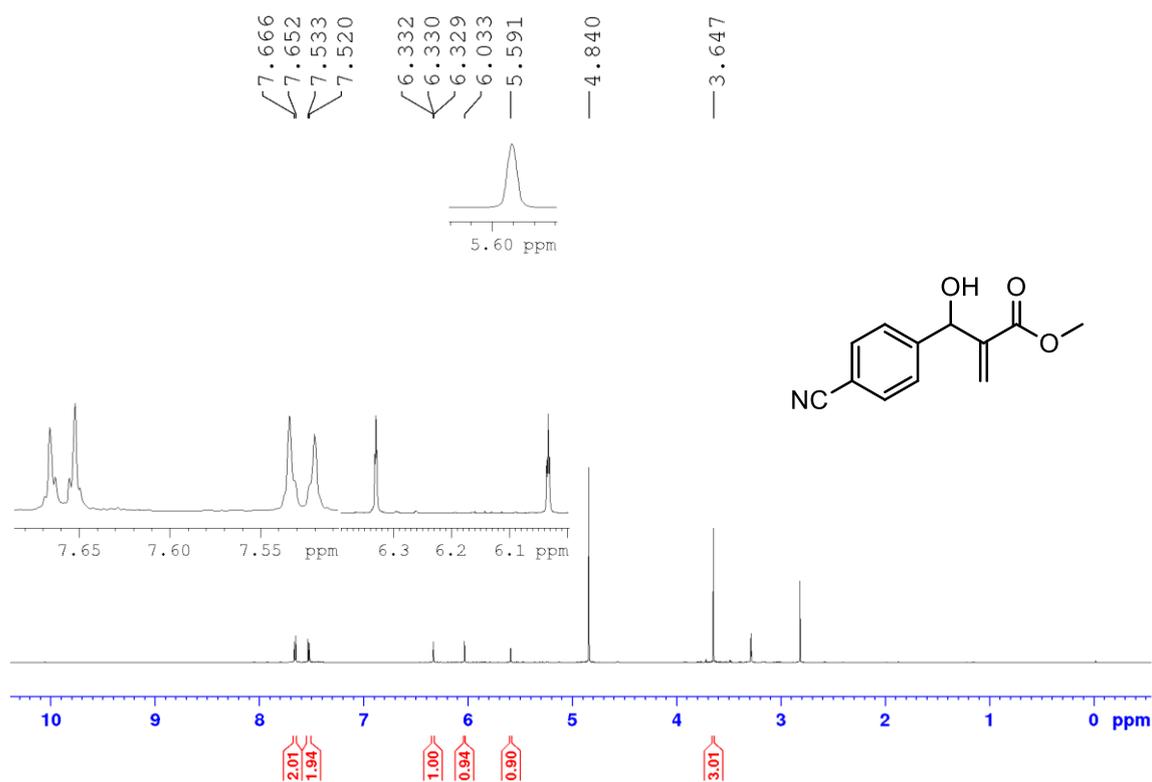


Espectro de RMN de ^1H do metil 2-(hidroxi(quinolin-4-il)metil)acrilato (**3d**) (600 MHz; CDCl_3).

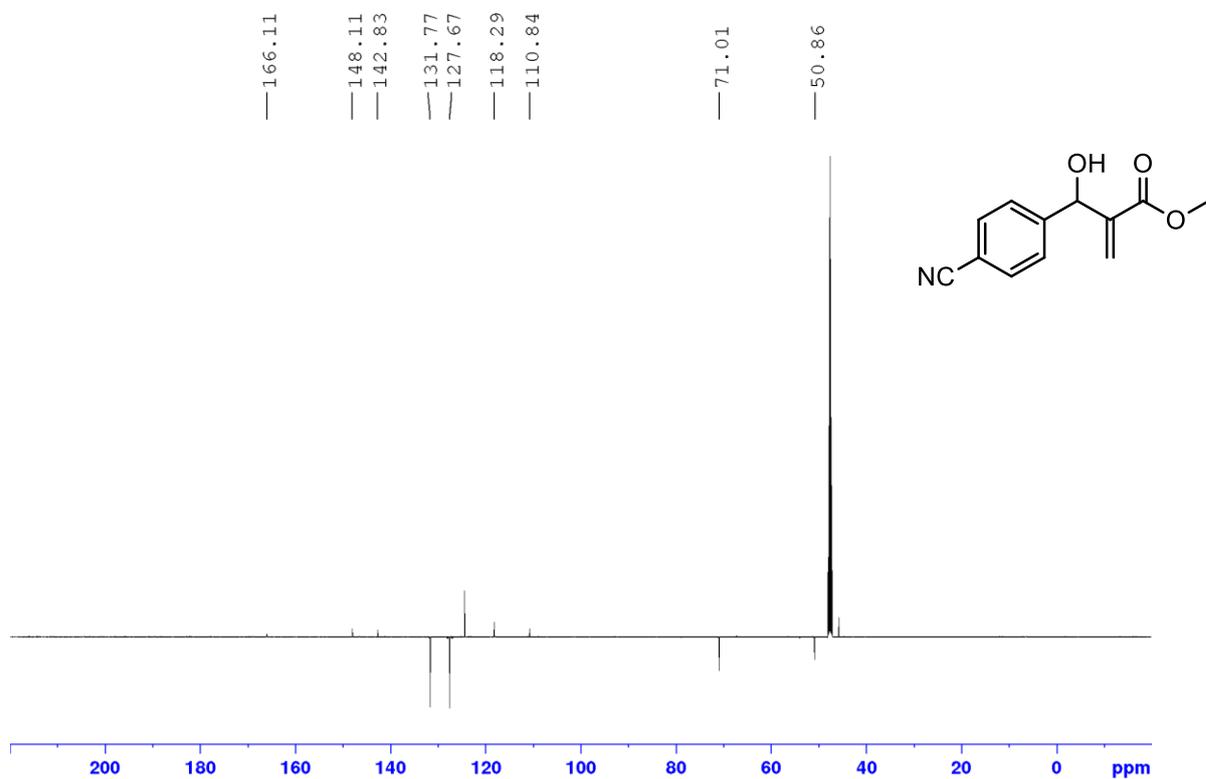


Espectro de RMN de ^{13}C do metil 2-(hidroxi(quinolin-4-il)metil)acrilato (**3d**) (600 MHz; CDCl_3).

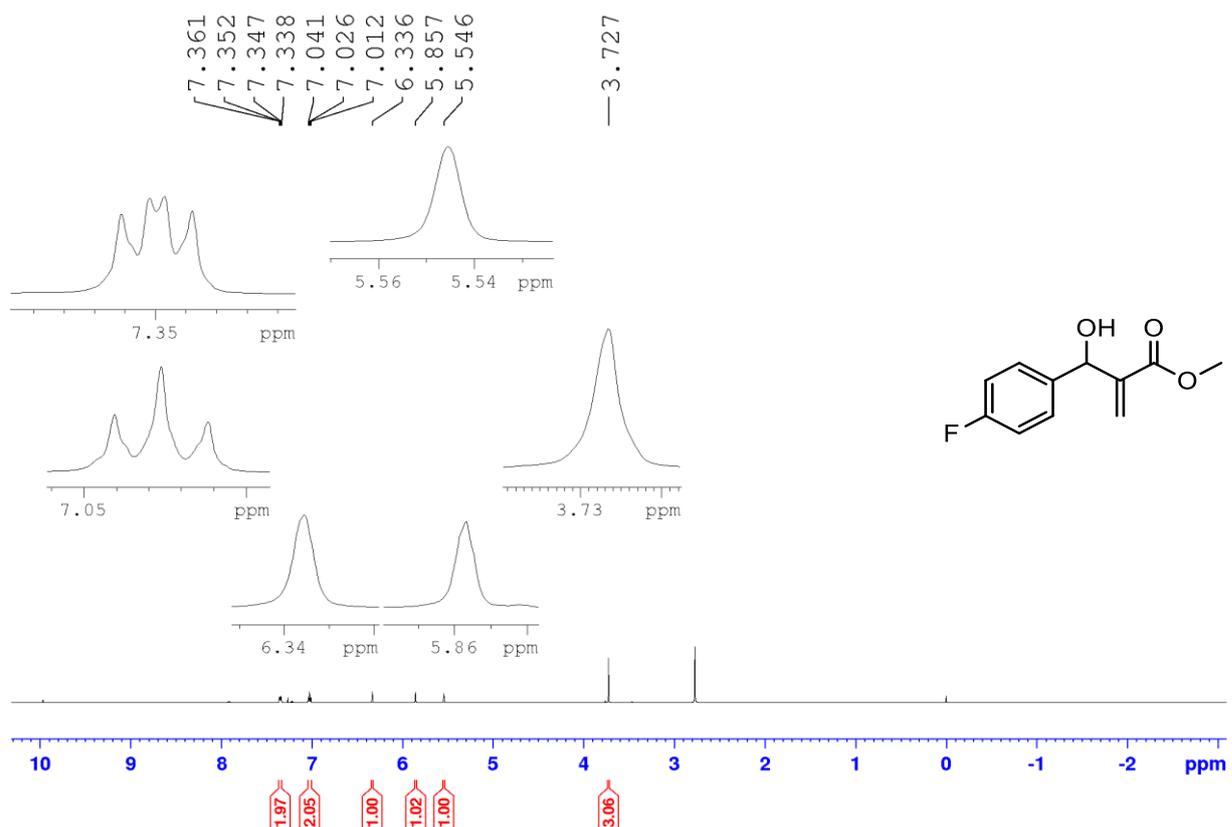


Espectro de IR (KBr) do metil 2-(hidroxi(quinolin-4-il)metil)acrilato (**3d**)Espectro de RMN de ¹H do metil 2-((4-cianofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3e**) (600 MHz; CDCl₃).

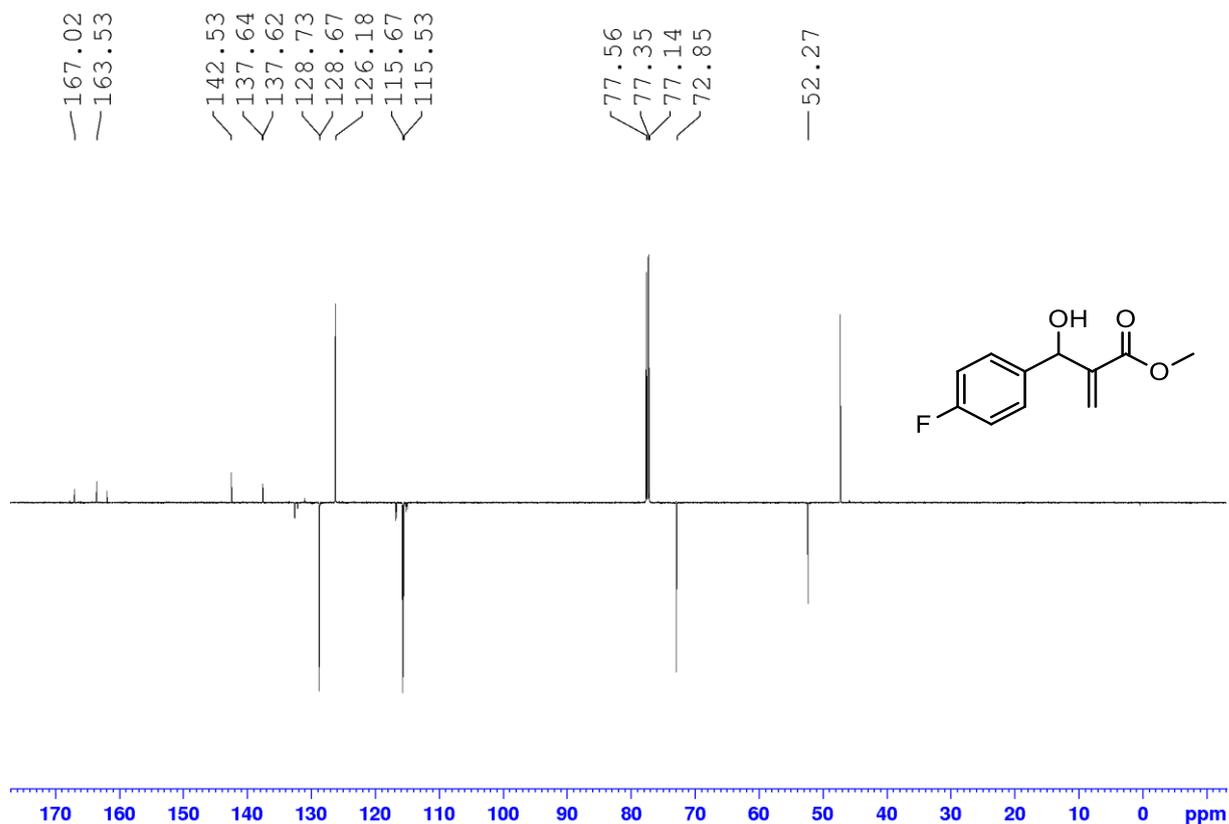
Espectro de RMN de ^{13}C do metil 2-((4-cianofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3e**) (600 MHz; CDCl_3).



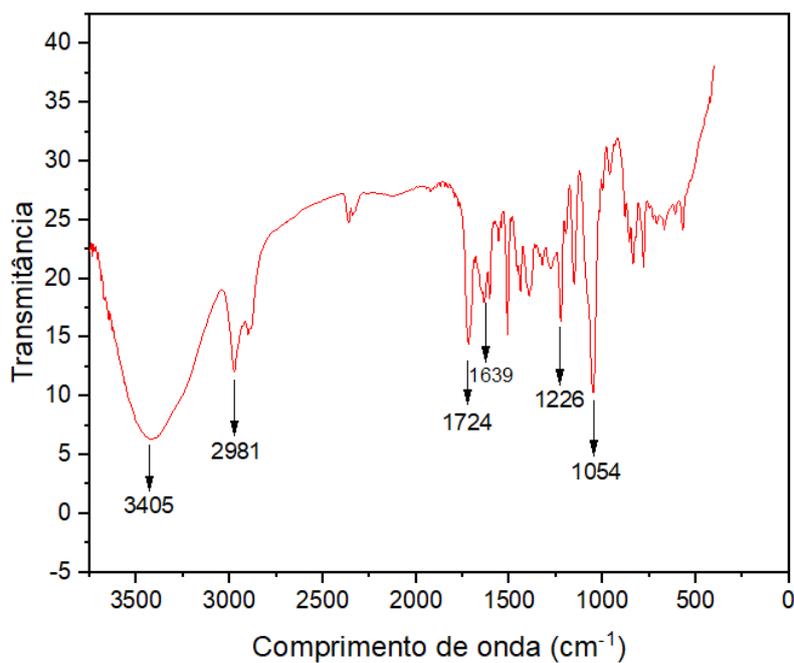
Espectro de RMN de ^1H do metil 2-((4-fluorofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3f**) (600 MHz; CDCl_3).



