



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE E
BIOLÓGICAS

FERNANDA HOHANA ALMEIDA E SÁ

TRIAGEM VIRTUAL NA BUSCA DE POTENCIAIS AGENTES PARA O
CONTROLE DE *Aedes aegypti*

PETROLINA-PE

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE E
BIOLÓGICAS

FERNANDA HOHANA ALMEIDA E SÁ

TRIAGEM VIRTUAL NA BUSCA DE POTENCIAIS AGENTES PARA O
CONTROLE DE *Aedes aegypti*

Material apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Petrolina Centro, como requisito para qualificação e obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Beserra de Alencar Filho

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Gabriella Lemos de Azevedo Maia

Petrolina-PE

2022

S111t Sá, Fernanda Hohana Almeida e
Triagem virtual na busca de potenciais agentes para o controle
de *Aedes aegypti* / Fernanda Hohana Almeida e Sá. - Petrolina -
PE, 2022.
xiii, 64 f.: il. ; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde e Biológicas) -
Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina,
Petrolina-PE, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Beserra de Alencar Filho.

1. Mosquitos vetores. 2. *Aedes aegypti*. 3. Docking molecular. 4.
Hormônio juvenil. I. Título. II. Alencar Filho, Edilson Beserra de. III.
Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 614.4323

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas SIBI/UNIVASF
Bibliotecária: Adriana Santos Magalhães CRB-4/2275

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS DA SAÚDE E BIOLÓGICAS**

FOLHA DE APROVAÇÃO

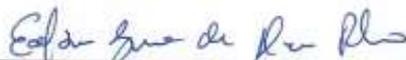
FERNANDA HOHANA ALMEIDA E SÁ

**TRIAGEM VIRTUAL NA BUSCA DE POTENCIAIS AGENTES PARA O CONTROLE
DE Aedes Aegypti**

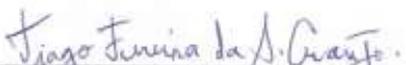
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências com ênfase na linha de pesquisa: Biodiversidade, Tecnologia e Recursos Naturais, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: 09 de setembro de 2022

Banca Examinadora



Edilson Beserra de Alencar Filho, Doutor
Universidade Federal do Vale do São Francisco – Univasf



Tiago Ferreira da Silva Araújo, Doutor
Universidade Federal do Vale do São Francisco – Univasf



Rodrigo Pereira Ramos, Doutor
Universidade Federal do Vale do São Francisco – Univasf

Agradecimentos

Encerrar ciclos nunca é uma tarefa fácil, agora um dos ciclos mais importantes da minha vida chega próximo ao fim, sem dúvidas sou grata a muitas pessoas que fizeram parte desse processo, peças essenciais para que o caminho se tornasse um pouco menos difícil.

Agradeço primeiramente à Deus, meu refúgio e fortaleza em todos os momentos, inúmeras vezes em meio a momentos de dificuldade consegui sentir a sua presença, seu cuidado e sua grandiosidade nos meus dias.

Aos meus pais, em meio a tantos empecilhos e lutas diárias, eles me deram tudo que precisava para trilhar a minha própria história, amor, carinho, educação e valores familiares, constituintes do meu caráter e determinação. Sim...a filha de professora e pai autônomo, egressa da universidade pública, está cada vez mais perto de se tornar mestre.

Ao meu companheiro de vida, uma das surpresas boas que a vida me trouxe, prova do cuidado de Deus em minha vida, agradeço por entender minhas ausências, por segurar na minha mão e fazer acreditar que sim era possível, que nenhum momento de turbulência seria capaz de destruir meus sonhos, e que juntos conseguiríamos superar qualquer dificuldade. Tenho certeza de que essa será uma das muitas vitórias que partilharemos.

A minha irmã, meus avós e familiares, não podendo esquecer do meu filho de quatro patas Apolo e aos meus amigos, por serem minha base e meu refúgio em todos os momentos.

A todos os meus professores, atualmente em especial ao meu orientador Edilson, por toda paciência, dedicação e receptividade, mesmo em um momento atípico de pandemia se fez presente, e me ensinou a enxergar o quão amplo pode ser o mundo da química computacional.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial a Bárbara e Anderson, vocês me ensinaram que é possível partilhar conhecimentos de inúmeras formas, e mesmo distantes fisicamente, conseguimos desenvolver um bom trabalho em equipe.

A Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, por garantir o acesso ao ensino público de qualidade e ser uma ferramenta transformadora de vidas dentro do Vale do São Francisco. A FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco) pela concessão da bolsa, ao Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde e Biológicas (PPGCSB) e a CAPES.

A turma 2020.1 e a todos que de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”.

Roger Von Oech

RESUMO

Mosquitos vetores de doenças estão entre um dos principais problemas de saúde pública da humanidade, considerados responsáveis pela morte de aproximadamente 1 milhão de pessoas por ano. Dentre estes vetores podemos destacar o *Aedes aegypti*, um dos protagonistas de quadros epidemiológicos no mundo. O *Aedes aegypti* é vetor das arboviroses, a dengue, chikungunya e zika, causadas pelos vírus DENV, CHIKV e ZIKV, respectivamente, são as arboviroses mais comuns no atual cenário epidemiológico brasileiro. Apesar de todos os esforços e avanços relacionados ao controle do *Aedes*, esta tarefa ainda é um desafio contínuo, especialmente em países em desenvolvimento. É crescente o investimento em programas que visem o controle do vetor, porém muitas vezes os resultados obtidos não são satisfatórios. Atualmente, o controle químico ainda é a ferramenta mais aplicada, porém o contínuo surgimento de mecanismos de resistência e problemas ambientais e na saúde humana, a busca por novas moléculas se torna uma linha de pesquisas atual e importante. Este trabalho buscou estudar, através de ferramentas da Química Computacional, mecanismos de inibição de duas rotas metabólicas essenciais para o desenvolvimento do inseto, são elas: a via da síntese do hormônio juvenil e a via da enzima kynurenina transaminase. Foi utilizada a triagem virtual, o docking molecular, para investigação e filtragem de moléculas oriundas de dois bancos de dados, a plataforma online ZINC databank e o conjunto de biomoléculas de plantas nativas da Caatinga, pertencentes ao LAMAF, para emprego dos mecanismos de encaixe molecular escolheu-se os softwares *Chimera* e *Autodock vina*. Além disso, após o elenco das moléculas com melhor perfil de energia, foram realizadas as avaliações ADMETox, ampliando o conhecimento sobre o comportamento farmacocinético dos ligantes, através de variáveis como biodisponibilidade, saturação, polaridade, flexibilidade molécula, o que propiciou maior refino e interpretação da atuação físico-química dos ligantes selecionados. Os resultados obtidos permitiram elencar moléculas potenciais para aplicação em estudos de bancada, como o ligante 51 pertencente ao banco de dados de moléculas da caatinga, que demonstrou atuação nos dois alvos moleculares de estudo, potencializado a possibilidade de sucesso em testes in vivo. Dessa forma, o estudo desenvolvido propiciou a contribuição para o delineamento de novas alternativas para combate do vetor *Ae. aegypti*.

Palavras-chave: docking molecular, hormônio juvenil, kynurenina transaminase.

ABSTRACT

Disease vectors are among one of the main public health problems of humanity, considered responsible for the death of approximately 1 million people per year. Among these vectors, we can highlight *Aedes aegypti*, one of the protagonists of epidemiological situations in the world. *Aedes aegypti* is the vector of arboviruses, dengue, chikungunya and zika, caused by the DENV, CHIKV and ZIKV viruses, respectively, are the most common arboviruses in the current Brazilian epidemiological scenario. Despite all the efforts and advances related to the control of *Aedes*, this task is still an ongoing challenge, especially in developing countries. Investment in programs aimed at vector control is increasing, but often the results obtained are not satisfactory. Currently, chemical control is still the most applied tool, but the continuous emergence of resistance mechanisms and environmental and human health problems, the search for new molecules becomes a current and important line of research. This work sought to study, through Computational Chemistry tools, mechanisms of inhibition of two essential metabolic pathways for the development of the insect, they are: the juvenile hormone synthesis pathway and the kynurenine transaminase enzyme pathway. Virtual sorting and molecular docking were used for investigation and filtering of molecules from two databases, the online platform ZINC databank and the set of biomolecules from native plants of the Caatinga, belonging to LAMAF, for the use of molecular docking mechanisms. Chimera and Autodock vina software were chosen. In addition, after the list of molecules with the best energy profile, ADMETox evaluations were carried out, expanding knowledge about the pharmacokinetic behavior of ligands, through variables such as bioavailability, saturation, polarity, molecule flexibility, which provided greater refinement and interpretation. of the physicochemical performance of the selected ligands. The results obtained allowed us to list potential molecules for application in bench studies, such as ligand 51 belonging to the caatinga molecules database, which demonstrated performance in the two molecular targets of study, enhancing the possibility of success in in vivo tests. Thus, the study developed provided a contribution to the design of new alternatives to combat the vector *Ae. aegypti*.

Keywords: molecular docking, juvenile hormone, kynurenine transaminase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação do ciclo de vida de *Ae. aegypti*.

Figura 2. Sintomatologia das principais arboviroses transmitidas por *Ae. aegypti*.

Figura 3. A - Principais classes de organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. B - Principais representantes de compostos químicos análogos de hormônio juvenil.

Figura 4 - Representação esquemática do processo de seleção de indivíduos resistentes a aplicação de inseticidas.

Figura 5. Representação esquemática da metodologia de aplicação do docking.

Figura 6. Representação esquemática do processo de elaboração e liberação de fármacos.

Figura 7. Esquema metodológico para o desenvolvimento da pesquisa.

Figura 8. Representação tridimensional das proteínas 6mfb e 2ch2. A – Proteína 6mfb pertencente a *Ae. aegypti*. B – Proteína pertencente a *Anopheles gambiae*.

Figura 9. Representação tridimensional da proteína 5v13.

Figura 10 – Interações na proteína alvo, em roxo o ligante cristalográfico e em verde o ligante obtido através do redocking (energia de interação: -6.9 kcal/mol).

Figura 11. Radar físico-químico referente as propriedades do Ligante 30.

Figura 12. Radar físico-químico referente as propriedades do Ligante 165.

Figura 13. Radar físico-químico referente as propriedades do Ligante 51.

Figura 14 – A- Visualização do resultado de *redocking* do ligante localizado no sítio de interação da proteína ligante do hormônio juvenil de *Aedes aegypti*, utilizando o módulo Autodock Vina. B- Diagrama de interações após *redocking*.

Figura 15. Radar físico-químico referente as propriedades do Ligante ZINC0004003372.

Figura 16. Radar físico-químico referente as propriedades do Ligante ZINC000921263574.

Figura 17. Radar físico-químico referente as propriedades do Ligante ZINC000169599508.

Figura 18. Radar físico-químico referente as propriedades do Ligante ZINC000067736687.

Figura 19- A- Interações na cadeia B da proteína alvo 5V13 com o ligante 51, em preto, obtido através do processo de *docking* no software Autodock (energia de interação: 10.3 kcal/mol). B-Diagrama de interação de aminoácidos obtido no software Discovery.

Figura 20 – A- Interações na cadeia da proteína alvo 6mfb com o ligante 51, em azul, obtido através do processo de *docking* no software Autodock (energia de interação: -9.2 kcal/mol). B- Diagrama de interação de aminoácidos obtido no software Discovery.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Melhores valores de energia de interação de moléculas obtidas no banco de dados de moléculas da Caatinga.

Tabela 2. Resultados obtidos através das avaliações *ADMEtox* no software *SwissADME*

Tabela 3. Melhores valores de energia de interação de moléculas obtidas no banco de dados de moléculas da Caatinga e ZINC.