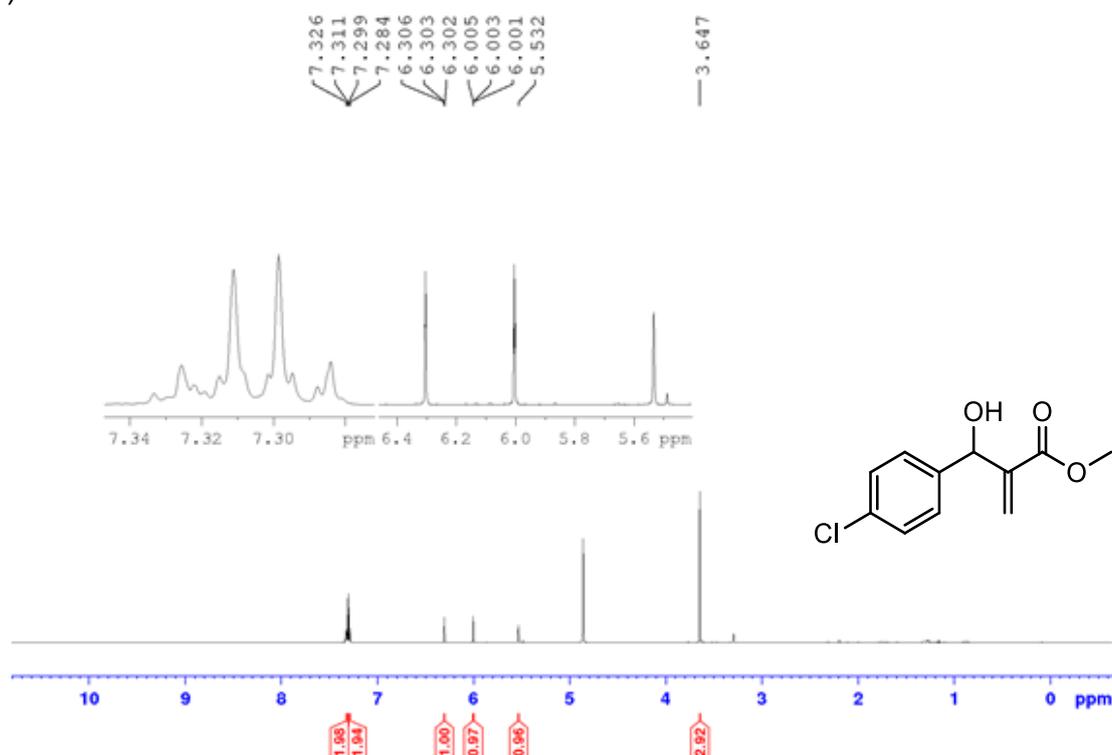
Espectro de RMN de ^{13}C do metil 2-((4-fluorofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3f**) (600 MHz; CDCl_3).



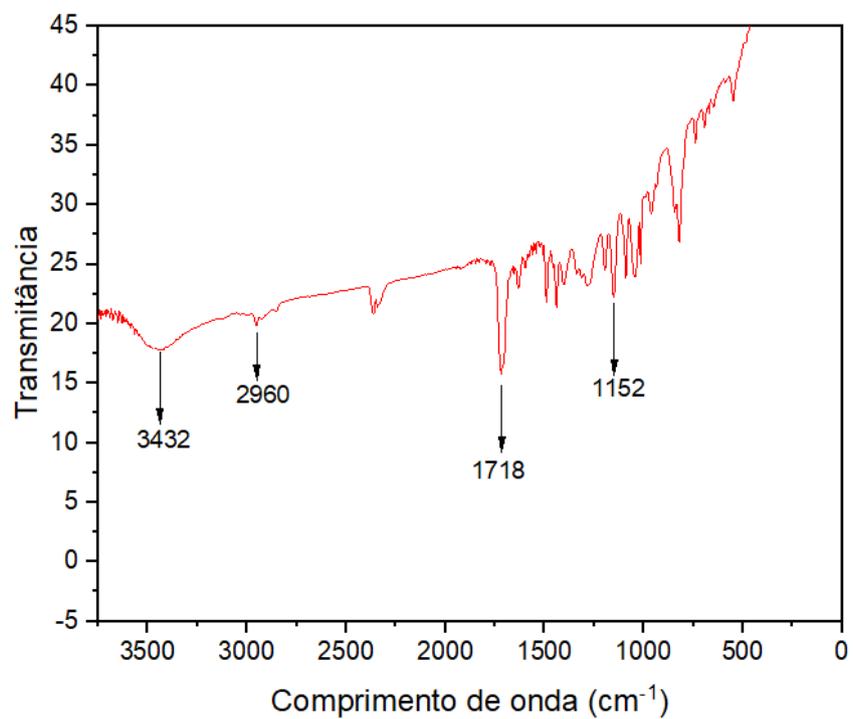
Espectro de IR (KBr) do metil 2-((4-fluorofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3f**).



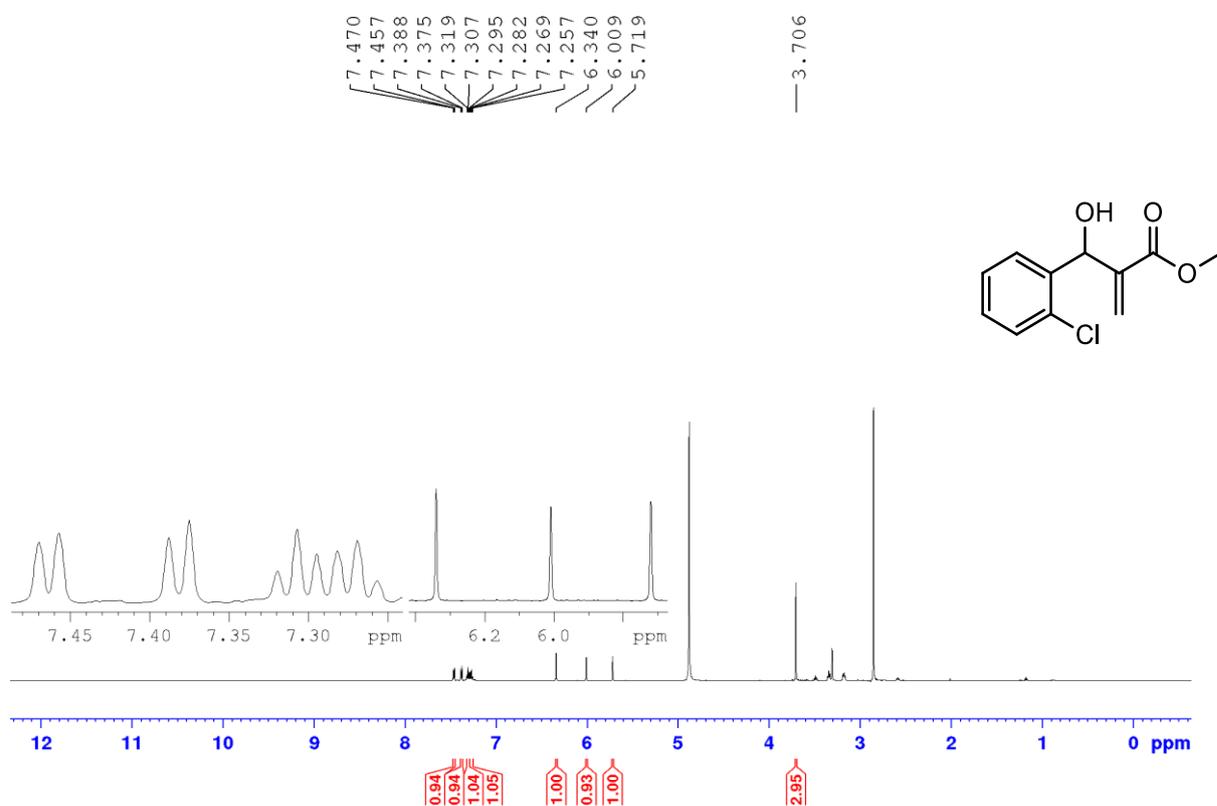
Espectro de RMN de ^1H do metil 2-((4-clorofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3g**) (600 MHz; CD_3OD).



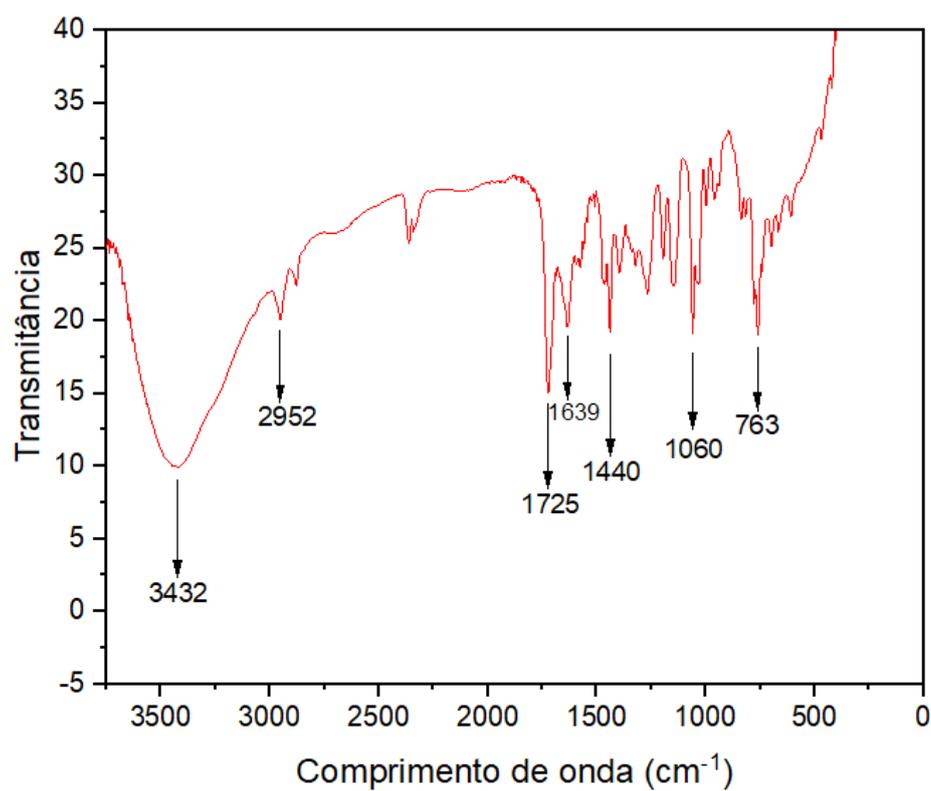
Espectro de IR (KBr) do do metil 2-((4-clorofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3g**).



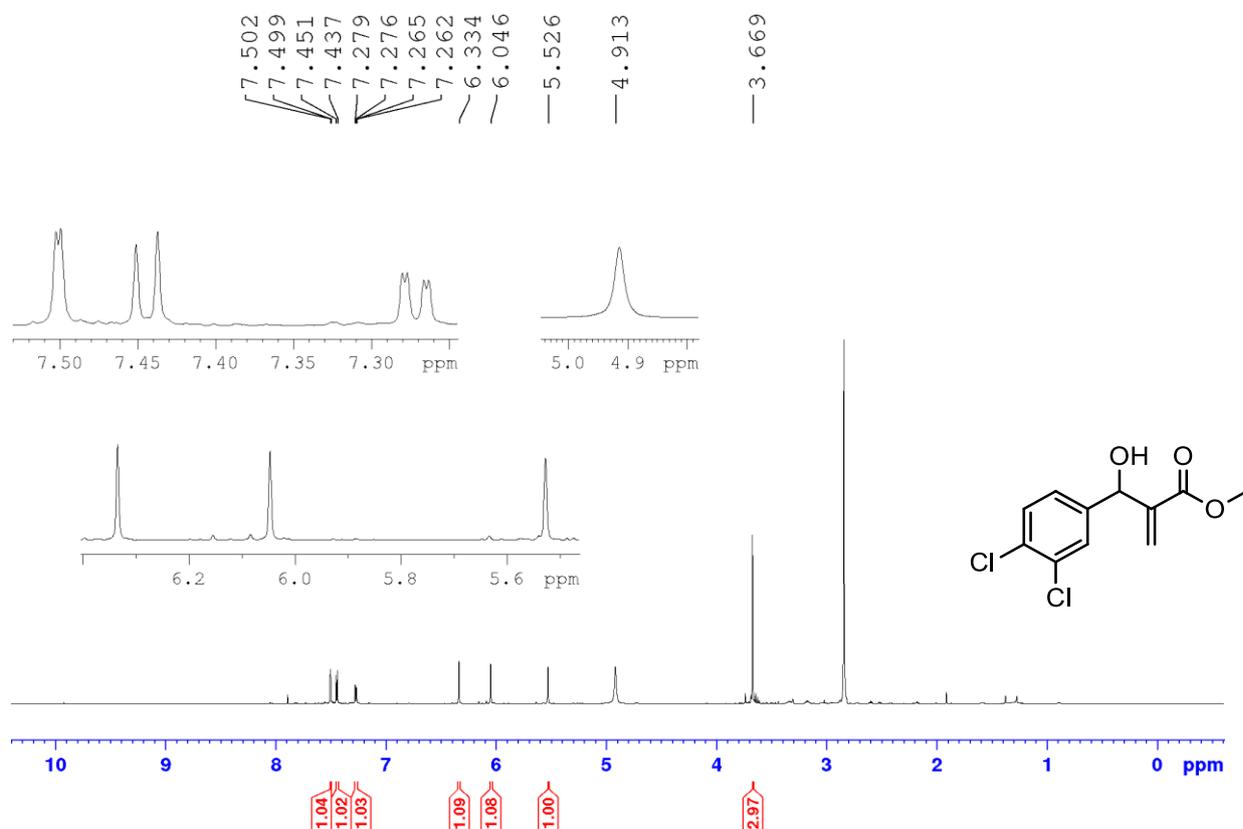
Espectro de RMN de ^1H do meil 2-((2-clorofeny)(hidroxi)metil)acrilato (**3h**) (600 MHz; CD_3OD).