Tabela 4. Resultados obtidos através das avaliações *ADMEtox* no software *SwissADME*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMEtox - Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade

Aedes aegypti- *Ae. aegypti*

PDB - *Protein Data Bank*

pH – Potencial Hidrogeniônico

OBP - *Odorant Binding Proteins*

LAMMAF - Laboratório de Modelagem Molecular Aplicada à Farmácia

JH - *Juvenile hormone* (Hormônio Juvenil)

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco

RMSD - *Root Mean Square Deviation*

HKT -*3-hidroxikyrunenina transaminase*

Sumário

1.Introdução.....	16
2.ReferencialTeórico.....	18
2.1. <i>Aedes aegypti</i>	18
2.2. Principais Doenças Transmitidas.....	19
2.2.1 Dengue.....	20
2.2.2. Zika.....	21
2.2.3. Chikungunya.....	21
2.3. Ferramentas do Controle do <i>Aedes aegypti</i>	22
2.4. Proteína de Ligação do Hormônio Juvenil de <i>Aedes aegypti</i>	24
2.5. Enzima Transaminase de Kynurenina (HKT) de <i>Aedes aegypti</i>	26
2.6. Química Computacional e <i>Docking Molecular</i>	26
2.7. Autodock.....	29
2.8. Triagem Virtual.....	29
2.9. ADMETox.....	30
3.0.Objetivo Geral.....	31
3.1. Objetivos Específicos.....	32
4.0. Materiais e Métodos.....	32
4.1. Local de Estudo.....	33
4.2. Banco de Dados de Moléculas da Caatinga.....	33
4.3. Banco de Dados ZINC 15.....	33
4.4. Hidroxikyrunenina Transaminase de <i>Aedes aegypti</i>	35
4.5. <i>Docking Molecular</i> da 3-Hidroxikyrunenina Transaminase de <i>Aedes aegypti</i>	36
4.6. Proteína Ligante do Hormônio Juvenil.....	37
4.7. <i>Docking Molecular</i> da Proteína Ligante do Hormônio Juvenil.....	38
4.8. Abordagem ADMETox.....	38
5.0. Resultados e Discussões.....	39
5.1. Triagem Virtual para 3-Hidroxikyrunenina Transaminase de <i>Aedes aegypti</i>	39

5.2. Avaliação ADMETox para 3-Hidroxikyrunenina Transaminase de <i>Aedes aegypti</i>	41
5.3. Triagem Virtual Proteína Ligante do Hormônio Juvenil de <i>Ae. aegypti</i>	46
5.4. Avaliação ADMETox para Proteína do Hormônio Juvenil de <i>Ae. aegypti</i>	50
5.5. Ligantes 51 pertencente ao Banco de Dados de Espécies Nativas da Caatinga.....	54
6.0. Considerações Finais.....	59
7.0. Referências Bibliográficas.....	60

1.Introdução

O alto índice de doenças transmitidas por vetores continua sendo uma grande problemática para a saúde global. Em média anualmente são registradas cerca de 1 bilhão de infecções, resultando em uma estimativa de 1 milhão de mortes (IWAMURA,2020).

Neste cenário, destacamos as doenças ocasionadas pela transmissão de Arbovírus (de “Arthropod Borne Viruses”), abrangendo múltiplos vírus de impacto para saúde pública, como os vírus da Dengue, Zika e Chikungunya (SIPPY,2020).

Um dos fatores mais preocupantes desses grupos virais está associado ao seu poder de disseminação. A dengue, por exemplo, é causada pelo arbovírus mais difundido no mundo, distribuída em quase todos os países tropicais e subtropicais, atingindo mais recentemente os países do continente europeu, expondo cerca da metade da população mundial (ARDUINO,2019).

O crescimento acelerado nos índices de infestação pelos arbovírus se deve principalmente pelo aumento populacional dos seus vetores, dentre eles o *Aedes aegypti*, principal vetor quando considerado os ambientes urbanos (ARDUINO,2019). Sua distribuição geográfica facilitada está relacionada ao tipo de criadouro da espécie, que são os ambientes de clima quente e úmido e com disponibilidade de água para propiciar a eclosão dos ovos do inseto (LOPES,2019).

Tais características reprodutivas e de adaptabilidade ao ambiente, torna cada vez mais desafiador o controle deste vetor, requerendo um maior número de estudos e a implementação de metodologias específicas, que consigam dar suporte as medidas de vigilância (ZARA et al., 2016).

Podemos elencar como ferramentas de vigilância epidemiológica o controle biológico, que envolve o emprego de modificações genéticas para a redução da capacidade reprodutiva do inseto, reduzindo gradativamente a população selvagem (MAGALHÃES,2020). O controle mecânico, por sua vez, atua diretamente na eliminação de criadouros, geralmente por ações de saneamento

básico mais efetivas. Já o controle químico se estabelece através da utilização de inseticidas atuantes nas fases do ciclo de vida do inseto (MAGALHÃES,2020).

Dentre as ferramentas citadas acima, o controle químico é a mais difundida; porém, esta técnica possui limitações relacionadas aos mecanismos de resistências desenvolvidos pelo inseto, após o uso a longo prazo de uma mesma substância (MAGALHÃES,2020). Além desta problemática, os inseticidas, em sua maioria, podem ser constituídos de componentes tóxicos ao ambiente ou aos manipuladores. Tais problemáticas tornam cada vez mais necessários o aumento na busca de moléculas bioativas capazes de atuar no controle de *Ae. aegypti* (SOARES-DA-SILVA,2015).

Diante deste cenário, a química computacional surge como uma tecnologia promissora na busca de inibidores de proteínas que possuam importância estratégica na sobrevivência de patógenos (ARAÚJO,2020). Uma das estratégias é a avaliação *in silico* da afinidade molecular de substâncias naturais ou sintéticas com esses alvos biológicos, através do *docking* molecular (ARAÚJO,2020).

Para *Ae.aegypti*, um dos alvos moleculares mais estudados são os transportadores do hormônio juvenil, que desenvolve papéis biológicos importantes para o ciclo de vida do inseto, como a maturação dos ovos nas fêmeas, e no desenvolvimento reprodutivo (PARK,2020). Além deste, a busca por potenciais ligantes da enzima 3-Hidroxikyrunenina Transaminase, mostra-se promissora, sendo está uma protagonista nas reações bioquímicas atreladas a pigmentação das asas e dos olhos do mosquito, bem como atuante nos diferentes estágios da vida do inseto (MACIEL, 2020).

Diante do potencial da Química Computacional foi utilizado um banco de dados de espécies vegetais contidas no domínio morfoclimático caatinga e o banco de moléculas online ZINC, para a realização de estudos de triagem virtual e *docking* molecular que permitissem explorar e encontrar novas moléculas bioativas capazes de controlar o *Ae. aegypti*.

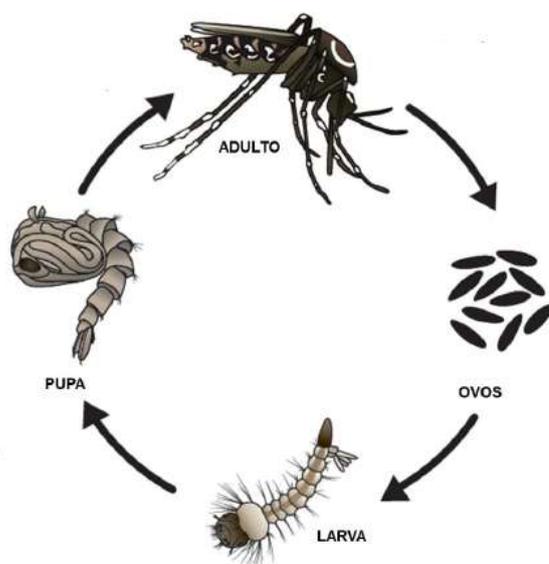
2. Referencial Teórico

2.1 *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* é um mosquito pertencente à família *Culicidae*, originário da região africana com dispersão global e maior capacidade de adaptação em habitats urbanos, atualmente descrito como uma espécie de hábitos antropogênicos, o que torna facilitada a sua presença e dispersão em condições domiciliares (OLIVEIRA,2020).

Seu ciclo de vida é distribuído em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adultos (Figura 1). Os ovos, por sua vez, são colocados pelas fêmeas em superfícies que contenham água e baixo teor de matéria orgânica, a ovoposição pode ser feita em contato direto com a água ou em proximidade (AMARAL,2018).

Figura 1. Representação do ciclo de vida de *Ae. aegypti*.



Fonte: Adaptado de Centers For Disease Control and Prevention-CDC (2009).

Durante um período de trinta e seis horas os ovos passam pelo processo de maturação e embriogênese, para que posterior a este período e em contato com a água ocorra o processo de eclosão das larvas (AMARAL,2018). Ademais, os ovos de *Ae. aegypti*, possuem a capacidade de permanecerem por mais de 300 dias em sua forma quiescente, o que facilita sua dispersão no ambiente e dificulta o controle (AMARAL,2018).

Ao atingir a fase larval, são transcorridos quatro estádios (L1, L2, L3 e L4), o desenvolvimento do inseto em cada um está estritamente relacionado ao funcionamento adequado do seu maquinário metabólico, bem como a disponibilidade de nutrientes, aos fatores ambientais e a densidade larval no criadouro, que pode interferir no processo de trocas gasosas. Após o quarto estágio o inseto migra então para fase de pupa, iniciando sua metamorfose para a fase adulta (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1996).

As fêmeas de *Ae. aegypti*, possuem o comportamento hematófago e acabam sendo a via transmissora dos arbovírus, uma vez que picam humanos e animais para obtenção do sangue, e reprodutibilidade dos ovos (TOKACHIL,2018). Diferentemente dos machos da espécie, que utilizam fontes de carboidrato para assegurarem a sua sobrevivência (TOKACHIL,2018).

Problemáticas oriundas ao *Ae. aegypti*, como a dengue, zika, chikungunya e a febre amarela e a dengue são cotidianamente retratadas como malefícios para saúde e meio ambiente, sendo o vetor um dos maiores disseminadores das patologias que promovem fragilidade na saúde pública mundial, tendo como cenário mais propício de atuação os países que possuem clima quente (SEGATA,2017).

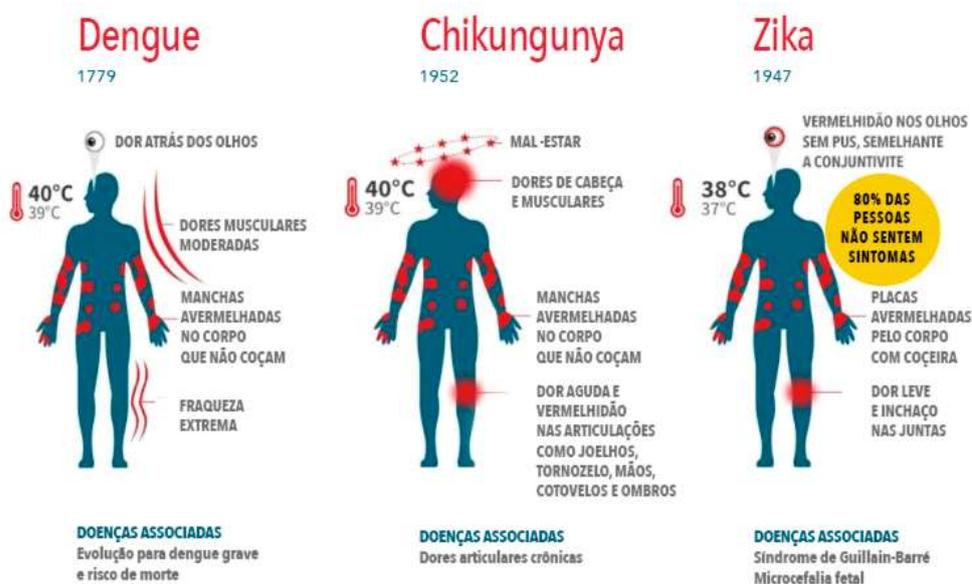
Diante de tais fatores, a pesquisa sobre o *Aedes aegypti* é uma ferramenta importante para possibilitar a prevenção e redução da transmissão da dengue através da implementação de novos mecanismos de controle do mosquito.

2.2. Principais Doenças Transmitidas

O *Aedes aegypti* é o vetor responsável pela transmissão de quatro tipologias de arboviroses, a dengue, zika, chikungunya e febre amarela, que proporcionam anualmente problemáticas de saúde pública devido suas sintomatologias e doenças associadas (figura 2).

Apesar das tentativas de controle levantamentos realizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), prospectam que 2,5 bilhões de pessoas possuem alguma vulnerabilidade socioambiental que as expõem ao risco de contrair a dengue (COSTA *et. al*,2018).

Figura 2. Sintomatologia das principais arboviroses transmitidas por *Ae. aegypti*.



Fonte: UFC,2020.

2.2.1. Dengue

Elencada como uma das principais arboviroses transmitidas por *Ae. aegypti*, a dengue trata-se de uma infecção viral aguda, que apesar da baixa taxa de mortalidade, está associada a fortes impactos socioeconômicos, requerendo alta demanda dos recursos de saúde pública, afligindo principalmente regiões tropicais e subtropicais, ganhando notoriedade por ser a arbovirose com maior frequência de casos no mundo (BHATT *et. al*,2013).

Seu avanço expressivo pôde ser verificado no continente asiático, em que estudos delinearam crescimento de 400% no número de casos de dengue em um período de 13 anos (2000-2013), através de tais avaliações a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que anualmente ocorra uma média de 100 milhões de casos sintomáticos e 300 milhões casos assintomáticos (HARAPAN *et. al.*,2020).

Apesar de já haver um bom volume de estudos a respeito dessa infecção viral direcionados para descoberta de medicamentos, o desenvolvimento de terapias efetivas ainda não foi alcançado. Na atualidade não se presencia o avanço nas ferramentas terapêuticas, e os tratamentos oferecidos continuam baseados em

hidratação intravenosa, associados a observação da evolução do quadro clínico (Wilder-Smith,2019).

Com o surgimento de outras patologias com sintomatologias similares em fases iniciais, como a COVID-19, e a possibilidade de surtos cruzados, reforça-se cada vez mais a necessidade do controle eficiente do vetor.

2.2.2. Zika

Além da dengue, a Zika é outra arbovirose veiculada por *Ae. aegypti*, com identificação datada do ano de 1950, na África Oriental, chegando efetivamente ao Brasil e a outros países do mundo no ano de 2015 (MA, Wenqiang *et al.*,2016).

Porém, diferentemente da dengue, para o vírus da Zika foi identificada a sua associação com alterações do Sistema Nervoso Central (SNC), tornando-a uma infecção viral mais grave e com sintomatologias de maior impacto e relevância (NASCIMENTO,2017).

Ao adentrar no Brasil, o vírus da Zika foi responsável pelo maior surto de microcefalia já relatada na saúde pública brasileira, com enfoque na região nordeste. Em termos econômicos estima-se que a epidemia do vírus Zika custou entre US\$ 7 bilhões e US\$ 18 bilhões para países da América Latina e do Caribe no período de 2015 e 2017, e US\$ 4,5 bilhões para o Brasil, além do tratamento direto, prejuízos por afastamento do trabalho e pela queda da produtividade decorrentes das sequelas ocasionadas pela Zika, foram estimadas em cerca de 918 milhões de dólares (FREITAS,2019).

2.2.3 Chikungunya

Mais uma das infecções virais, a chikungunya é um alphavírus transmitido pela picada de *Aedes* que quando comparada as demais patologias virais do vetor, possui como agravante a presença da fase subaguda da doença, que pode perdurar até três meses no hospedeiro, ou ainda o estabelecimento de patologias crônicas, relacionadas ao desenvolvimento de inflamações nas articulações (TRC,2021).

Assim como as demais infecções virais transmitidas por *Ae. aegypti*, não há um tratamento efetivo ou preventivo para chikungunya, a sua inserção no Brasil

deliberou o marco da coexistência de múltiplas arboviroses, ampliando o alerta para controle do vetor, a fim de minimizar as chances de ocorrência de um surto epidemiológico simultâneo para os três vírus (SILVA,2018).

2.3. Ferramentas de Controle do *Aedes aegypti*

Sabendo dos inúmeros impactos trazidos pelo mosquito a saúde pública global, torna-se essencial mobilizar a sociedade com o objetivo de disseminar políticas públicas e ações práticas, visando a conscientização e a supressão do vetor (MOREIRA,2019).

Apesar de já ser considerado um vetor de importância para saúde pública desde o início do século XX, o seu controle ainda é desafiador, fator que está associado a falta de infraestrutura, coleta de lixo e saneamento da básico de algumas cidades brasileiras (MAIA,2020).

Tais fatores além de dificultar a erradicação do vetor, também tornam mais difícil a escolha do método mais eficaz para controle, para contornar tal problemática se faz necessário avaliar a população local, levando em consideração fatores como a distribuição geográfica e a diversidade genética (MAIA,2020). Dessa forma, como principais metodologias são aplicados o controle químico, mecânico e biológico.

O controle mecânico, refere-se a limpeza ou remoção de depósitos de água limpa e parada, com intuito de eliminar possíveis reservatórios que abriguem ovos de *Ae. aegypti*, e é realizado por Agentes Comunitários de Saúde (ACS) e Agentes de Combate a Endemias (ACE) (SANTOS,2018).

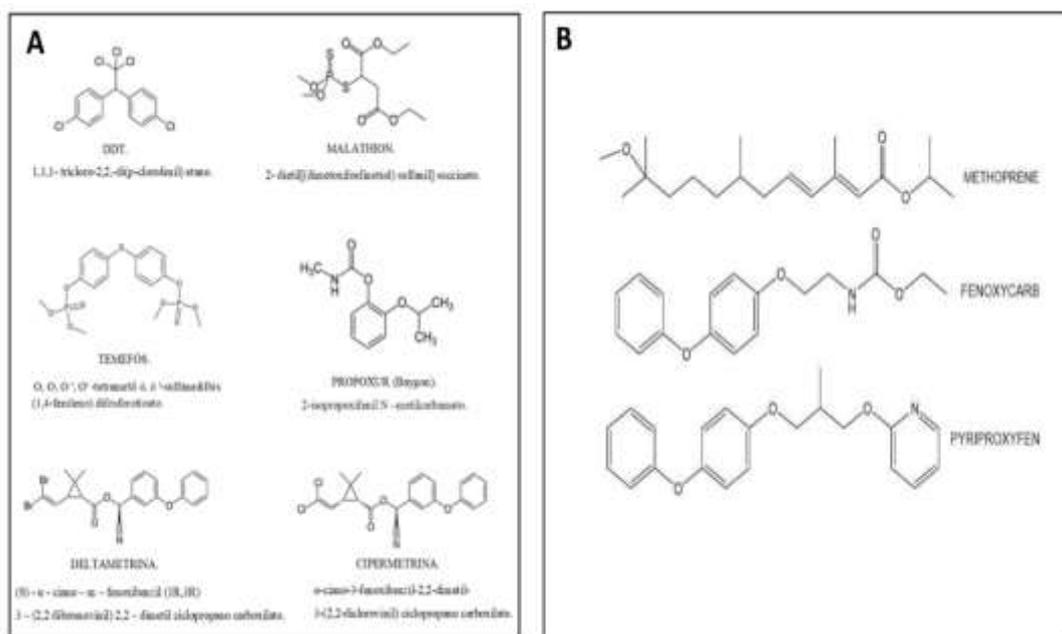
Além da ferramenta supracitada, destaca-se também o controle biológico que utiliza como vertentes a modificação genética, esterilidade induzida por radiação ou o uso de patógenos, dentre esses as bactérias são o grupo mais empregado na redução populacional de *Ae. aegypti* (COSTA,2018).

Os mecanismos biológicos surgiram como alternativas favoráveis para minimizar os impactos ambientais ocasionados pelo uso exacerbado de substâncias químicas com atividade inseticida. Porém, em sua grande maioria as técnicas biológicas possuem limitações relacionadas ao custo da

empregabilidade em larga escala e o controle do seu efeito a longo prazo no ambiente (COSTA,2018).

Diante disto, o controle químico continua sendo a estratégia mais aplicada para redução populacional do mosquito. São utilizados inseticidas das classes dos organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides e os reguladores do crescimento dos insetos (análogos do hormônio juvenil e inibidores da síntese de quitina, com os principais representantes elencados na Figura 3) (ARAÚJO,2013).

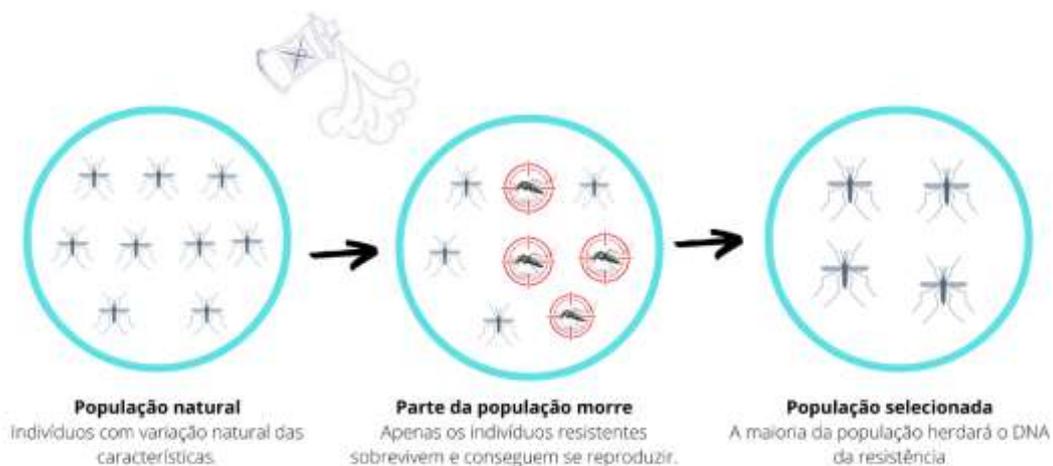
Figura 3. A - Principais classes de organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. B - Principais representantes de compostos químicos análogos de hormônio juvenil.



Fonte: Adaptado de Pessoa,2018.

Apesar da abrangência significativa do uso de inseticidas para controle de *Ae. aegypti*, tal ferramenta possui a limitação dos mecanismos de resistência desenvolvidos pelos insetos. O uso dessas substâncias promove ao longo do tempo a seleção dos indivíduos mais resistentes, eliminando os mais susceptíveis, ou seja, a depender da frequência de aplicações de um inseticida, a resistência pode não ser reversível (Figura 4) (VALLE,2015).

Figura 4. Representação esquemática do processo de seleção de indivíduos resistentes a aplicação de inseticidas.



Fonte: Autoria própria.

Já existem indícios de resistência em *Ae. aegypti* nas regiões do Sudeste Asiático, Caribe, América do Norte, América Central e América do Sul, sendo relatados principalmente mecanismos de resistência aos organofosforados, relacionados a enzimas de resistência metabólica, e aos piretróides, atrelados as mutações na proteína do canal de sódio encontrada na membrana nervosa do inseto (RODRIGUEZ,2020).

Para contornar tal problemática, uma tática adotada é a alternância de inseticidas, evitando assim o uso contínuo de um mesmo composto. Tal alternativa faz com que seja requerido cada vez mais o desenvolvimento de novos produtos (VALLE,2015).

2.4. Proteína de Ligação do Hormônio Juvenil de *Aedes aegypti*

Os insetos possuem diversos hormônios importantes para seu desenvolvimento. No caso de *Ae. aegypti*, o hormônio juvenil (JH) é um deles, atuando na regulação do desenvolvimento e da reprodução (CHOI,2017), no mosquito adulto atua principalmente na maturação dos ovários nas fêmeas, e comportamento reprodutivo dos machos (CHOI,2017).

Diante do papel desempenhado pelo hormônio juvenil, as vias metabólicas de JH tornaram-se alvos promissores para o desenvolvimento de novos inseticidas com baixa toxicidade para outros organismos não alvo, isso porque possuem alta especificidade para insetos, outros artrópodes e não estão presentes em vertebrados (HERRERA-CALDERON, Oscar et al,2022).

Dentro da via de sinalização, o alvo principal é a proteína de ligação do hormônio juvenil, pertencente à família de proteínas de ligação odorante (OBP), encontradas nos tecidos quimiossensoriais do inseto, desenvolvendo atividades relacionadas a modulação da sensibilidade, condução de sinais e transporte de ligantes.

Esse grupo de proteínas conduz e regula comportamentos alimentares, de sobrevivência e reprodução, além de coordenar a sinalização de extintos para localização do hospedeiro e sua seleção para realização do repasto sanguíneo. Com isso, as antenas, glândulas salivares e tecidos reprodutivos masculinos, são os locais em que ocorre sua maior expressão (GROSSI,2021).

A proteína de ligação do hormônio juvenil, possui semelhança e realiza interações com as proteínas salivares D7 que também fazem parte do grupo de proteínas OBP, e por sua vez desempenham funções importantes no inseto, como prevenção da resposta inflamatória no hospedeiro no ato da alimentação sanguínea. Dessa forma a interação dessas proteínas também é um viés de estudo significativo no âmbito de desenvolvimento de novos inseticidas para *Ae. aegypti* (GROSSI,2021).

Um dos inseticidas comerciais baseados em análogos do hormônio juvenil é o piriproxifeno, apresentando uma das menores estruturas químicas dentre os inseticidas no mercado. Seu modo de atuação se dá através do seu acúmulo em regiões em que ocorre a expressão dos hormônios juvenis, impedindo diretamente a produção da cutícula larval (RIBEIRO,2010).

Dessa forma, o piriproxifeno é um dos inseticidas modelo na busca de novas moléculas e desenvolvimento de novos inseticidas, uma vez que consegue agir em três fases do ciclo de vida do inseto, na eclosão das larvas, mudança de larva para pupa, e no bloqueio da emergência das pupas, impedindo que se tornem mosquitos adultos em que ocorre a maior expressão (GROSSI,2021).