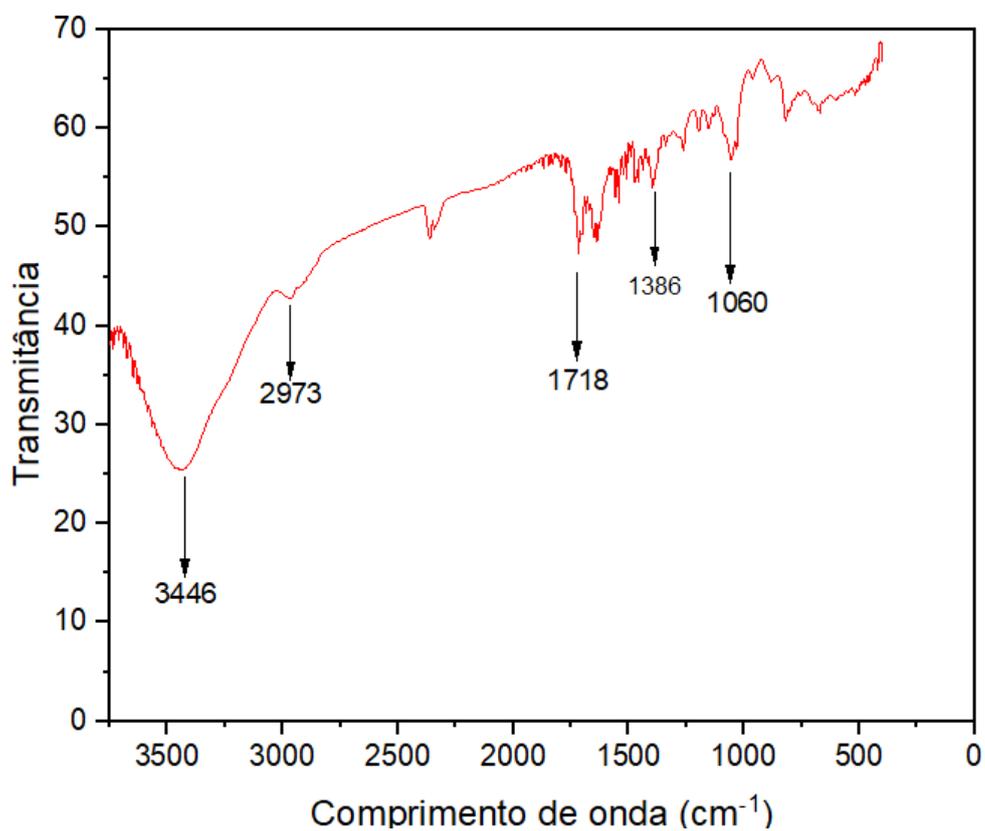
Espectro de IR (KBr) do meil 2-((2-clorofeny)(hidroxi)metil)acrilato (**3h**)

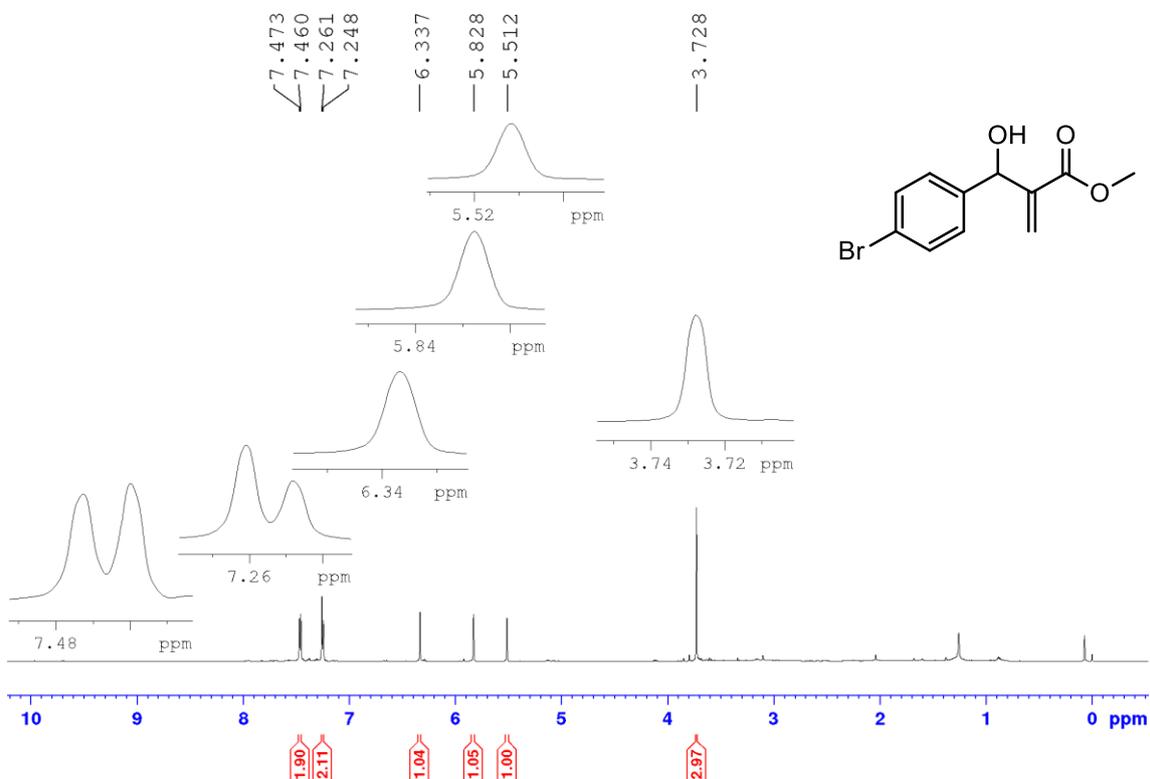
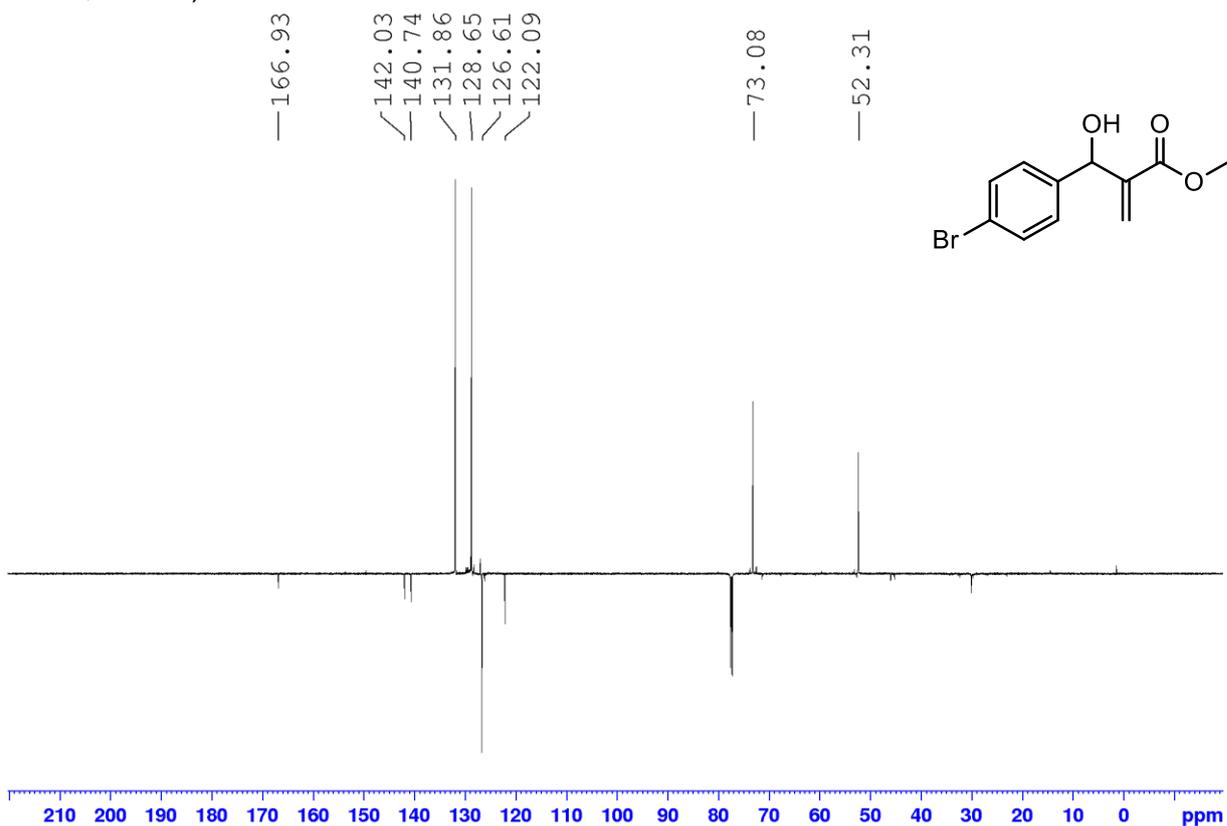


Espectro de RMN de ^1H do metil 2-((3,4-diclorofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3i**) (600 MHz; CD_3OD).

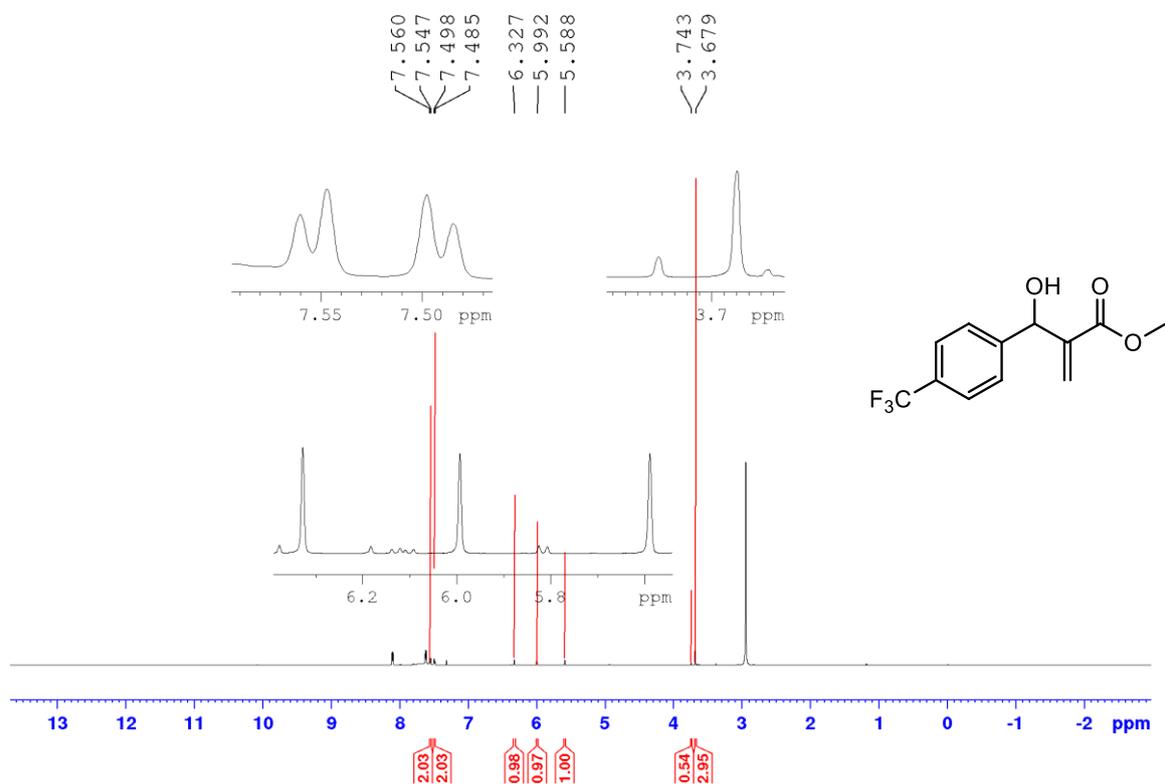


Espectro de IR (KBr) do metil 2-((3,4-diclorofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3i**).