2.5. Enzima 3-hidroxi-kyrunenina transaminase (HKT) de *Aedes aegypti*

Em mosquitos além da via de sinalização do hormônio juvenil, uma importante rota metabólica é a da kynurenina, por ser a principal mediadora do catabolismo do triptofano. Caso não seja catabolizado, o triptofano segue uma via de oxidação e é transformado em ácido xanturênico, ácido quinolínico ou ácido kynurênico, que estão associados distúrbios letais ao organismo (MACIEL,2019).

Nos mosquitos a principal via de degradação do triptofano é a rota precursora da síntese do ácido xanturênico, mediada pela 3-hidroxi-kyrunenina (3-HK). O ácido xanturênico é obtido pela 3-HK em uma reação irreversível mediada pela enzima 3-hidroxi-kyrunenina transaminase (HKT), tornando a HKT a única enzima responsável pela regulação da 3-HK em mosquitos (MACIEL,2019).

A 3-HK, por sua vez, está também relacionada a produção de pigmentos responsáveis pela coloração de asas e dos olhos do mosquito, seus maiores picos de expressão são encontrados na fase de pupa e estágio adulto inicial, em que ocorre o acúmulo de transporte nas vias sinalizadoras destes pigmentos (OLIVEIRA,2013).

Com isso, compreender e inibir a via de conversão da 3-HK em ácido xanturênico na rota da kyrunenina é um dos novos mecanismos alvos para controlar o desenvolvimento do vetor *Ae. aegypti* (MACIEL,2019).

2.6. Química Computacional e *Docking* Molecular

Durante o processo de desenvolvimento de novos produtos oriundos de moléculas bioativas, são requeridos diversos estudos pré-clínicos que permitem mensurar e caracterizar os efeitos biológicos induzidos por uma molécula em modelo animal (MIKOSVKI,2018).

Em bancada, os testes experimentais demandam um maior número de mão de obra, além do uso de equipamentos e reagentes, muitas vezes com alto custo.

Dessa maneira, ferramentas computacionais atreladas a química podem contribuir de forma significativa na seleção, identificação e otimização de novas moléculas que podem interagir com alto grau de afinidade por alvos moleculares (MIKOSVKI,2018).

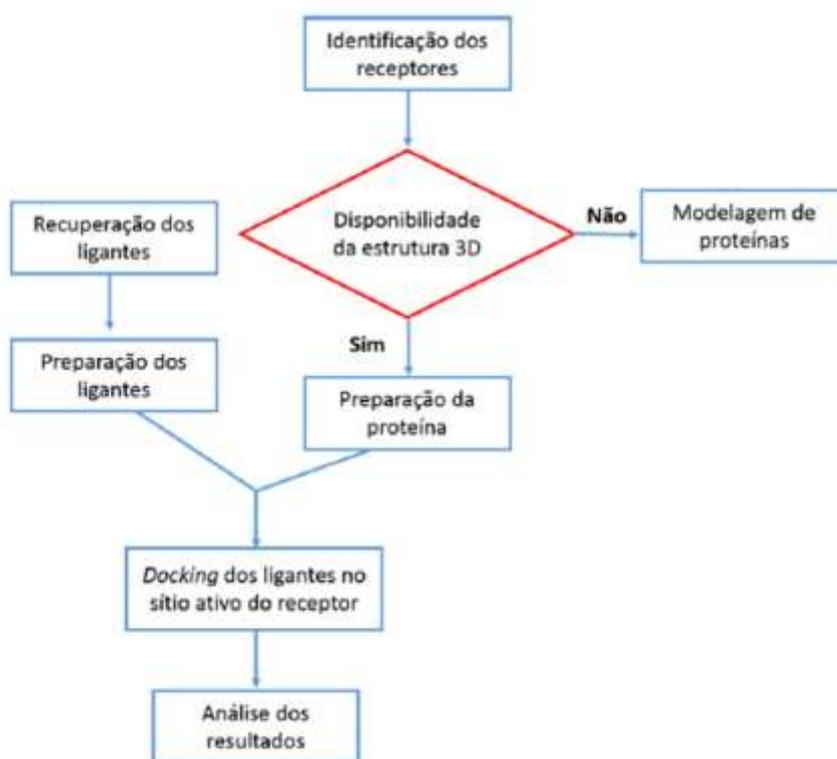
Uma das metodologias utilizadas pela química computacional é o *docking* ou acoplamento molecular. De maneira geral, a utilização desta técnica auxilia e amplia as possibilidades no universo de descoberta de novas moléculas bioativas, não sendo considerado um modelo linear, e sim um processo cíclico complexo, que envolve a realização de testes e validação de resultados.

Funciona basicamente através da otimização dos algoritmos de acoplamento, e tornando livre o acesso sobre ligantes e seus alvos. Dessa forma, é possível compreender os locais de ligação de proteínas mais favoráveis para os ligantes, reações potenciais adversas e novos alvos moleculares até então desconhecidos (MIKOSVKI,2018).

O *docking* é uma ferramenta amplamente empregada em estudo para triagem virtual de conjuntos de dados. Apesar de ser uma alternativa considerada recente e muitas vezes pouco difundida, sua primeira utilização foi realizada na década de 80 (PHONG,2022), em que se mostrou uma metodologia promissora para o estudo e desenvolvimento de novos fármacos.

Conforme ilustrado na figura 5, seu delineamento experimental se dá primeiramente através da identificação dos receptores, verificando a disponibilidade da sua estrutura 3 D, preparo das proteínas e dos ligantes, estabelecimento das energias mínimas de ligação e avaliação dos resultados (TRIPATH; KRISHNA, 2017).

Figura 5. Representação esquemática da metodologia de aplicação do *docking*.



Fonte: Da Silva, 2019.

Com isso, as metodologias de *docking* baseiam-se na busca de algoritmos de pontuação (SCHULLER et al., 2021), que direcionam a avaliação de diferentes orientações e posições de encaixe que um ligante pode ter dentro do sítio ativo de uma molécula alvo.

Elencando os métodos moleculares para triagem de compostos, verifica-se que o acoplamento molecular é o mais empregado. A abordagem molecular trata em nível atômico o comportamento das interações de proteínas, moléculas de água, ligantes, e demais partículas que participem do sistema de interação, regido por campos de forças que derivam das leis newtonianas (ADELUSI, 2022).

2.7. AUTODOCK

De maneira geral, os mecanismos de simulação molecular atuam como agentes que permitem inspecionar a estabilidade dos ligantes nos sítios ativos dos alvos do receptor, fator que subsidia o embasamento teórico necessário para validar os métodos de triagem virtual (ADELUSI et al.,2022).

Baseado em algoritmos de busca descritos em três tipos de metodologia, os métodos sistemáticos, métodos aleatórios e métodos de simulação. Dentre os métodos aleatórios, existem os softwares baseados em algoritmos genéticos como o *Autodock*, que usa como metodologia base a busca por mínimos globais (EBERHARGT et al.,2021).

Além disso, o *Autodock* também utiliza as funções de pontuação que projetam os cálculos de afinidade de ligação de um complexo proteína-ligante, atualmente são empregados três tipos principais de funções de pontuação, são elas as pontuações baseadas em conhecimento, empíricas e de campos de força (PHAM et al., 2022).

Essas funções levam em consideração as interações físicas, eletrostáticas, de Vander Waals, além das propriedades de ângulo de ligação e suas torções para atingir a complementariedade de informações necessárias para os processos de triagem virtual (PHAM et al., 2022).

2.8. Triagem Virtual

As metodologias de triagem virtual estão relacionadas as ferramentas de averiguação de bibliotecas de compostos, que fazem uso de modelos computacionais e algoritmos, que permitem realizar a filtragem de moléculas a partir de características desejadas (SCHNEIDER, 2010).

Trata-se de um recurso bem consolidado e validado para os estudos que envolvem o desenvolvimento de fármacos, ou de compostos que possam ter atividade e/ou composição perigosa para o meio ambiente (CARVALHO,2021).

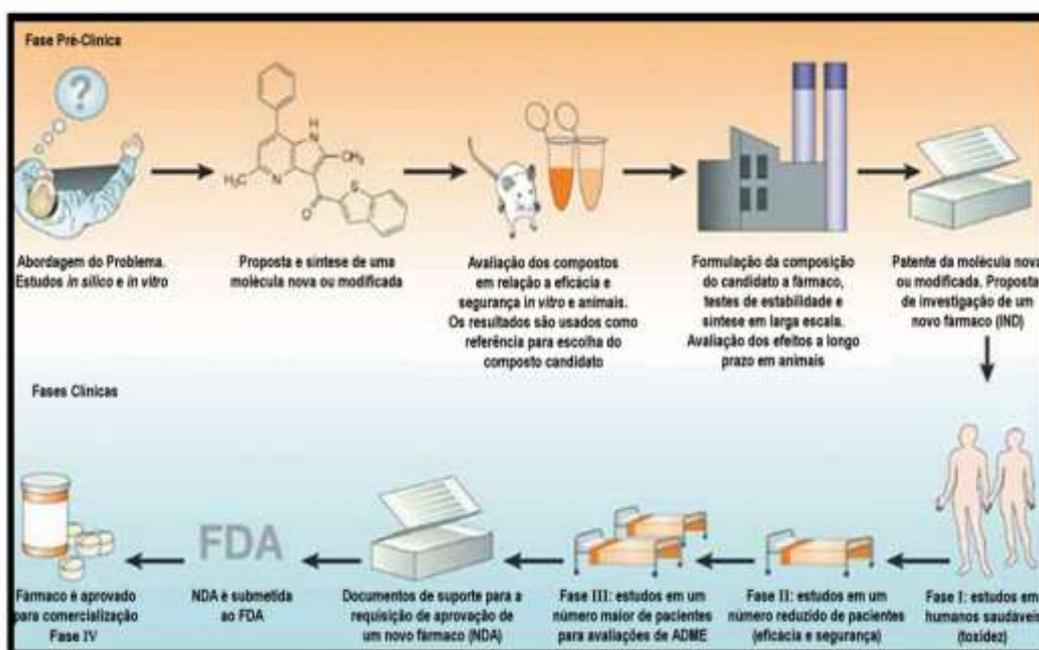
Através de seus mecanismos de busca e seleção a triagem virtual se tornou um método eficaz, rápido e viável economicamente, uma vez que permite a redução do número de compostos que deverão ser submetidos a uma avaliação experimental (CARVALHO,2021).

2.9. ADMEtox

Além da triagem virtual, através de ferramentas *in silico* é possível prever propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas importantes, como o potencial de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME-Tox) de uma molécula, parâmetros essenciais para elaboração de um fármaco.

As etapas inerentes a seleção de um fármaco pode ser melhor ilustrada na Figura 6. Iniciando com a formulação de uma hipótese base para um estudo, percorrendo as etapas correlacionadas a escolha e definição das moléculas alvos, teste em bancada, ajustes de formulação, etapas de testes e regulação para uso *in vivo*.

Figura 6. Representação esquemática do processo de elaboração e liberação de fármacos.



Fonte: Adaptado de Lombardino e Lowe (2004)

Com base na avaliação dos estudos capazes de mensurar tais variáveis, atualmente é possível ter uma metodologia *in silico* mais completa, isso porque as abordagens ADME-Tox permitem compreender propriedades que correspondem a aproximadamente 60% das falhas de uma molécula química com atividade biológica.

Diante dos custos e dos anos de estudos inerentes a triagem de moléculas em bancada, diversos centros de pesquisa e grupos de estudo que utilizam biomoléculas para desenvolvimento de novos compostos, vem aplicando a metodologia *in silico*.

Estima-se que pesquisas para a elaboração de novos produtos baseados em moléculas bioativas, acarreta em custos que estão na ordem de milhões de dólares, reforçando a necessidade do uso de metodologias que reduzam o número de moléculas que precisam ser avaliadas em bancada (TETKO *et. al.*, 2006).

Dessa forma, as avaliações de toxicidade *in silico*, se definem como o conjunto de ensaios computacionais, experimentações matemáticas e abordagens da ciência de dados para compostos químicos, que compilam um conjunto de predições para fornecimento da atividade toxicológica, tornando mais efetivo o processo de triagem para testes *in vivo* (KAVLOCK *et. al.*, 2008).

3.0 Objetivo Geral

Buscar potenciais inibidores dos alvos biológicos Proteína do Hormônio Juvenil e Hidroxikyrunenina Transaminase de *Aedes aegypti*, nos bancos de dados da Caatinga e ZINC, por meio de triagem virtual por *docking* molecular, selecionando moléculas mais promissoras para controle químico de *Ae. aegypti*.

3.1 Objetivos Específicos

- Obter a estrutura 3D das proteínas alvos do estudo (enzima hidroxikyrunenina transaminase de *Aedes aegypti* e proteína de ligação do hormônio juvenil) através do banco de dados RCSB/PDB;
- Avaliar as condições do algoritmo de *docking* que melhor representam as características de complexo original (*redocking*);
- Realizar uma triagem virtual de moléculas, provenientes de um banco de dados próprio de compostos isolados de plantas da caatinga e do banco de dados online ZINC, através do *script* automático no programa *Autodock Vina*;
- Elencar os compostos mais promissores, avaliando padrões moleculares, modos de interação e propriedades ADMETox;
- Direcionar potenciais estruturas com atividade larvicida para estudos posteriores *in vitro* e *in vivo*.

4. Materiais e Métodos

O desenvolvimento de metodologias *in silico*, requer um delineamento experimental preciso, uma vez que a obtenção de resultados finais eficazes depende do refino e execução correta de todas as etapas.

Com isso, o desenvolvimento deste estudo envolveu etapas que vão desde da escolha dos alvos proteicos, através do embasamento em literário e do conhecimento adequado dos alvos de estudo, até ensaios *in silico*, como as avaliações dos parâmetros ADMETox, que permitiram subsídio para continuidade da pesquisa e futuras aplicações *in vivo*, a sequência metodológica seguida é ilustrada na figura 7.

Figura 7. Esquema metodológico para o desenvolvimento da pesquisa.



Autoria própria

4.1. Local de Estudo

Os estudos foram realizados no Laboratório de Modelagem Molecular Aplicada a Farmácia (LAMMAF) da Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Centro na cidade de Petrolina-PE, possuindo código de cadastro no SISGEN: A62C7AD.

4.2. Banco de Dados de Moléculas da Caatinga

Um dos bancos de dados aplicados é o de moléculas da Caatinga, elaborado pelo próprio Laboratório de Modelagem Molecular Aplicado à Farmácia, constituído por 248 compostos isolados de múltiplas espécies endêmicas desse domínio fitogeográfico.

4.3. Banco de Dados ZINC 15

O outro banco de dados utilizado foi o ZINC, uma plataforma gratuita de moléculas bioativas, disponíveis em 2D e 3D. Totalizando mais de 750 milhões

de alvos moleculares, agrupados em estados de protonação biologicamente relevantes.

Estão subdivididas através de características como *Log P*, que se refere a medida quantitativa de lipofilicidade de uma molécula bioativa, o peso molecular, permitindo a aplicação de filtros baseados em características físico-químicas que propiciam maior seletividade do grupo de moléculas estudadas.

Para este estudo, as variáveis *Log P* e peso molecular, foram definidas a partir das características dos inibidores cristalográficos JHIII e KY1 de cada alvo molecular (proteína do hormônio juvenil e hidroxikyrunenina transaminase de *Aedes aegypti*) respectivamente. Após a definição das características físico-químicas das quais os ligantes testes deverão obter, foi possível realizar o download no banco de dados.

Com isso um arquivo compilado com todas as moléculas para cada proteína foi obtido, ou seja, 10.500 ligantes com o *Log P* e o peso molecular na mesma faixa do inibidor cristalográfico KY1, referente a hidroxikyrunenina transaminase de *Aedes aegypti*, e 11.671 ligantes com o log de p e o peso molecular na mesma faixa do inibidor cristalográfico JHIII para a proteína do hormônio juvenil.

Posteriormente, as moléculas obtidas foram individualizadas e convertidas para o formato pdb, etapa necessária para que fossem aplicadas na interface do software *Autodock*, e então submetidas aos processos de *docking*.

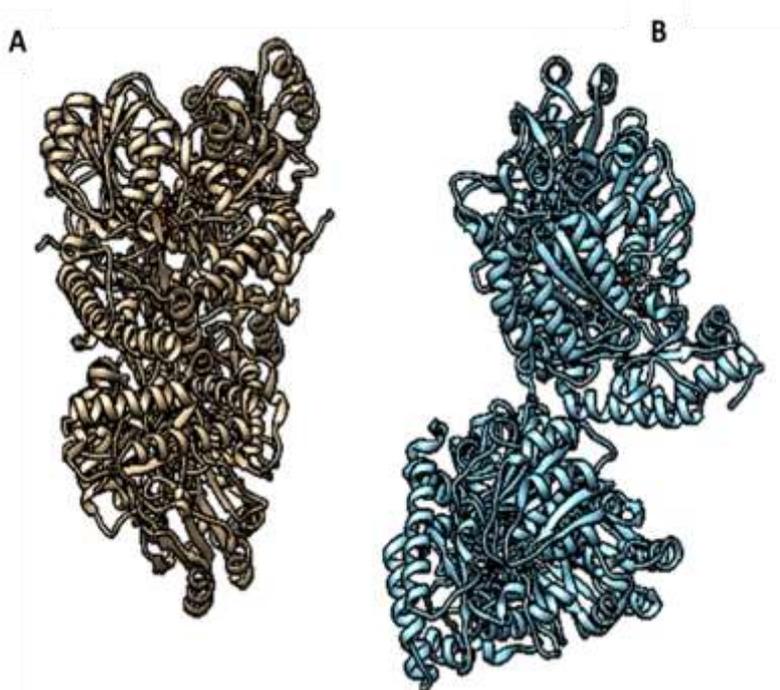
4.4. Hidroxikyrunenina Transaminase de *Aedes aegypti*

Para obtenção da macromolécula foi utilizado o banco de dados de estruturas online PDB (www.rcsb.org), com posterior edição no software *chimera*.

Foram utilizadas duas proteínas, a proteína alvo do estudo (código PDB: 6MFB), pertencente a *Aedes aegypti*, e a proteína que contém o agente inibidor (código PDB: 2CH2) pertencente a *Anopheles gambiae*, representadas na Figura 8.

Anopheles gambiae, é um mosquito pertencente ao gênero *Anopheles*, que já possui estudos referentes a enzima 3-HKT, com isso seu ligante contém a cristalografia definida, ademais a proteína 2CH2 pertencente a este inseto, possui mais de 70% de homologia com a 6 mfb de *Ae. aegypti*, permitindo sua aplicação com segurança.

Figura 8. Representação tridimensional das proteínas 6mfb e 2ch2. A – Proteína 6mfb pertencente a *Ae. aegypti*. B – Proteína pertencente a *Anopheles gambiae*



Fonte: Autoria própria

Dessa forma tal metodologia foi aplicada, porque estudos de outros grupos de pesquisa relatam que os ligantes se encaixam de forma otimizada no sítio ativo da HKT de *Anopheles gambiae*. Ou seja, a reorientação do posicionamento das cadeias da 6mfb de *Ae. aegypti*, de acordo com a 2CH2 de *Anopheles gambiae*, aumentaria as chances de obtenção resultados otimizados no processo de *docking* (ALVES,2011).

Esse processo foi realizado com o propósito de reorientar as cadeias da proteína alvo de acordo com o direcionamento da proteína que contém o agente inibidor, permitindo realizar os estudos de *redocking* na proteína 6mfb de *Ae. aegypti*.

No *chimera* foi aplicada a ferramenta *modeller*, com o objetivo de proporcionar a edição e o alinhamento entre as duas proteínas, com posterior complementação de resíduos de aminoácidos.

Além disso, foi avaliado também o estado de protonação dos aminoácidos, estabelecendo como parâmetro o valor de 7,0 para o pH, mesma condição biológica encontrada na hemolinfa do mosquito e realizando a comparação com um pH neutro.

4.5. Docking molecular 3-Hidroxiyrunenina Transaminase de *Aedes aegypti*

Para edição e realização dos cálculos de *docking* e *redocking* foi utilizado o programa *Autodock Vina* (MORRIS et al., 1998). Foram utilizados a proteína alvo reorientada de *Ae. aegypti* e o inibidor cristalográfico KY1.

Após a obtenção dos resultados do *redocking*, foi realizada a triagem virtual com as moléculas do banco de dados online ZINC e banco de dados de moléculas da caatinga, este último pertencente ao Laboratório de Modelagem Molecular Aplicada a Farmácia da UNIVASF, os procedimentos foram feitos em ambiente Windows, utilizando o módulo Vina do programa *Autodock*.

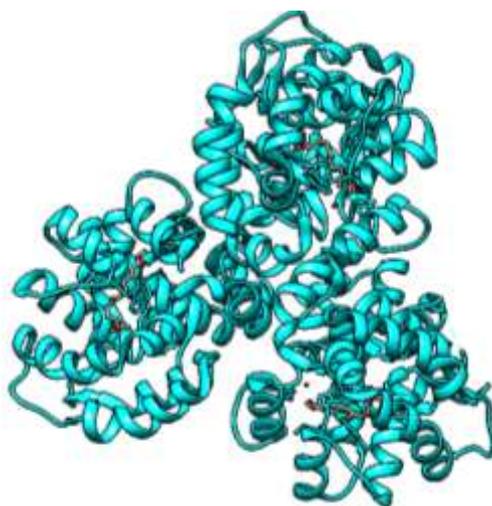
Para o banco de dados de plantas da Caatinga, foram utilizadas 248 moléculas. Já para o banco de dados ZINC foram aplicados filtros farmacodinâmicos baseados nos valores de $\text{Log } P$ (1,5) e massa molar (300g/mol), baseados nas características da molécula do inibidor cristalográfico (KY1), sendo selecionadas 10.500 moléculas. O sítio de ligação no alvo (grid box) foi definido com base na localização do ligante cristalográfico (KY1) que pertence a macromolécula 2CH2 de *Anopheles gambiae*, devidamente redockado na proteína alvo de *Aedes aegypti* (6MFB). As dimensões da grid box adotadas, foram de 14x14x14 Å, em relação ao centro do ligante e com espaçamento de 1.0 Å, da grade interna.

Os potenciais calculados foram definidos pelo programa, com base nos tipos de átomos do ligante. As melhores poses para cada molécula foram avaliadas quanto à energia de interação e o desvio entre as geometrias obtidas.

4.6. Proteína ligante do Hormônio Juvenil

O segundo alvo de estudo, a proteína ligante do hormônio juvenil, teve sua estrutura obtida no banco de dados de estruturas online PDB (www.rcsb.org), em que a estrutura da macromolécula foi obtida através do código PDB 5V13 (Figura 9), com posterior edição no software Chimera, sendo possível a obtenção do inibidor cristalográfico JH3.

Figura 9. Representação tridimensional da proteína 5v13.



Fonte: Autoria própria. Obtido pelo software Chimera.

4.7. *Docking* Molecular Proteína ligante do Hormônio Juvenil

Para aplicação do procedimento de *docking* na proteína ligante do hormônio juvenil, foi realizada a obtenção da sua estrutura, com o código 5V13 e edição no software *chimera*.

Com ligantes, foram empregadas 248 moléculas do banco de moléculas da caatinga, e para os ligantes obtidos no banco de dados ZINC, foram aplicados os filtros físico-químicos referentes ao Log P entre 4,5 e 5,0, peso molecular entre 250 a 300 daltons, pH neutro e moléculas com dimensionamento das proteínas em 3D, sendo extraídas 11.671 moléculas com características semelhantes ao ligante cristalográfico JHIII.

Assim como para o alvo molecular da HKT, para 5V13, foram empregadas as ferramentas propka, para validar o estado de protonação dos aminoácidos da estrutura na faixa de pH 7.0, equivalente ao meio biológico na qual atua e está inserida, a hemolinfa de *Ae. aegypti*.

Após as edições realizadas na proteína alvo, utilizou-se o ligante co-cristalográfico para emprego do *redocking*, através do procedimento foi possível obter o valor do RMSD (*“Root Mean Square Desviation”*), permitindo mensurar a qualidade do processo de atracagem proteína-ligante.

Com a efetivação do *redocking*, foi possível submeter os ligantes escolhidos para triagem virtual ao processo de *docking*, realizado no script automático do software *Autodock Vina*.

4.8. Abordagem ADMETox

Complementando as avaliações de *docking* molecular, a abordagem ADME prediz a farmacocinética e comportamento físico-químico de uma molécula candidata a fármaco.

Devido a importância desse tipo de avaliação para filtragem de características físico-químicas em fármacos, as moléculas que obtiveram melhor score de energia de ligação nos processos de *docking* molecular foram submetidas a avaliação do seu perfil ADME, através do uso da plataforma online *SwissADME*, pertencente ao SIB - Swiss Institute of Bioinformatics.