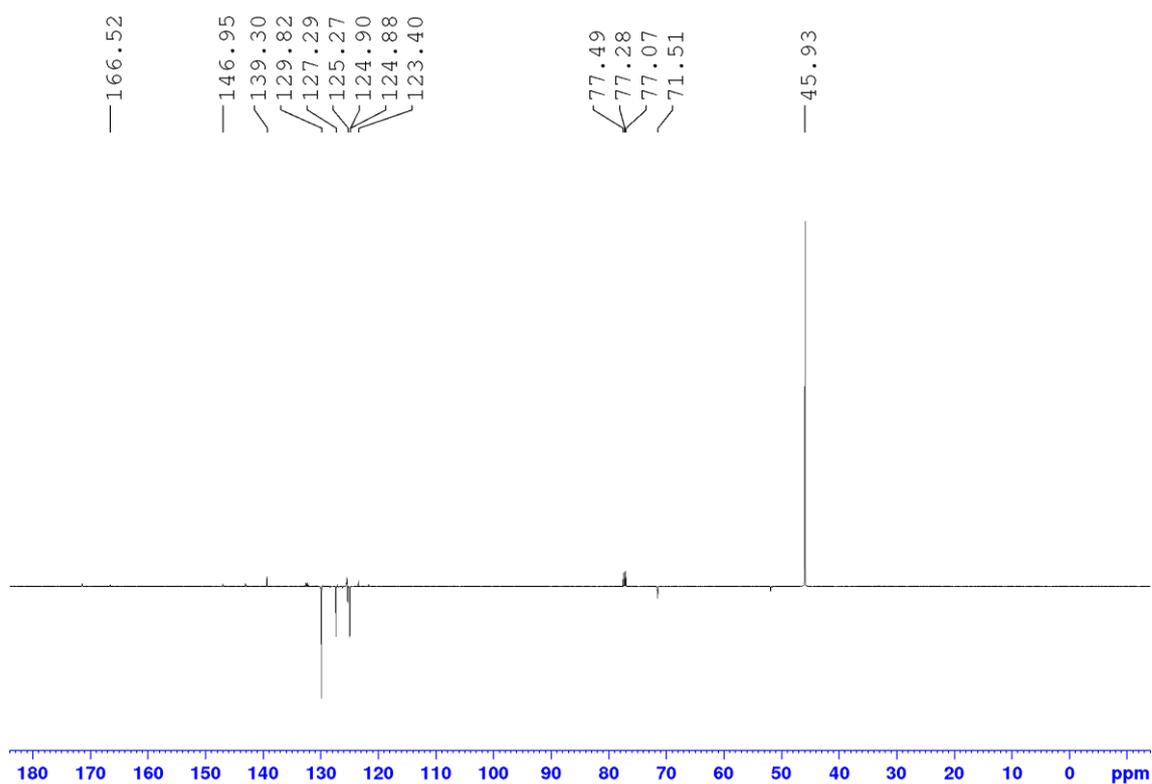


Espectro de RMN de ^1H do metil 2-((4-bromofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3j**) (600Espectro de RMN de ^{13}C do metil 2-((4-cianofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**3j**) (600 MHz; CDCl_3).

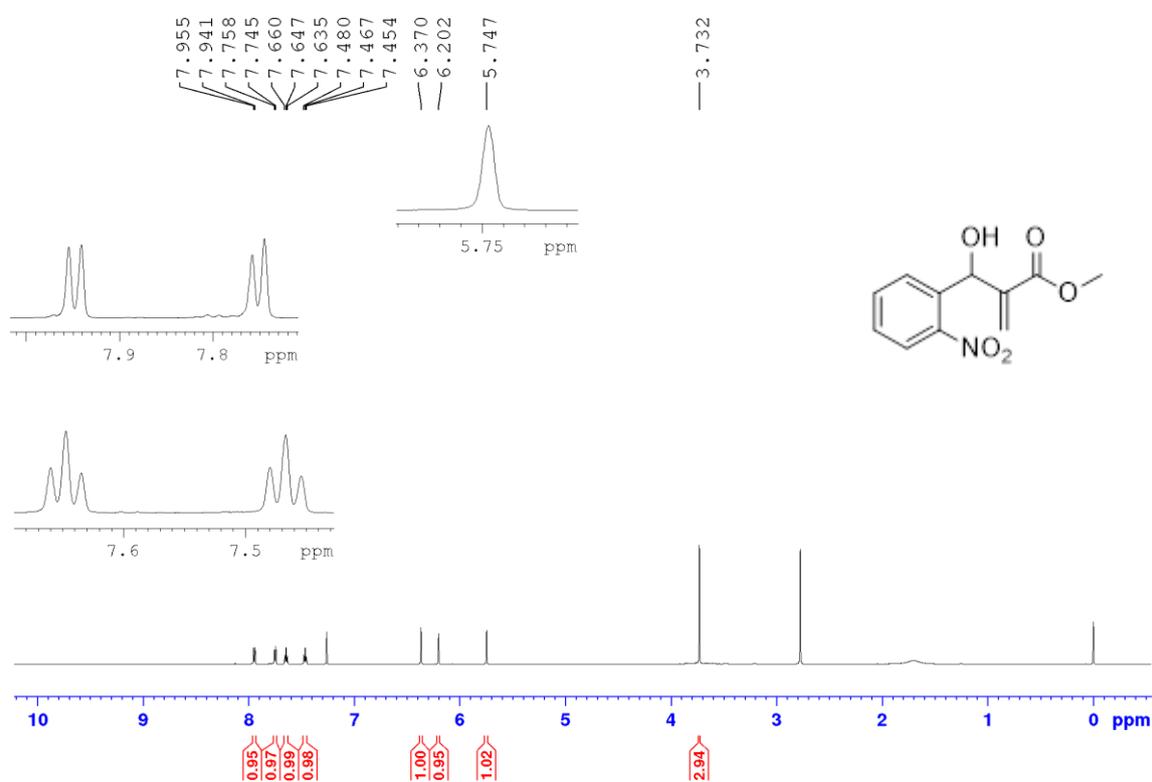
Espectro de RMN de ^1H metil 2-(hidroxi(4-(trifluorometil)fenil)metil)acrilato (**3k**) (600 MHz; CD_3OD).



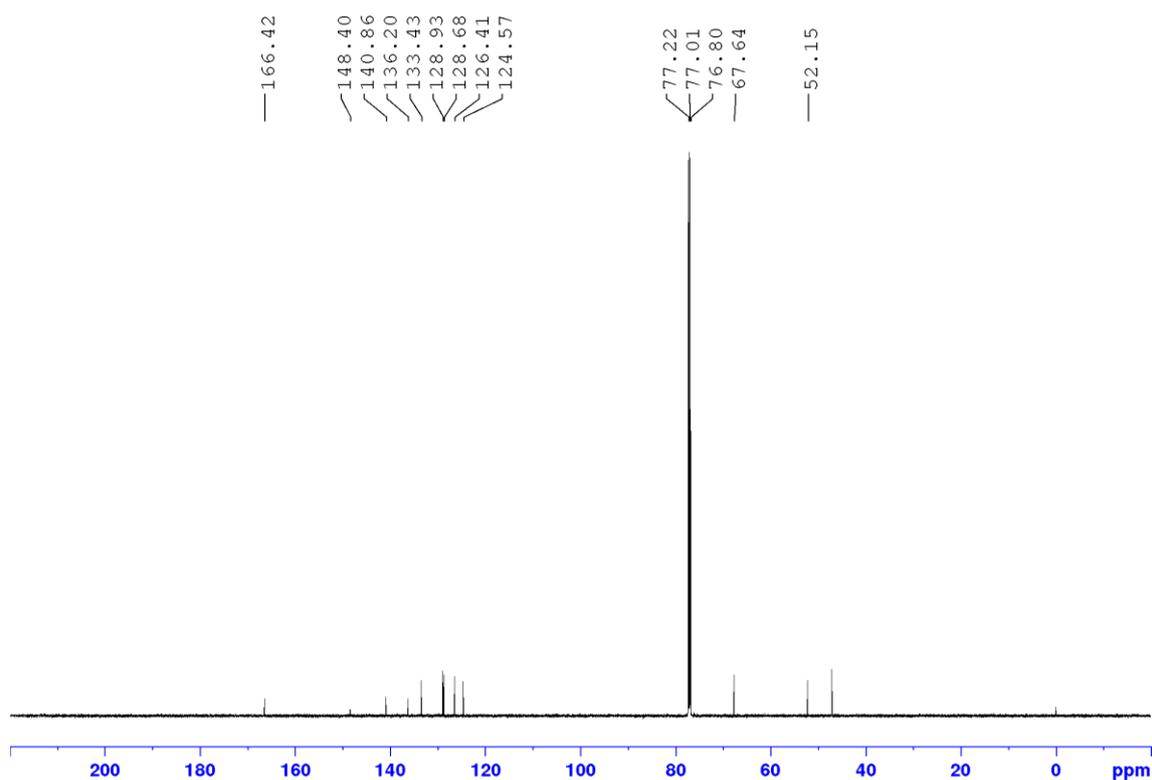
Espectro de RMN de ^{13}C do metil 2-(hidroxi(4-(trifluorometil)fenil)metil)acrilato (**3k**) (600)

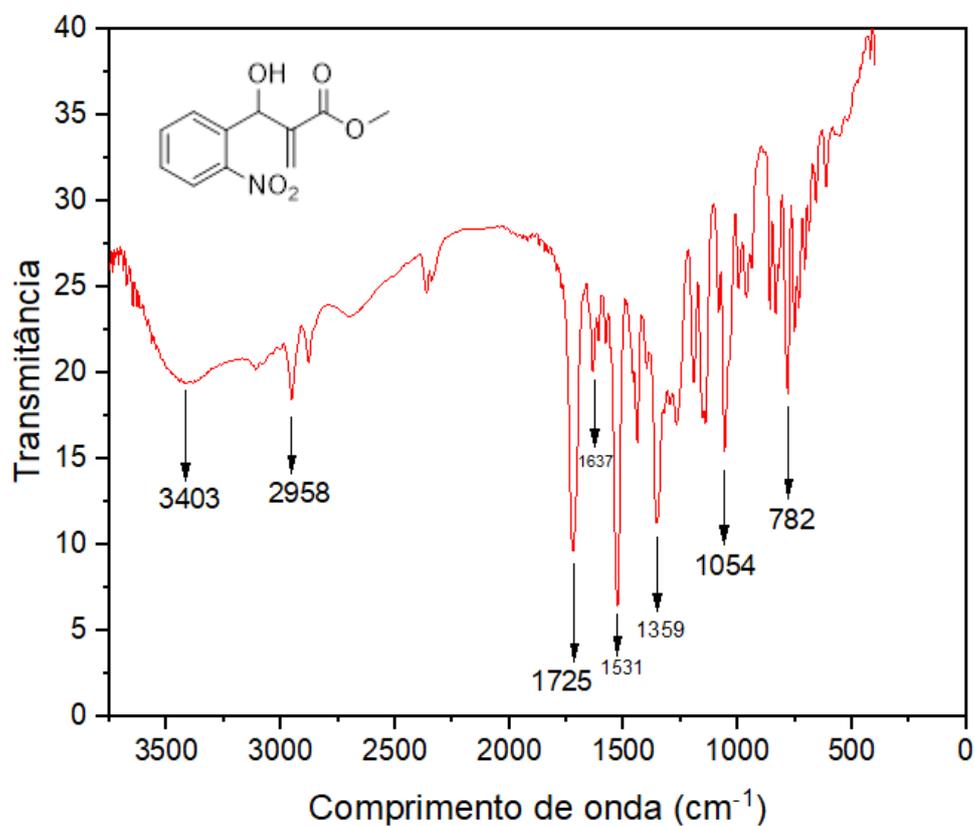
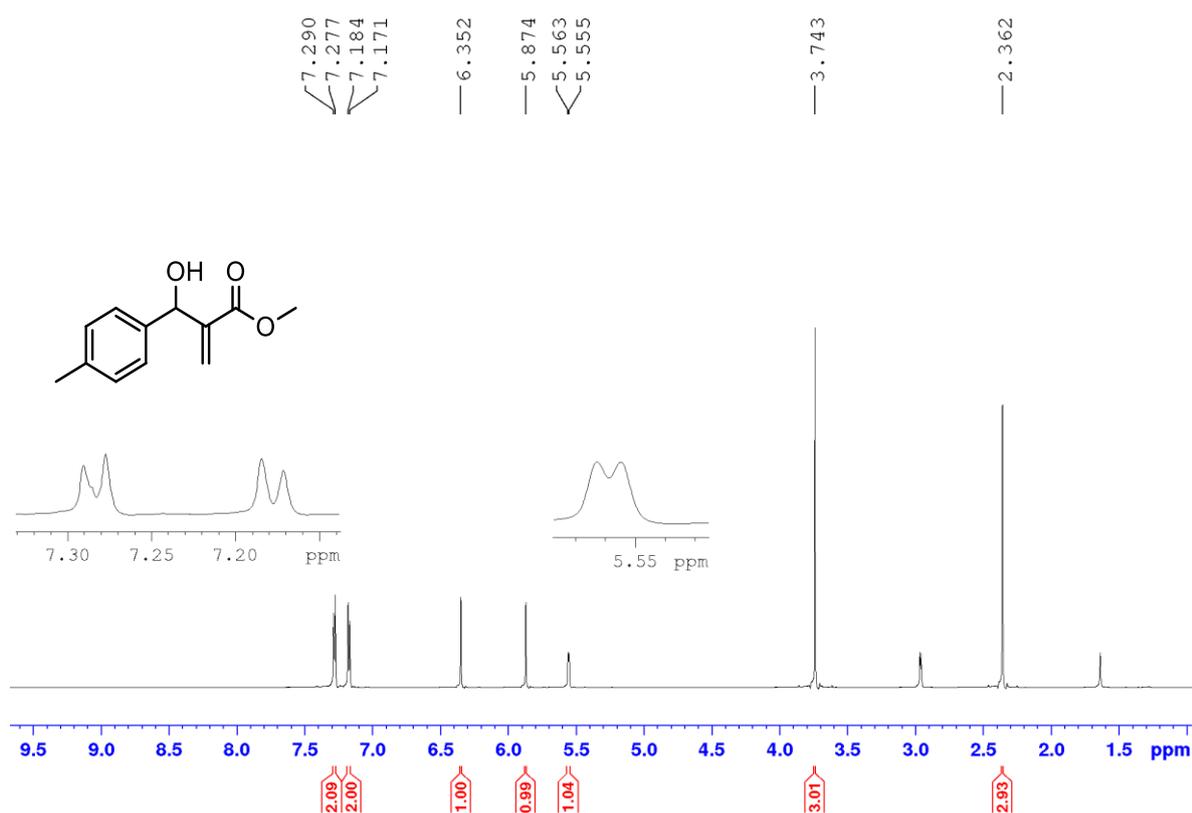


Espectro de RMN de ^1H metil 2-(hidroxi(4-(trifluorometil)fenil)metil)acrilato (**3I**) (600 MHz; CD_3OD).

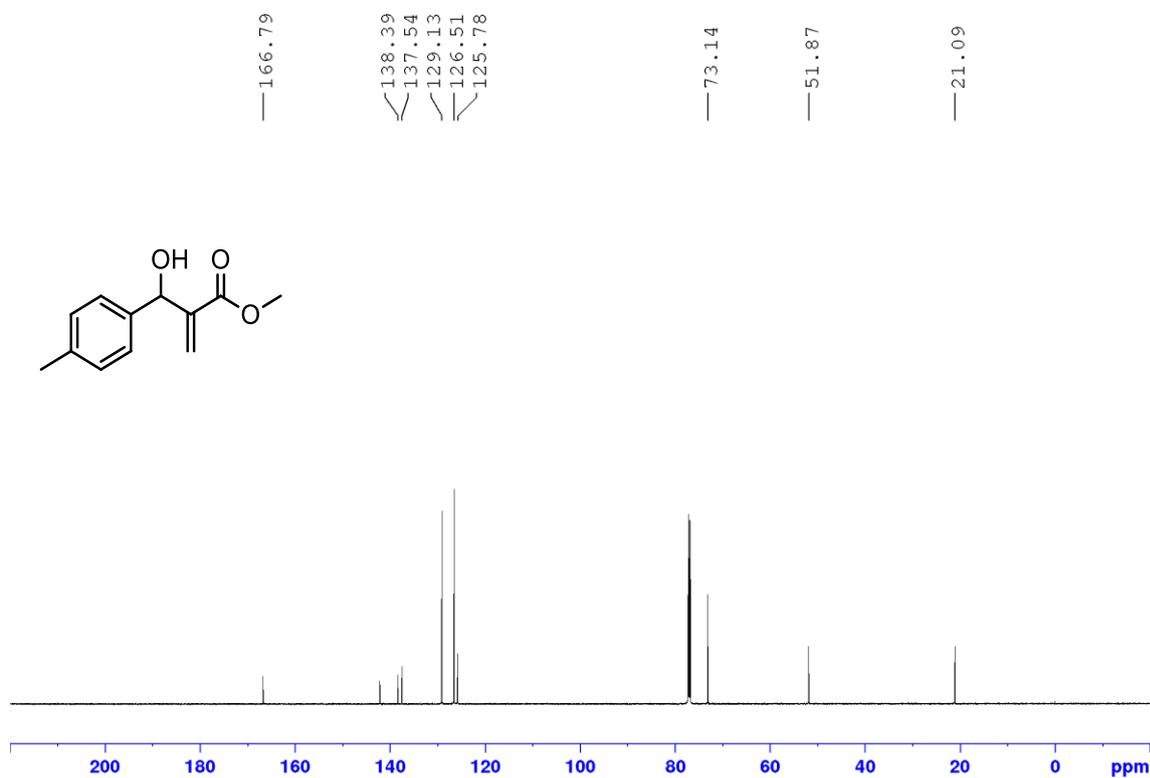


Espectro de RMN de ^{13}C do metil 2-(hidroxi(2-nitrofenil)metil)acrilato (**3I**) (100 MHz; CD_3OD).

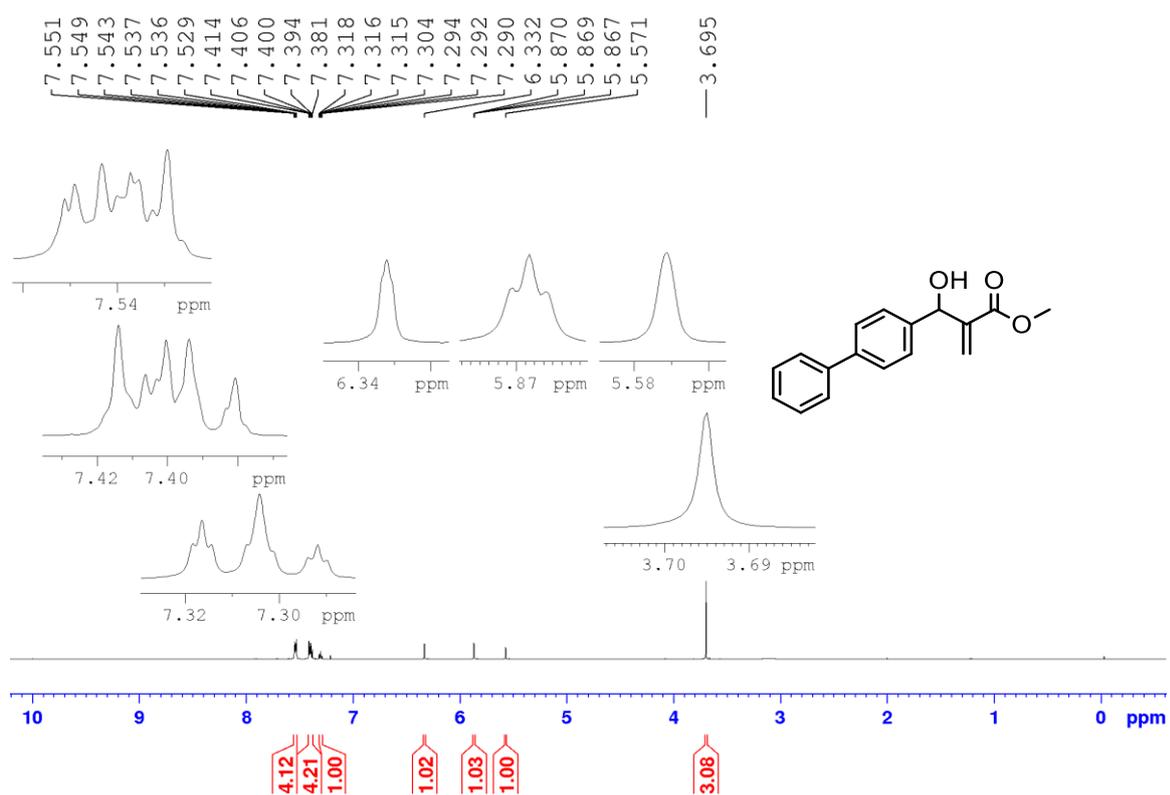


Espectro de IR (KBr) do metil 2-(hidroxi(2-nitrofenil)metil)acrilato (**3l**).Espectro de RMN de ¹H do metil 2-(hidroxi(p-tolil)metil)acrilato (**3m**) (600 MHz; CDCl₃).

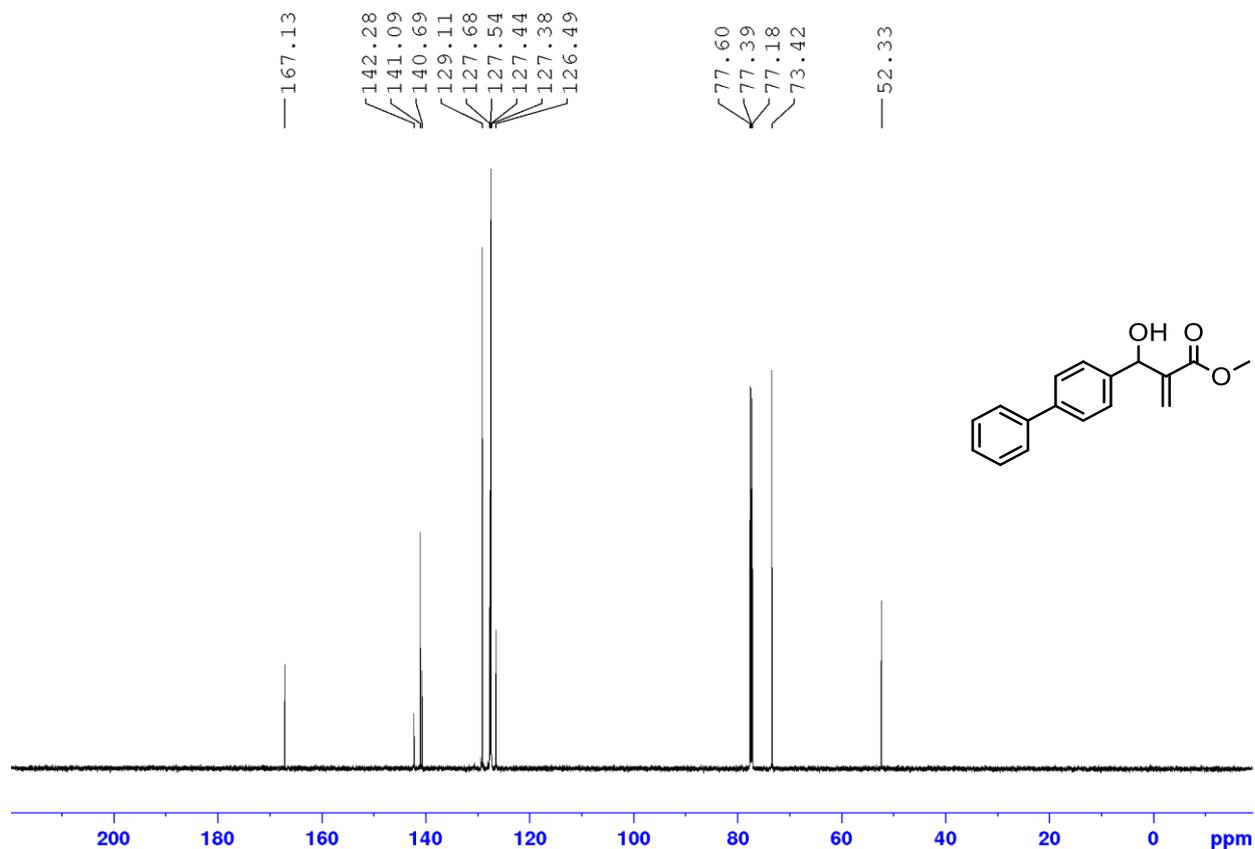
Espectro de RMN de ^{13}C do metil 2-(hidroxi(p-tolil)metil)acrilato (**3m**) (100 MHz; CDCl_3).



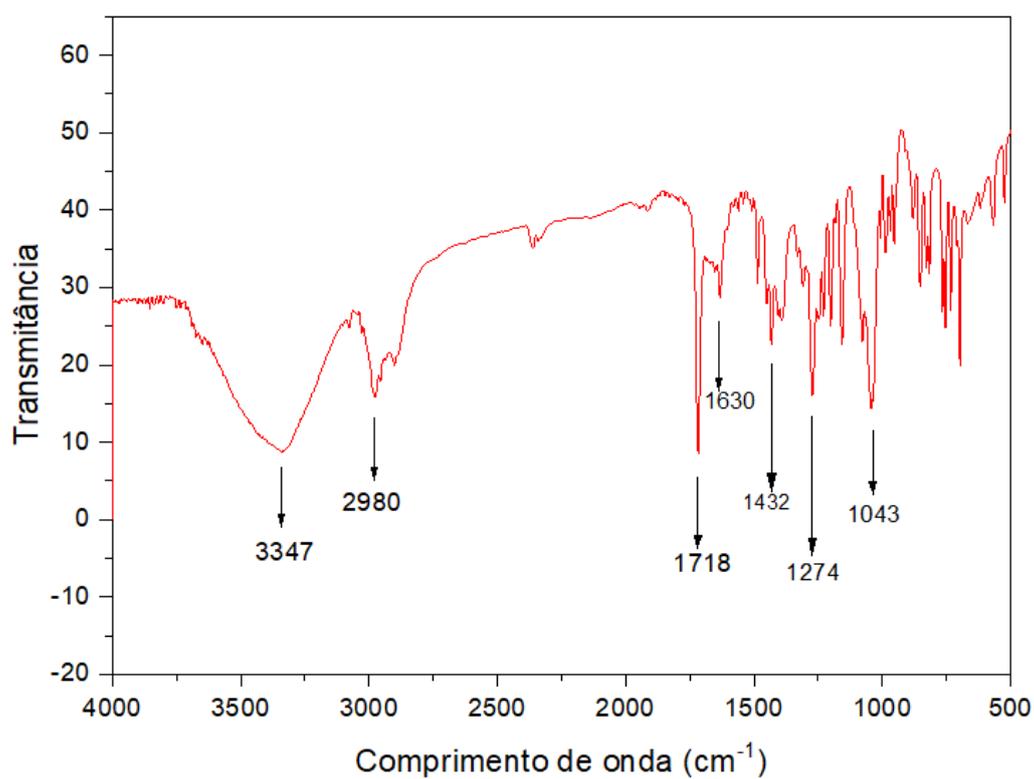
Espectro de RMN de ^1H do metil 2-([1,1'-bifenil]-4-il(hidroxi)metil)acrilato (**3n**) (600 MHz; CDCl_3).



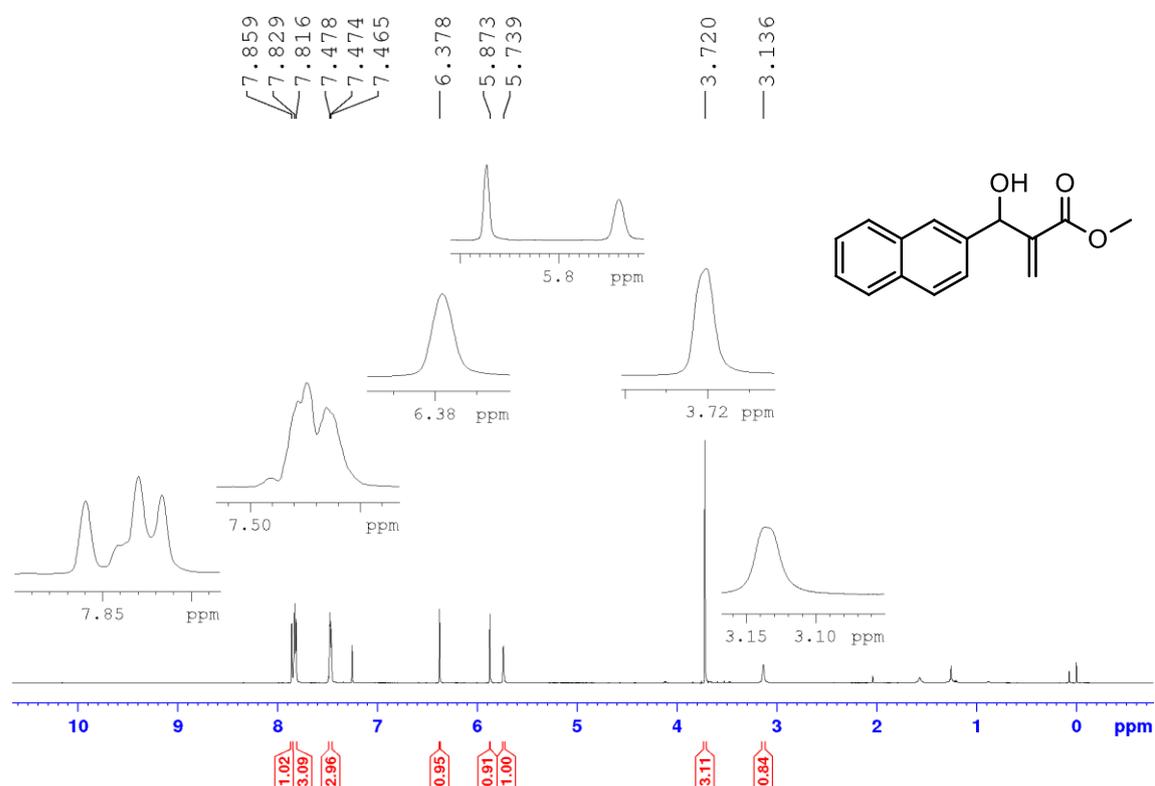
Espectro de RMN de ^{13}C do metil 2-([1,1'-bifenil]-4-il(hidroxi)metil)acrilato (**3n**) (100 MHz; CDCl_3).