A plataforma permitiu obter os valores de fórmula e massa molar, ligações rotacionáveis, aceptores e doadores de hidrogênio, Log P, solubilidade em água, absorção gastrointestinal, a possibilidade de inibição das enzimas do complexo CYP, a permeação da pele e a acessibilidade sintética das moléculas.

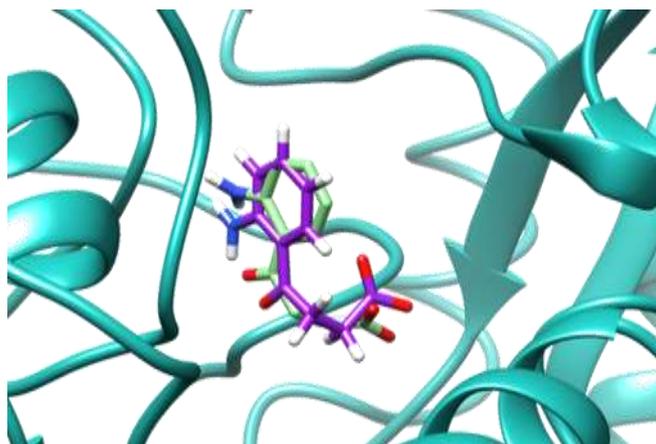
Além disso foi possível a obtenção dos radares físico-químico de cada ligantes, em que a área rosa representa a faixa ideal para que essa molécula seja sintetizada, de acordo com cada propriedade (lipofilicidade: XLOGP3 entre -0,7 e +5,0, massa molar entre 150 e 500 g/mol, polaridade: TPSA entre 20 e 130 Å², solubilidade não superior a 6, e flexibilidade não superior a 9 ligações rotativas (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

5.0 Resultados e Discussões

5.1 Triagem Virtual para 3-Hidroxiakyrunenina Transaminase de *Aedes aegypti*

A partir do ligante cristalográfico, obtido a partir do banco de dados PDB, foi realizado o cálculo de *redocking* (Figura 10), tal procedimento permitiu a obtenção do valor de RMSD (Root-Mean-Square-Deviation), parâmetro de mensuração da distância entre os átomos de dois ligantes, que possibilita avaliar a qualidade do *docking*. Para que o *redocking* possa ser validado, os valores obtidos devem ser menores que 2 Å, para o *redocking* da 6 mfb o valor obtido foi de 1.085 Å.

Figura 10 – Interações na proteína alvo, em roxo o ligante cristalográfico e em verde o ligante obtido através do *redocking* (energia de interação: -6.9 kcal/mol).

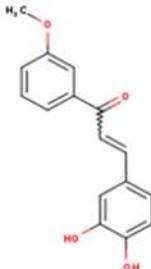
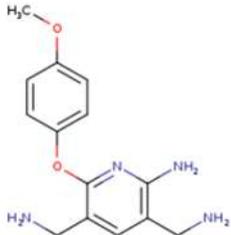
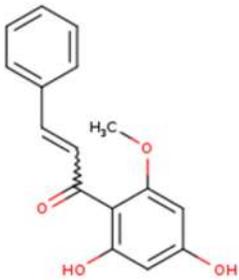


Fonte: Autoria Própria.

A partir dos cálculos realizados pelos programas de ancoragem molecular foram obtidos valores de energias de ligação para diversas posições assumidas pelos ligantes no sítio de interação com a macromolécula alvo. Dessa forma, foram encontradas as melhores posições, considerando a menor energia de ligação, uma vez que, estes são os melhores valores de interação obtidos para as estruturas.

Para a confecção da Tabela 1, foram considerados os ligantes que apresentaram valores de energia de interação $\geq -8,5$ kcal/mol, que por sua vez são valores de energia de interações maiores que os obtidos no processo de *redocking* do agente inibidor (KY1) na macromolécula (6MFB), equivalente a -6.9 kcal/mol.

Tabela 1 – Melhores valores de energia de interação de moléculas obtidas no banco de dados Bioma Caatinga.

Ligante (nº)	Banco de Dados	Estrutura 2 D	Energia de Interação (kcal/mol)
51	Bioma Caatinga		-9,2
165	Bioma Caatinga		-8,5
30	Bioma Caatinga		-8,5

Fonte: Autoria Própria

5.2. Avaliação ADMETox para 3-Hidroxiikyrunenina Transaminase de *Aedes aegypti*

As avaliações ADMETox foram estabelecidas e avaliadas de acordo com a regra dos 5 de Lipinski ou “*rule of five*” (RO5), mecanismo desenvolvido a fim de diminuir o número de moléculas selecionadas em estudos que possuam propriedades físico-químicas insatisfatórias (DA SILVA *et al.*,2017).

A RO5 descreve que a má absorção ou permeabilidade torna-se mais provável quando a molécula possui mais que 5 doadores de ligação de hidrogênio, mais que 10 aceptores de ligação de hidrogênio, peso molecular maior do que 500 daltons e log P maior do que 5, sendo todos os parâmetros múltiplos de cinco (DA SILVA *et al.*,2017).

Em parâmetros da regra de *Lipinski*, observa-se que as três moléculas estudadas para 3-HKT, não possuem nenhuma inconformidade, estando dentro dos limiares estabelecidos para as variáveis supracitadas.

Para as avaliações estabelecidas de acordo com os filtros de características estruturais, filtros *PAINS* (“*pan-assay interference compounds*”) demonstram que os ligantes obtidos no banco de dados caatinga não apresentam atividade irregular ou instabilidade metabólica.

O alerta de *PAINS* permite identificar moléculas químicas com tendência a expressar resultados falsos positivos em triagens virtuais de alto rendimento, tal característica deve-se a facilidade em estabelecer reações de caráter inespecífico com seus alvos (DAHLIN *et al.* 2015).

O único ligante que possui 1 filtro indicativo de *PAINS*, é o ligante 51, porém valores ≤ 1 , ainda elencam a estrutura de estudo com baixa probabilidade de possuir instabilidade de ligação com seus alvos (MACARRON,2018).

Com relação a inibição das isoenzimas do sistema CYP450, fator considerado indicador para favorecimento de interações medicamentosas, toxicidade, bioacumulação e efeitos adversos, observa-se que a molécula 30 não possui nenhum fator de inibição.

Enquanto que os ligantes 51 e 165, inibem a CYP1A2, a CYP2C9 e a CYP3A4, diretamente ligada as reações de metabolismo de fármacos, indicativo de maior necessidade de ensaios avaliativos de biotoxicidade para elaboração de formulações utilizando essas moléculas.

Outra variável importante fornecida pela avaliação ADME do Swiss é a acessibilidade sintética. Leva-se em consideração a capacidade que um composto possui de ser sintetizado em bancada, com escala de zero (fácil síntese) a 10 (difícil síntese), ou seja, quando menor o valor fornecido, mais fácil de sintetizar a estrutura.

Dessa forma, todas moléculas com melhor energia de ligação para 3-HKT, possuem alta capacidade de síntese, com valores médios de pontuação menores que 3 (ERTL; SCHUFFENHAUER, 2009).

Ademais, todas as moléculas teor de solubilidade aquosa significativo, o que permite prospectar maior facilidade no desenvolvimento de trabalhos em bancada e no uso para formulações inseticidas, uma vez que isentam a necessidade de um carreador.

Tabela 2. Resultados obtidos através das avaliações ADMETox no software SwissADME.

	30	51	165
Fórmula Molecular	C14H18N4O2	C16H14O4	C16H14O4
Massa Molecular	274,32 g/mol	270.28 g/mol	270.28 g/mol
Ligações Rotacionáveis	5	4	4
Aceptores de Ligação de Hidrogênio	5	4	4
Doadores de Ligação de Hidrogênio	4	2	2
Log P	0,96	2,68	2,62
Solubilidade em Água	muito solúvel	solúvel	solúvel
Absorção GI	alto	alto	alto
Inibidor da CYP1A2	não	sim	sim
Inibidor da CYP2C19	não	não	não
Inibidor da CYP2C9	não	sim	sim
Inibidor da CYP2D6	não	não	não
Inibidor da CYP3A4	não	sim	sim
Permeação da Pele (log Kp (cm/s))	-8,48 cm/s	-5,53 cm/s	-5,46 cm/s
Violações à Regra de Lipinski	0	0	0
Alerta PAINS	0	1	0
Acessibilidade Sintética	2,92	2,63	2,62

Fonte: Autoria própria.

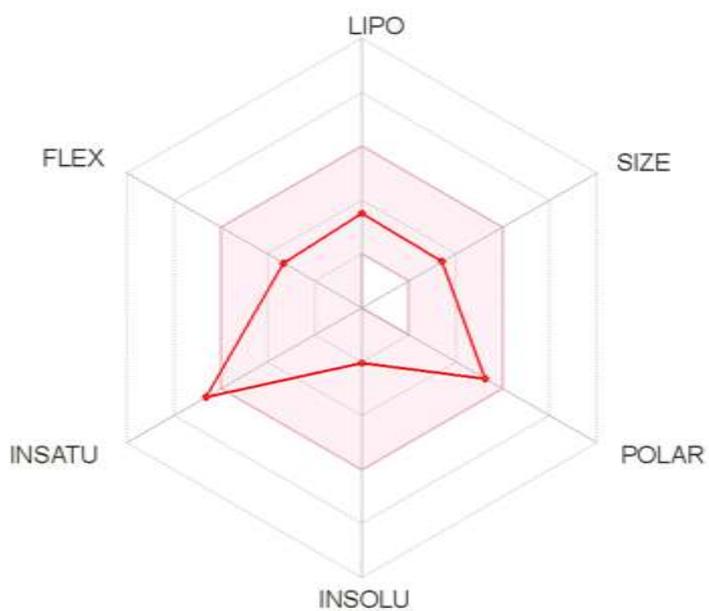
Além disso foi possível obter os radares de perfil físico-químico para as três moléculas em que seis propriedades físico-químicas foram levadas em consideração: lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação.

Respeitando os intervalos já estabelecidos em literatura, região traçada em rosa, o gráfico de radar de cada molécula deve estar inteiramente nessa faixa, para que seja considerada mais fácil de ser biodisponível de forma oral, quando avaliamos medicamentos formulados para humanos.

No caso de estudos voltados para desenvolvimento de inseticidas, leva-se em consideração que uma molécula com boa capacidade de ser administrada oralmente, tem um potencial de absorção mais rápido e conseqüentemente sua formulação e dosagem necessária para atuação é facilitada.

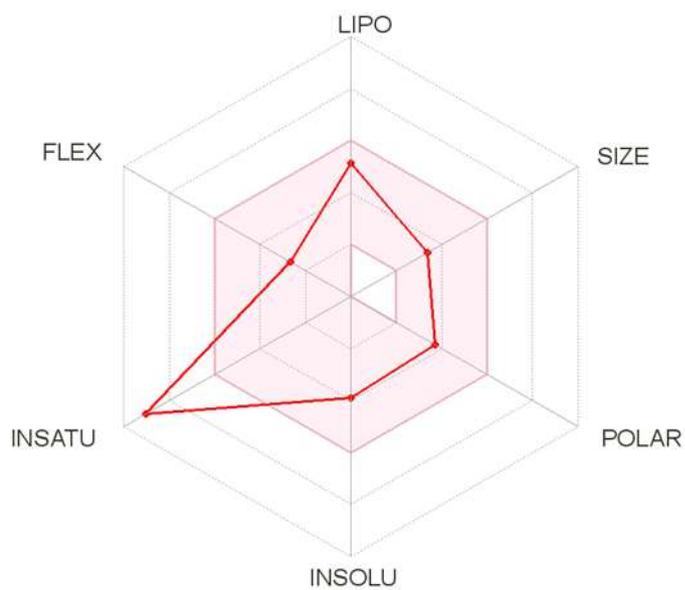
Dessa forma, observa-se que o ligante 30, trata-se de uma molécula com maior grau de biodisponibilidade, fração de carbonos na hibridização sp³ não inferior a 0,25, contemplando todas as variáveis físico-químicas estabelecidas, conforme figura 11, enquanto que os ligantes 165 e 51 (figura 12 e figura 13), possuem maior grau de saturação.

Figura 11. Radar físico-químico referente as propriedades do Ligante 30.



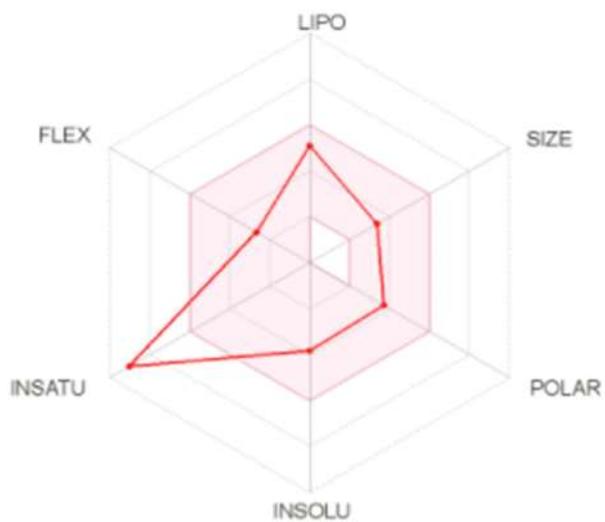
Fonte: Autoria própria. Obtido pela plataforma SwissADME.

Figura 12. Radar físico-químico referente as propriedades do Ligante 165.



Fonte: Autoria própria. Obtido pela plataforma SwissADME.

Figura 13. Radar físico-químico referente as propriedades do Ligante 51.



Fonte: Autoria própria. Obtido pela plataforma SwissADME.

5.3. Triagem Virtual para Proteína ligante do Hormônio Juvenil de *Aedes aegypti*

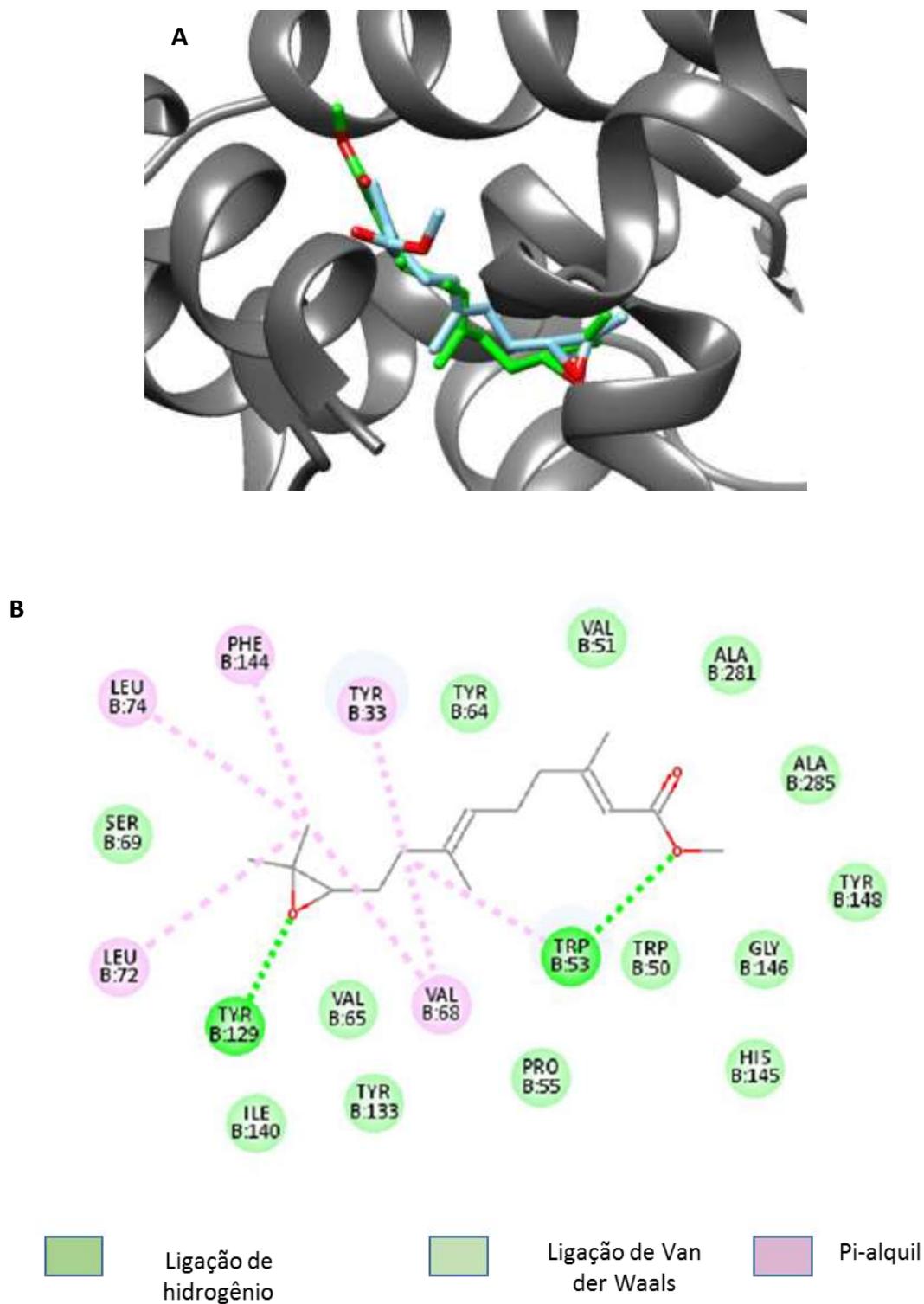
Para os estudos realizados com a proteína ligante do hormônio juvenil (5V13), foi realizado o processo de *redocking* no complexo alvo-ligante, através dessa avaliação foi possível obter os resultados referentes ao cálculo do RMSD, conforme supracitado anteriormente, permitindo avaliar a qualidade do procedimento de *docking*.

O cálculo da pose cristalográfica do ligante, *redocking*, resultou em um RMSD de 0,302 Å, e energia de interação de -9,0 Kcal/mol, realizado na interface do módulo do *Autodock Vina*.

A partir do software *Chimera* foi possível avaliar as interações obtidas com o processo de *redocking* (Figura 14), em que a molécula de JHII estabelece uma ligação com a proteína ligante do hormônio juvenil na porção N-terminal.

Além disso, na constituição da sua cadeia proteica ocorre a dominância de cadeias laterais hidrofóbicas ligadas por interações do tipo Van der Waals, pi-alquil e pi-stacking. Também foi possível visualizar as interações dos aminoácidos de grupos leucina, alanina, histidina e valina, presentes no sítio de interação da proteína.

Figura 14 – A- Visualização do resultado de *redocking* do ligante localizado no sítio de interação da proteína ligante do hormônio juvenil de *Aedes aegypti*, utilizando o módulo Autodock Vina. B- Diagrama de interações após *redocking*.



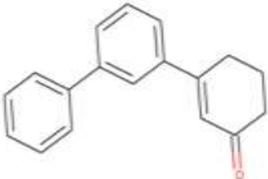
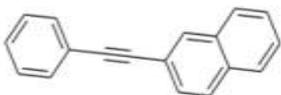
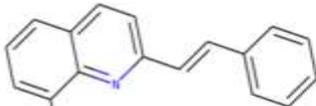
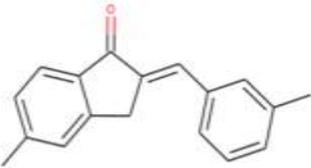
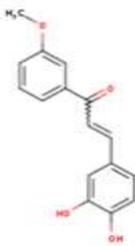
Fonte: Autoria própria. Imagens obtidas através dos softwares chimera e discovery, respectivamente.

Assim como para 6mfb, os *dockings* realizados para 5V13 foram a partir da obtenção de 12.013 moléculas, sendo 11.765 provenientes do banco de dados online ZINC e 248 do banco de dados de moléculas bioativas da Caatinga.

A partir dos cálculos realizados pelos programas de ancoragem molecular foram obtidos valores de energias de ligação para diversas posições assumidas pelos ligantes no sítio de interação com a macromolécula alvo. Dessa forma, foram encontradas as melhores posições, considerando a menor energia de ligação, uma vez que, estes são os melhores valores de interação obtidos para as estruturas.

Para a confecção da Tabela 3, foram considerados os ligantes que apresentaram valores de energia de interação $\geq -10,0$ kcal/mol para o banco de dados de moléculas obtidas de plantas da caatinga $\geq -11,5$ kcal/mol para o banco de dados online ZINC.

Tabela 3 – Melhores valores de energia de interação de moléculas obtidas no banco de dados Bioma Caatinga e ZINC.

Ligante (n°)	Banco de Dados	Estrutura 2 D	Energia de Interação (kcal/mol)
ZINC1676432	ZINC		-12
ZINC000067736687	ZINC		-11,9
ZINC000004003372	ZINC		-11,8
ZINC000921263574	ZINC		-11,7
51	Bioma Caatinga		-10,3

Fonte:

Autoria própria.

5.4. Avaliação ADMETox para proteína ligante do Hormônio Juvenil de *Aedes aegypti*

As avaliações ADMETox para o hormônio juvenil também seguiram os requisitos empregados por Lipinski. Partindo das observações realizadas verifica-se que dentre as cinco moléculas elencadas com melhores valores de energia, apenas uma viola os parâmetros estabelecidos por Lipinski, a ZINC00067736697, pertencente ao banco de dados ZINC, por apresentar uma das faixas de *Log P* expressas pelo swissdock próximas a 5.

Dentro da plataforma é possível obter x faixas de *Log P*, que são calculadas por teorias físico-químicas diferentes, porém com valores relativos próximos. Dessa forma a plataforma considera a avaliação de todas as faixas para estabelecer possíveis desvios dos parâmetros estabelecidos por Lipinski.

Para as avaliações convencionadas aos filtros de características estruturais pertencentes aos filtros PAINS (“pan-assay interference compounds”) demonstram que os ligantes com melhor energia obtidos para proteína 5V13, não apresentam potencial para desenvolver atividades irregulares ou instabilidade metabólica, “falso-positivo”.

O alerta de PAINS permite identificar moléculas químicas com tendência a expressar resultados falsos positivos em triagens virtuais de alto rendimento, tal característica deve-se a facilidade em estabelecer reações de caráter inespecífico com seus alvos (DAHLIN & WALTERS 2015).

Assim como discutido anteriormente, o único ligante que possui 1 filtro indicativo de PAINS, é o ligante 51, porém valores ≤ 1 , ainda elencam a estrutura de estudo com baixa probabilidade de possuir instabilidade de ligação com seus alvos (CHAKRAVORTY,2018).

Em termos de acessibilidade sintética nota-se que todas as moléculas possuem alta capacidade de serem sintetizadas, com apenas a molécula ZINC1676432 com valor superior a 3, porém ainda considerada próxima a escala zero.

Enfatizando a abordagem ADMETox para formulações inseticidas, outra variável importante é a de solubilidade dos compostos selecionados,

averiguando sua capacidade de carregamento. Para os ligantes descritos na tabela 4, todos possuem solubilidade em água, facilitando sua utilização em bancada.

Tabela 4. Resultados obtidos através das avaliações ADMETox no software SwissADME.

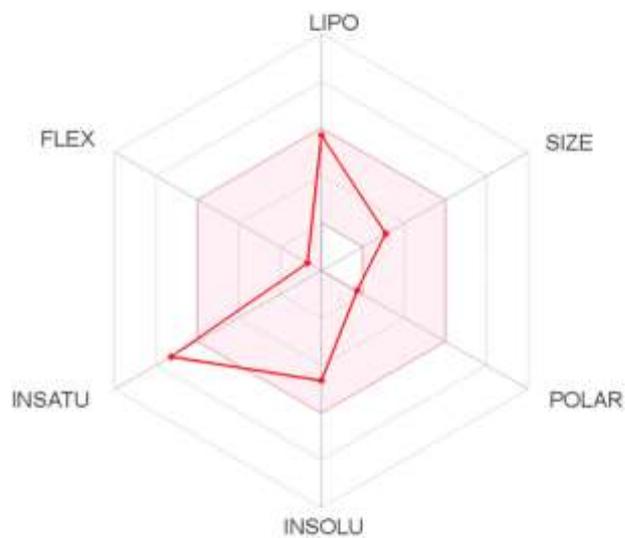
	51	ZINC000921263574	ZINC000004003372	ZINC000067736687	ZINC1676432
Fórmula Molecular	C16H14O4	C18H16O	C17H13NO	C18H12	C18H18O
Massa Molecular	270.28 g/mol	248.32 g/mol	247.29 g/mol	228.29 g/mol	250.33 g/mol
Ligações Rotacionáveis	4	1	2	0	2
Aceptores de Ligação de Hidrogênio	4	1	2	0	1
Doadores de Ligação de Hidrogênio	2	0	1	0	0
Log P	2,68	4,15	3,62	4,24	4,42
Solubilidade em Água	solúvel	moderadamente solúvel	moderadamente solúvel	moderadamente solúvel	solúvel
Absorção GI	alto	alto	alto	baixo	alto
Inibidor da CYP1A2	sim	não	sim	sim	não
Inibidor da CYP2C19	não	sim	sim	sim	sim
Inibidor da CYP2C9	sim	não	não	não	sim
Inibidor da CYP2D6	não	sim	sim	não	não
Inibidor da CYP3A4	sim	não	não	não	sim
Permeação da Pele (log Kp (cm/s))	-5,53 cm/s	-4,61 cm/s	-4,80 cm/s	-3,77 cm/s	-5,15 cm/s
Violações à Regra de Lipinski	0	0	0	1	0
Alerta PAINS	1	0	0	0	0
Acessibilidade Sintética	2,63	2,76	2,15	2,48	3,75

Fonte: Autoria própria.