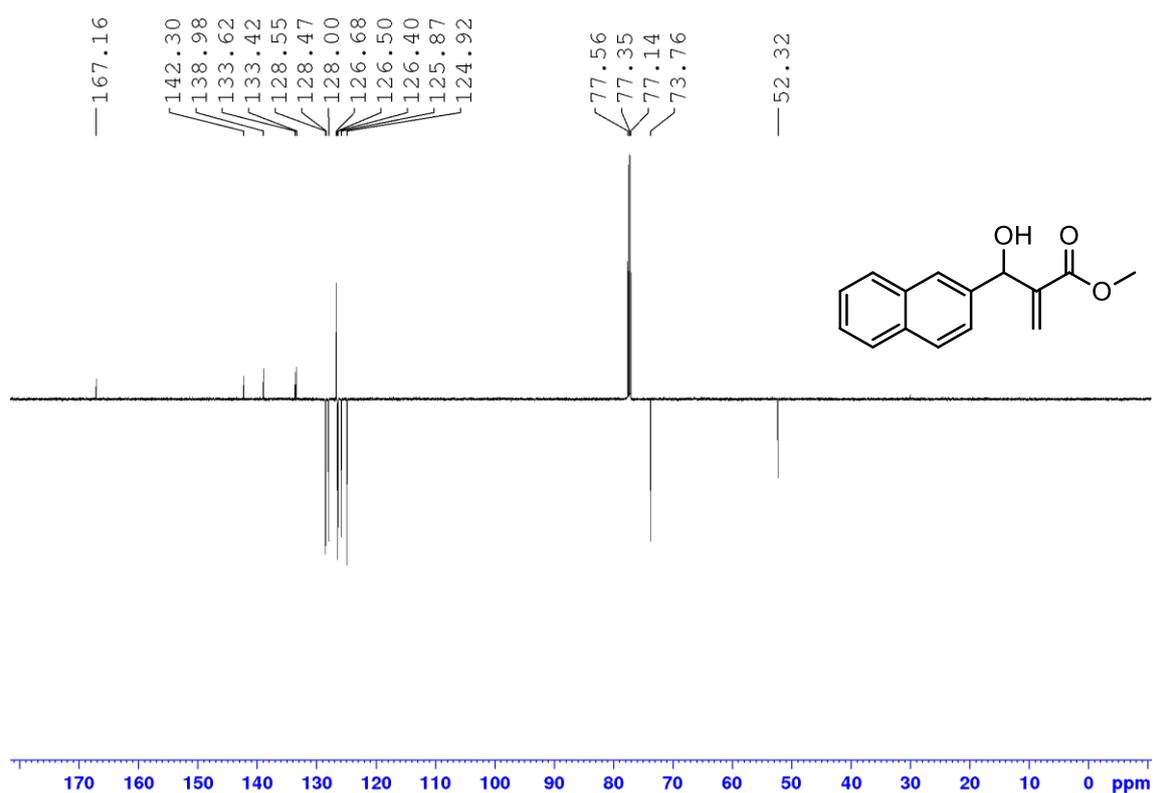
Espectro de IR (KBr) do metil 2-([1,1'-bifenil]-4-il(hidroxi)metil)acrilato (**3n**).



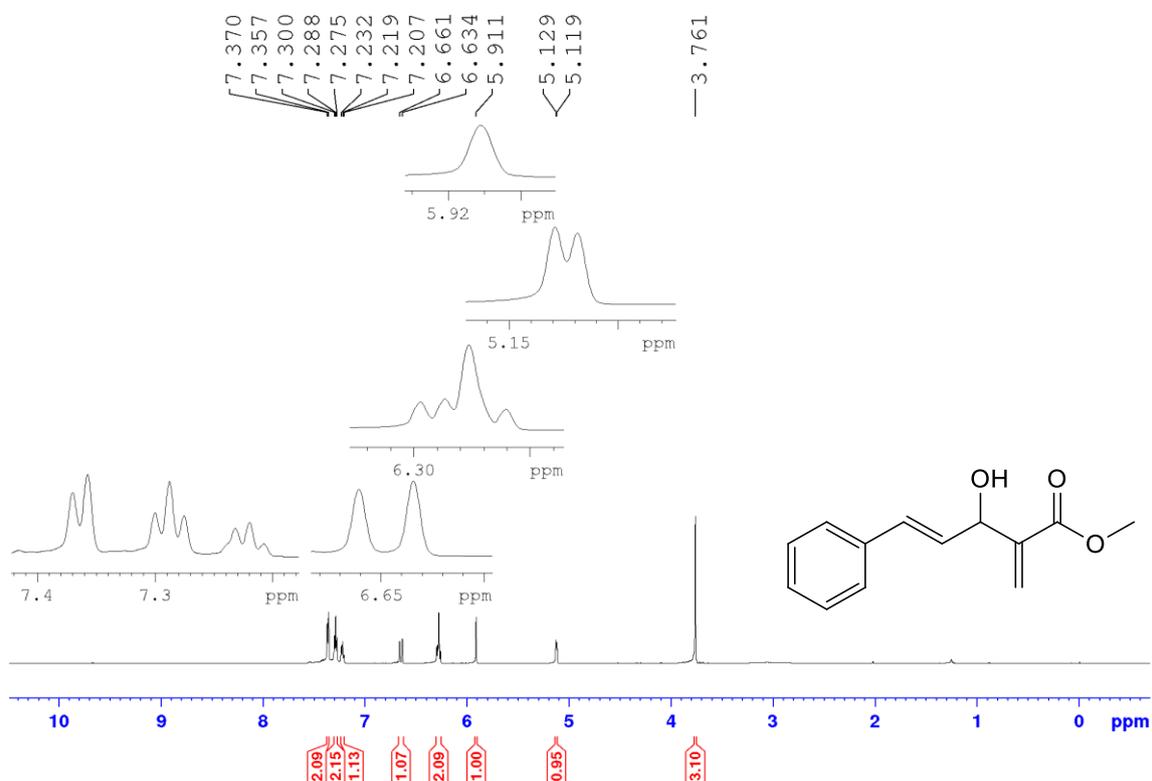
Espectro de RMN de ^1H do metil 2-(hidroxi(naftalen-2-il)metil)acrilato (**3o**) (600 MHz; CDCl_3).



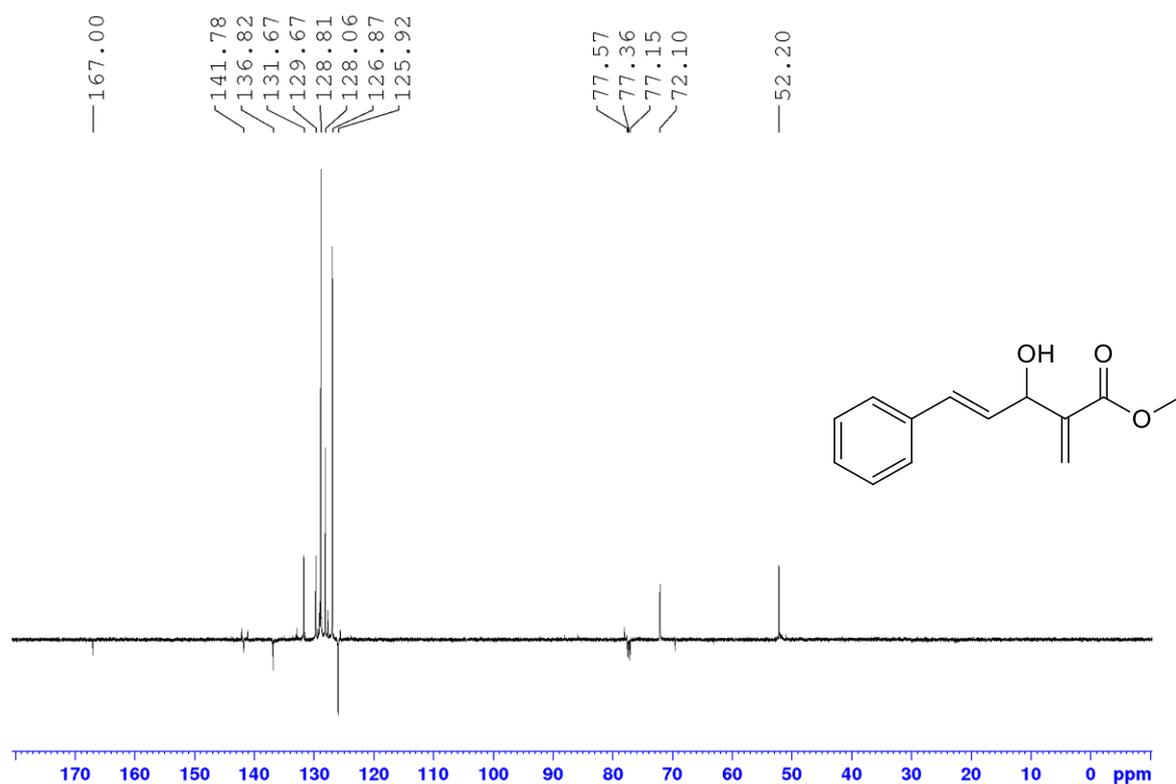
Espectro de RMN de ^{13}C do metil 2-(hidroxi(naftalen-2-il)metil)acrilato (**3o**) (100 MHz; CDCl_3).



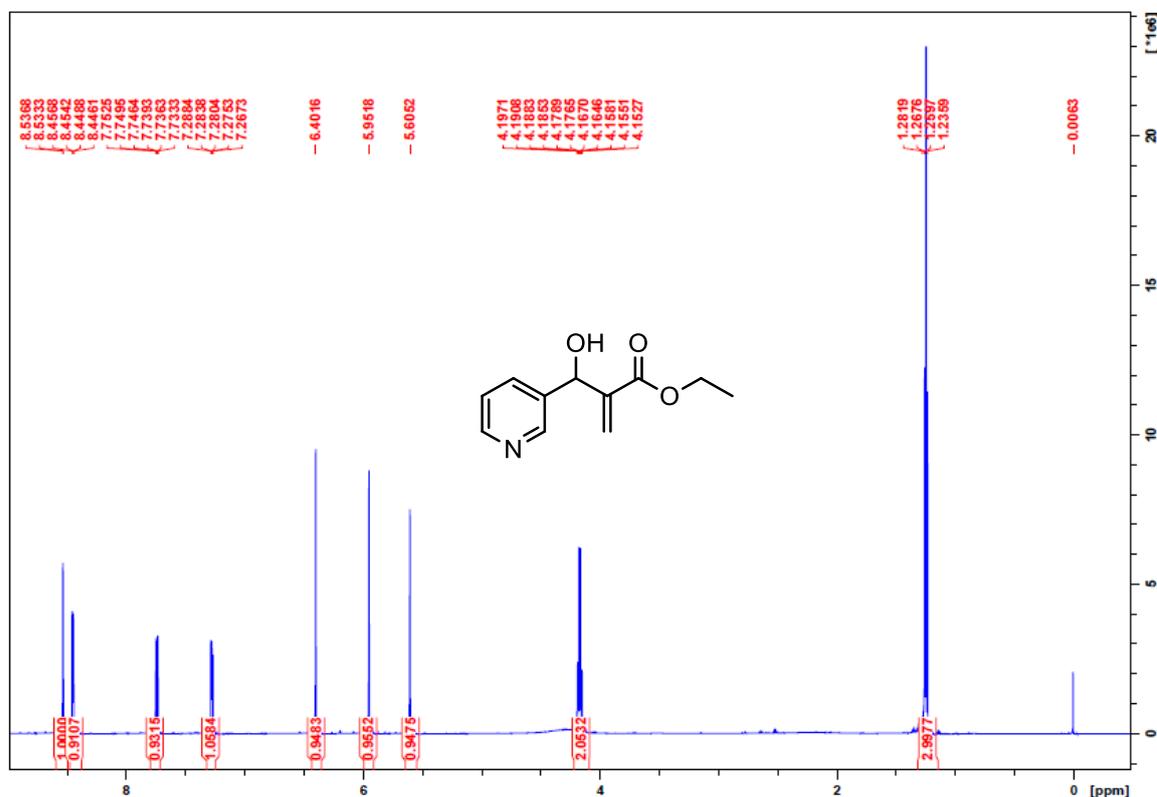
Espectro de RMN de ^1H do (E)-metil 3-hidroxi-2-metileno-5-fenilpent-4-enoato (**3p**) (600 MHz; CDCl_3).



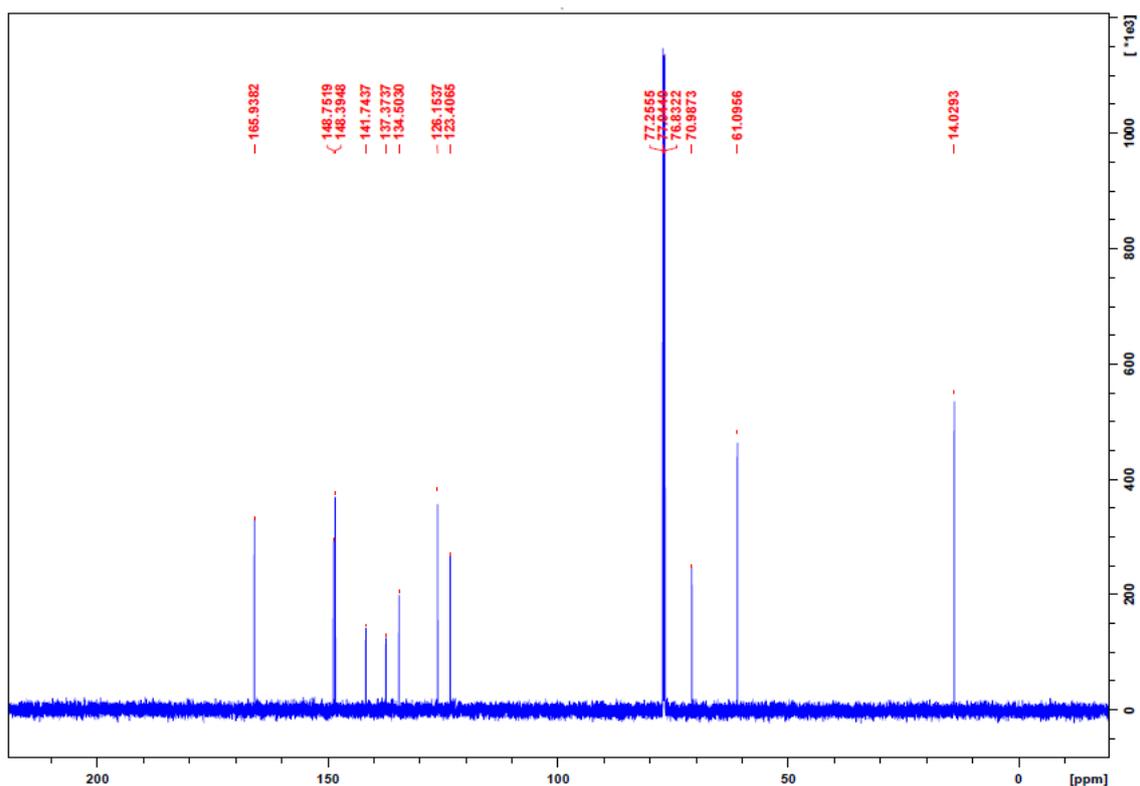
Espectro de RMN de ^{13}C do (E)-metil 3-hidroxi-2-metileno-5-fenilpent-4-enoato (**3p**) (600 MHz; CDCl_3).



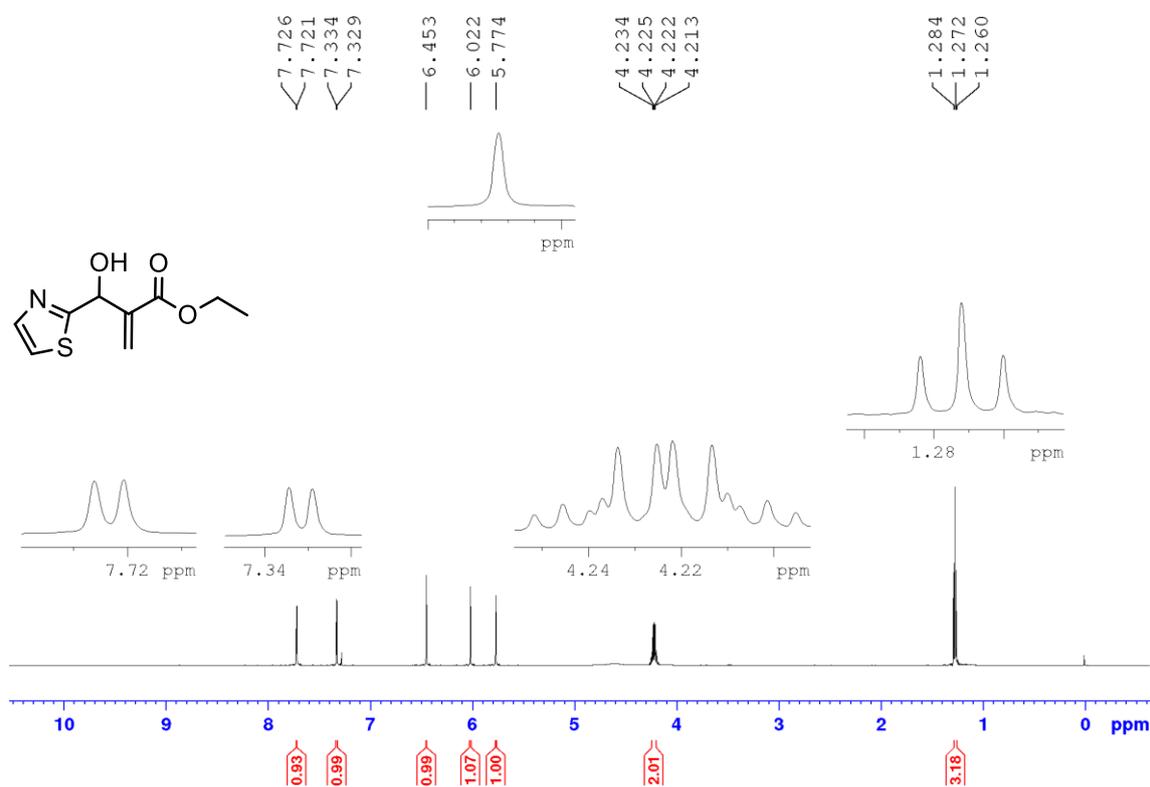
Espectro de RMN de ^1H do etil 2-(hidroxi(piridin-3-il)metil)acrilato (**4q**) (600 MHz; CDCl_3).



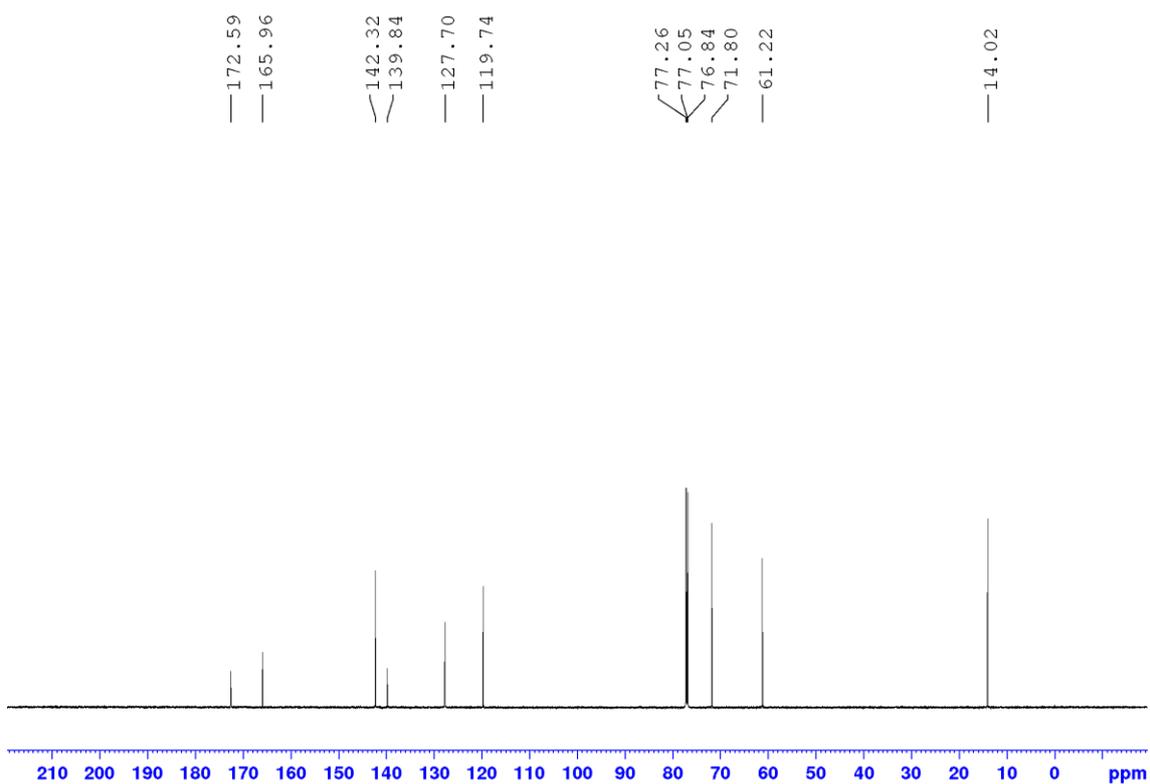
Espectro de RMN de ^{13}C do etil 2-(hidroxi(piridin-3-il)metil)acrilato (**4q**) (600 MHz; CDCl_3).



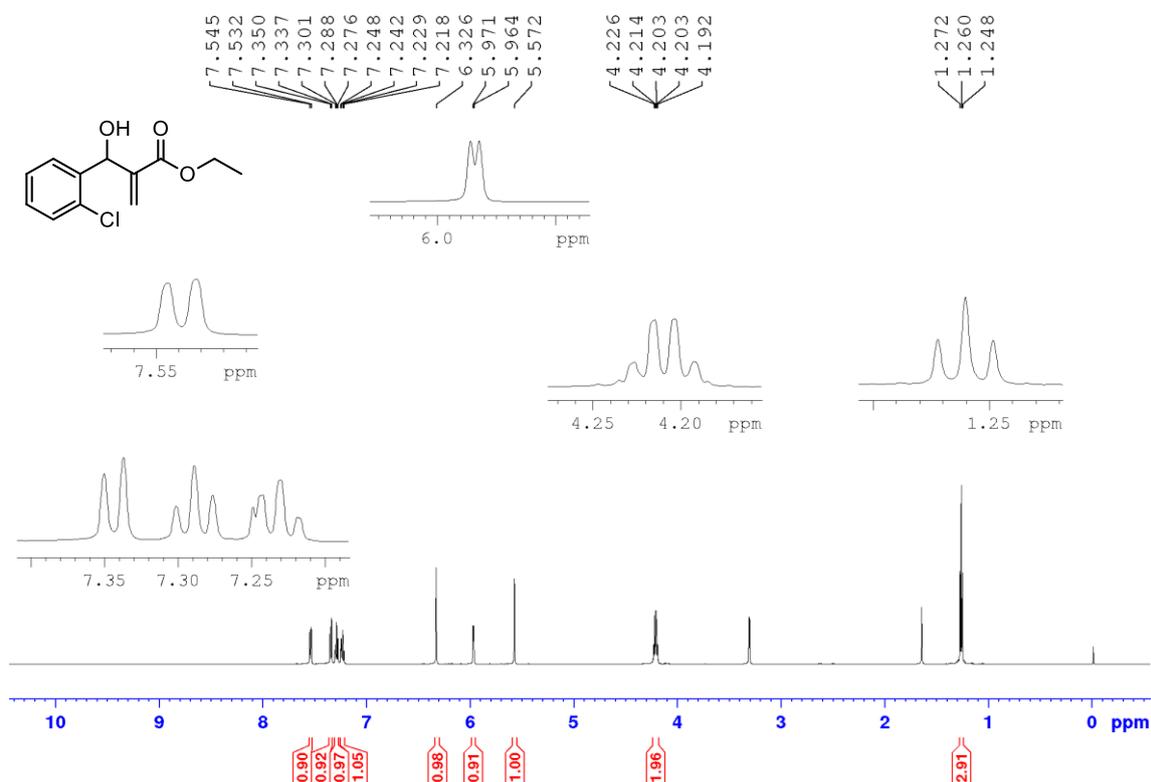
Espectro de RMN de ^{13}C do etil 2-(hidroxi(tiazol-2-il)metil)acrilato (**4r**) (600 MHz; CDCl_3).



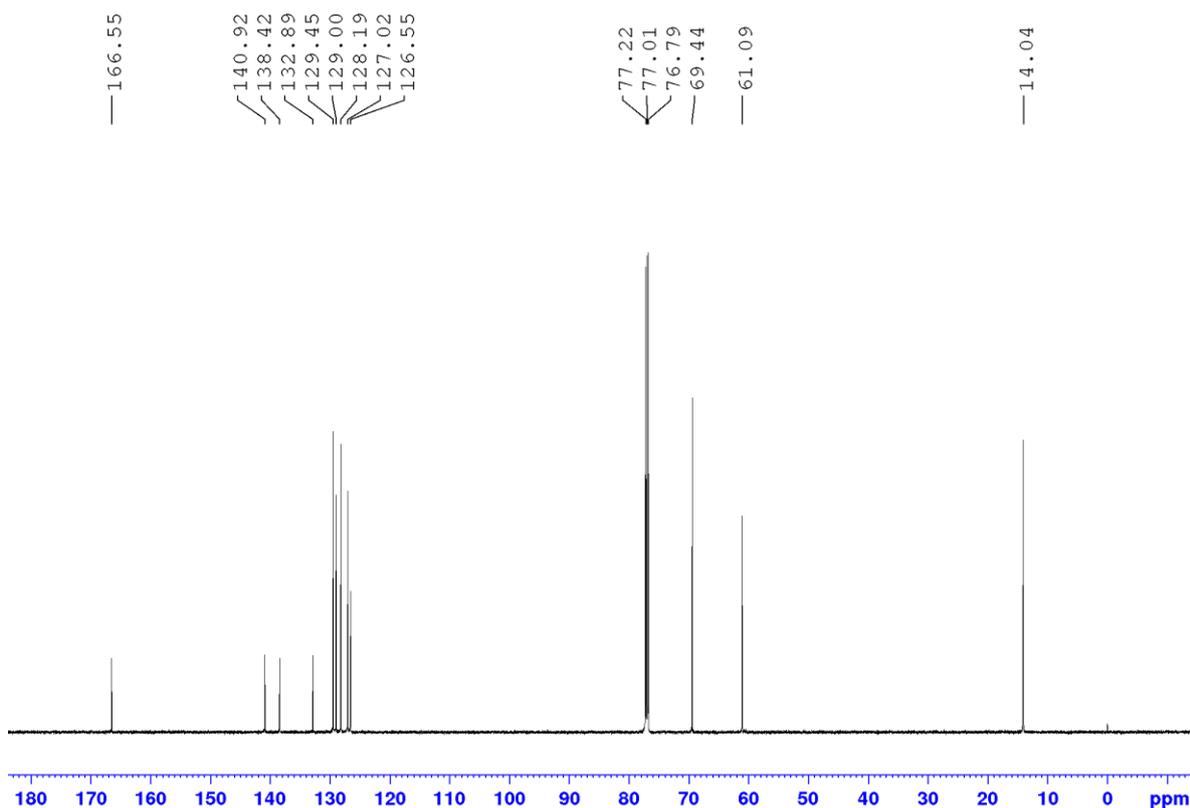
Espectro de RMN de ^{13}C do etil 2-(hidroxi(tiazol-2-il)metil)acrilato (**4r**) (600 MHz; CDCl_3).

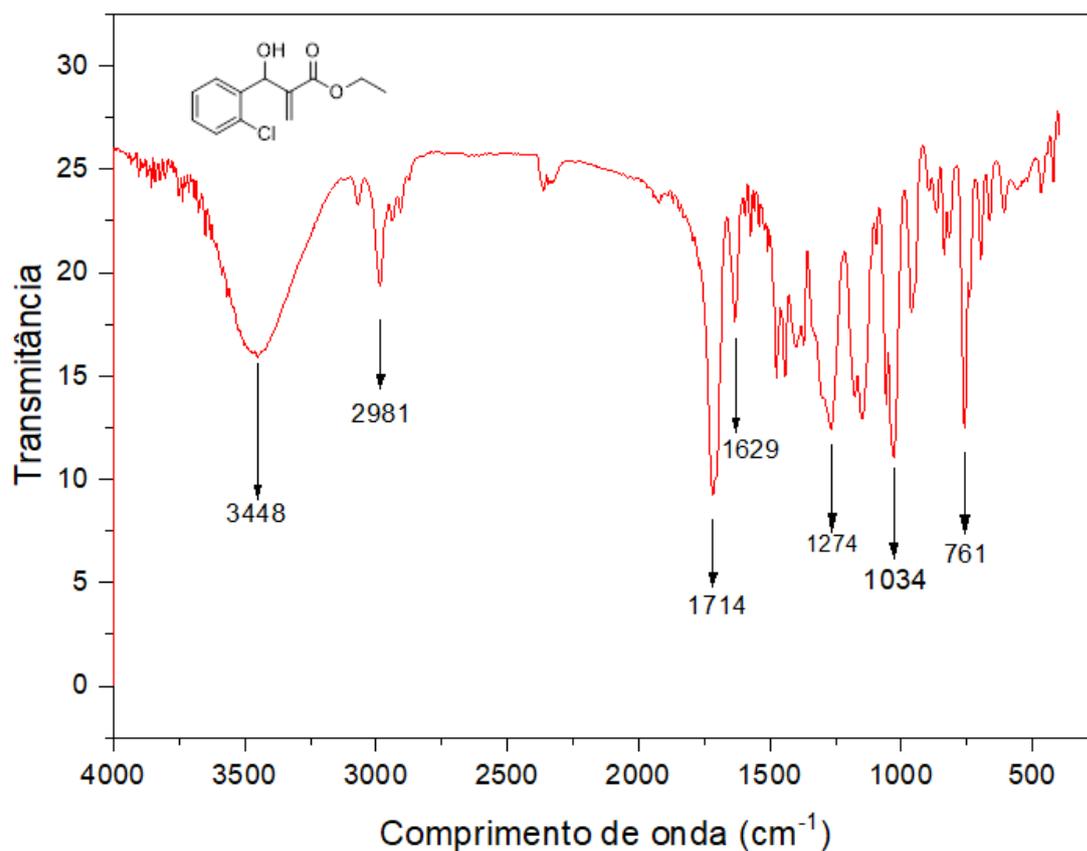
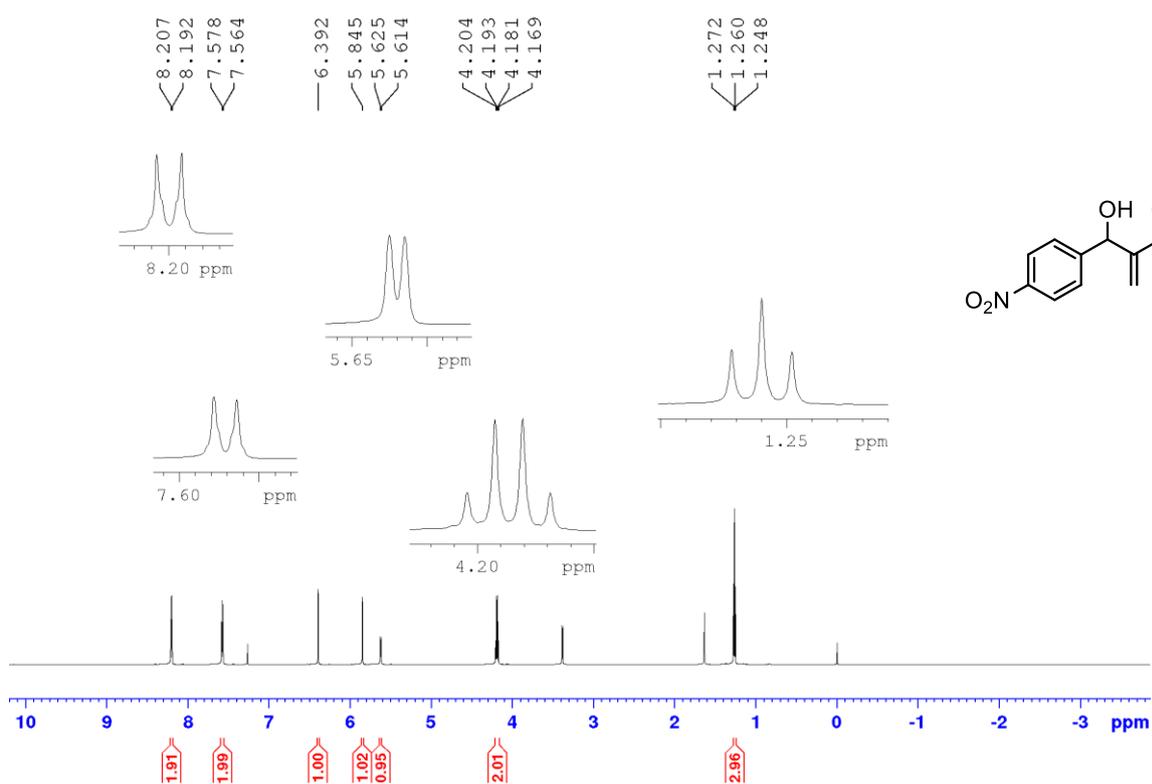


Espectro de RMN de ^1H do etil 2-((2-clorofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**4s**) (600 MHz; CDCl_3).

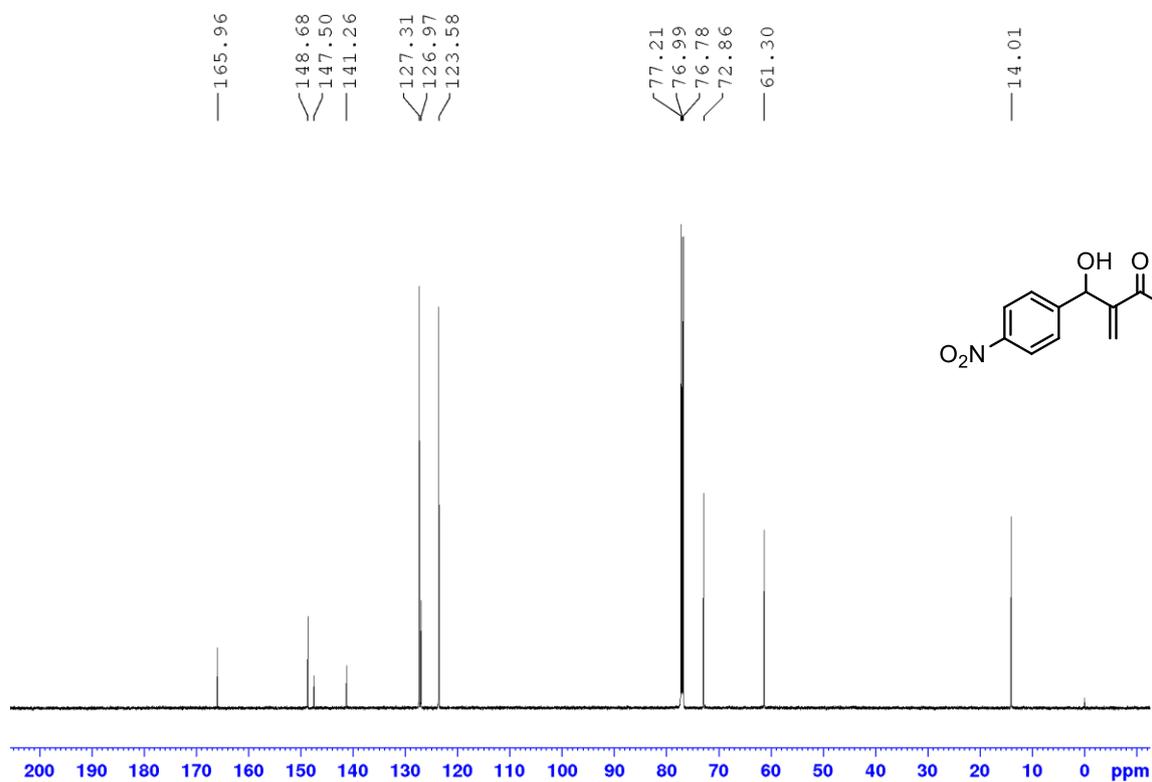


Espectro de RMN de ^{13}C do etil 2-((2-clorofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**4s**) (600 MHz; CDCl_3).

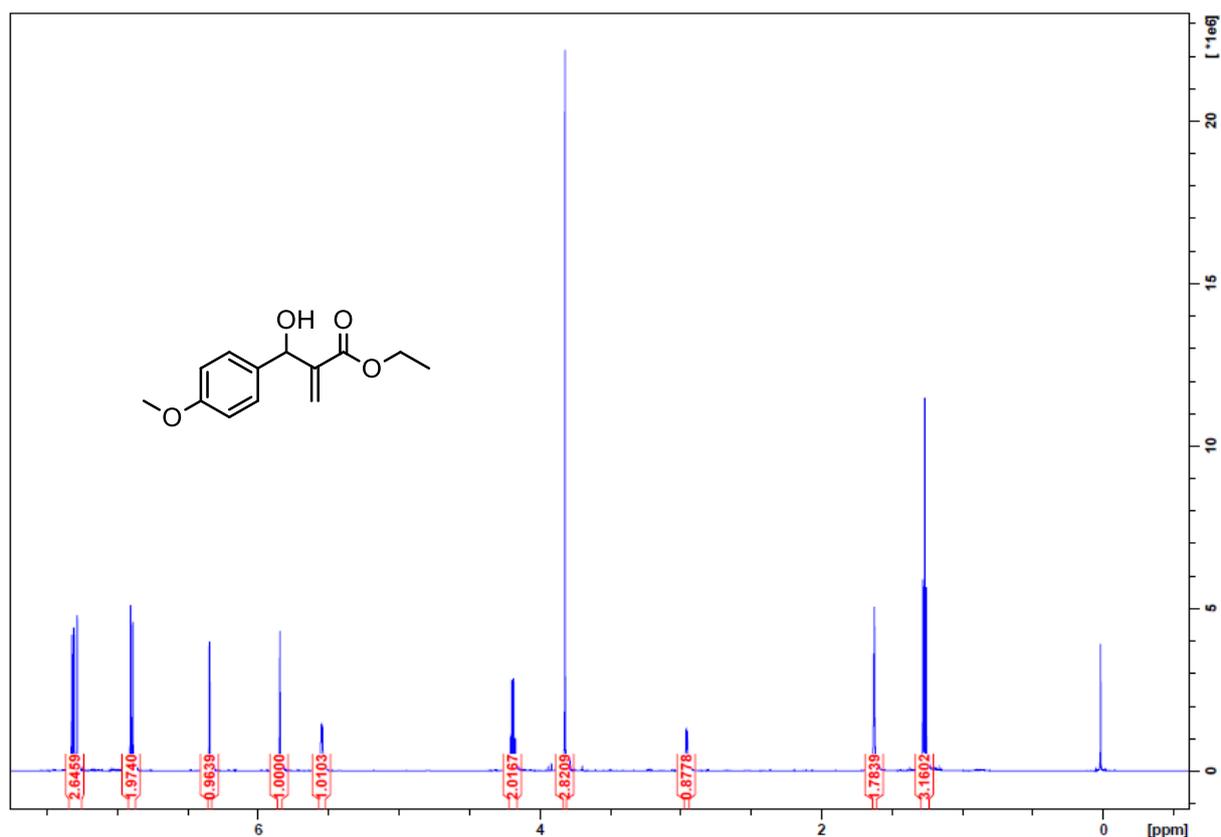


Espectro de IR (KBr) do etil 2-((2-clorofenil)(hidroxi)metil)acrilato (**4s**).Espectro de RMN de ^1H do etil 2-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)acrilato (**4t**) (600 MHz; CDCl_3).

Espectro de RMN de ^{13}C do etil 2-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)acrilato (**4t**) (600 MHz; CDCl_3).



Espectro de RMN de ^1H do etil 2-(hidroxi(4-metoxifenil)metyl)acrilato (**4u**) (600 MHz; CDCl_3).



Espectro de RMN de ^{13}C do etil 2-(hidroxi(4-metoxifenil)metyl)acrilato (**4u**) (600 MHz; CDCl_3).