Assim como para a proteína 6mfb, para a 5V13 também foram obtidos os radares de biodisponibilidade, permitindo traçar o físico-químico para as quatro moléculas e o ligante 51, já discutido anteriormente. Conforme estabelecido pela plataforma SwissADME, foi considerada a lipofilicidade, o tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação de cada ligante.

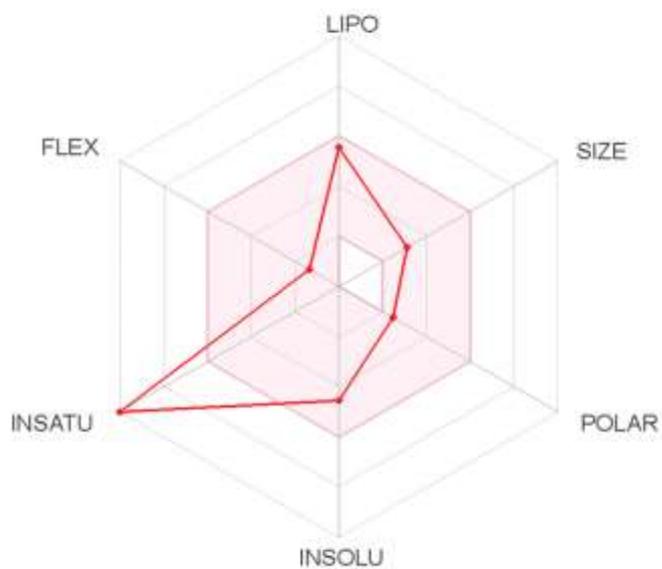
Dessa forma, observa-se que o Ligante ZINC0004003372, trata-se de uma molécula com maior grau de biodisponibilidade estando mais próxima de atender todos os requisitos físico-químicos, conforme figura 15, enquanto que os ligantes ZINC000921263574, ZINC000169599508 e ZINC000067736687 (figura 16, figura 17 e figura 18, respectivamente), possuem maior grau de saturação, com fração de carbonos na hibridização sp³ inferior a 0,25, conferindo redução ao seu potencial de biodisponibilidade.

Figura 15. Radar físico-químico referente as propriedades do Ligante ZINC0004003372.



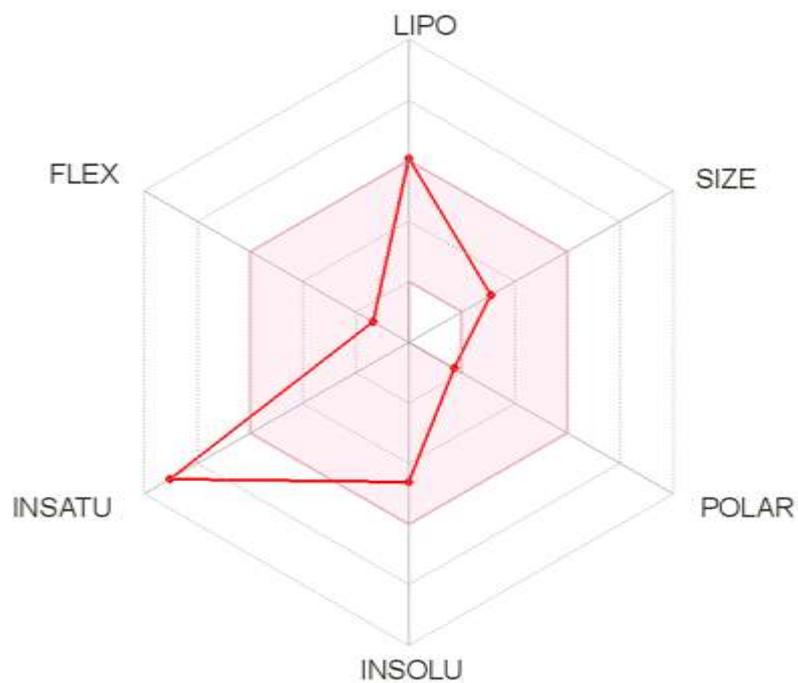
Fonte: Autoria própria. Obtido pela plataforma SwissADME.

Figura 16. Radar físico-químico referente as propriedades do Ligante ZINC000921263574.



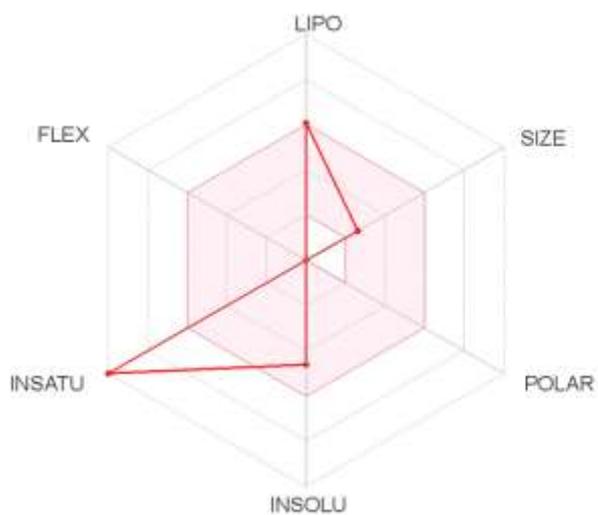
Fonte: Autoria própria. Obtido pela plataforma SwissADME.

Figura 17. Radar físico-químico referente as propriedades do Ligante ZINC000169599508.



Fonte: Autoria própria. Obtido pela plataforma SwissADME

Figura 18. Radar físico-químico referente as propriedades do Ligante ZINC000067736687.



Fonte: Autoria própria. Obtido pela plataforma SwissADME

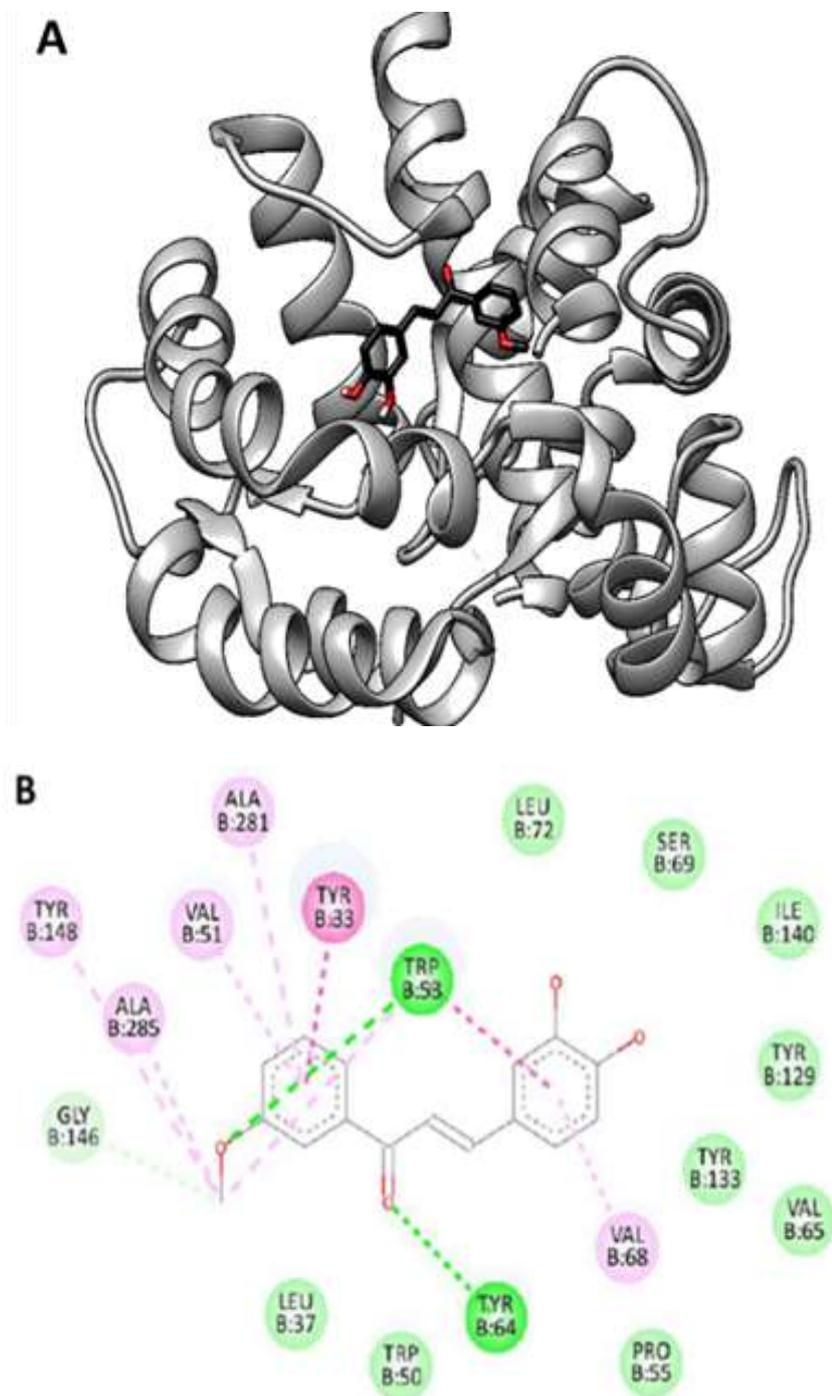
5.5. Ligante 51 pertencente ao Banco de Dados de espécies nativas da Caatinga

Através das avaliações realizadas foi possível observar que os dois alvos de estudo possuem um ligante promissor para testes *in vivo* em comum. O ligante 51 (Tabela 3) pertencente ao banco de dados próprio do laboratório, a estrutura química está associada ao grupo químico das chalconas, moléculas precursoras dos flavonóides que apresentam múltiplas atividades biológicas, diante da sua capacidade em atuar em diferentes alvos biológicos sua aplicação em áreas como controle de vetores e pragas tem sido crescente (GARRIDO *et al.*,2021).

Por ser um ligante promissor para os dois alvos de estudo da pesquisa, as interações realizadas com as proteínas foram enfatizadas, propiciando que este ligante seja o foco da pesquisa para testes de bancada.

Observando as interações realizadas com a proteína 5v13 (Figura 19), nota-se que os valores obtidos de energia podem estar relacionados com a presença de anéis aromáticos em sua estrutura, induzindo assim a formação de ligações mais fortes.

Figura 19- A- Interações na cadeia B da proteína alvo 5V13 com o ligante 51, em preto, obtido através do processo de docking no software Autodock (energia de interação: 10.3 kcal/mol). B- Diagrama de interação de aminoácidos obtido no software Discovery.





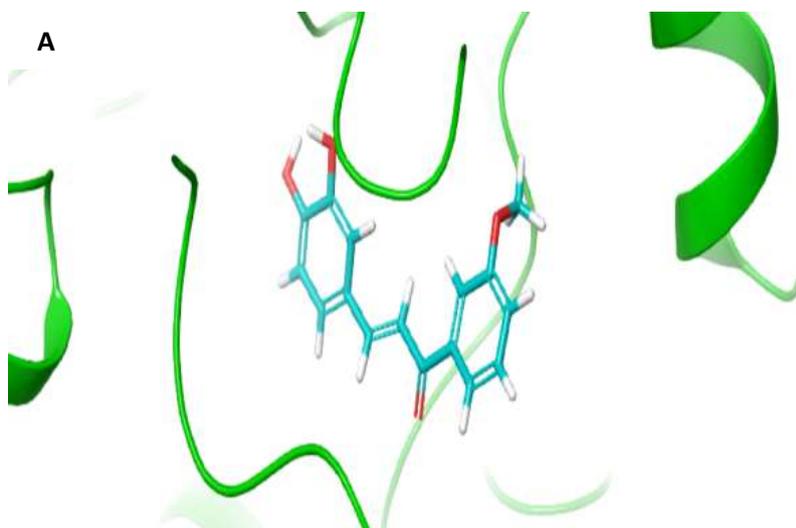
Fonte: Autoria própria. Imagens obtidas através dos softwares chimera e discovery, respectivamente.

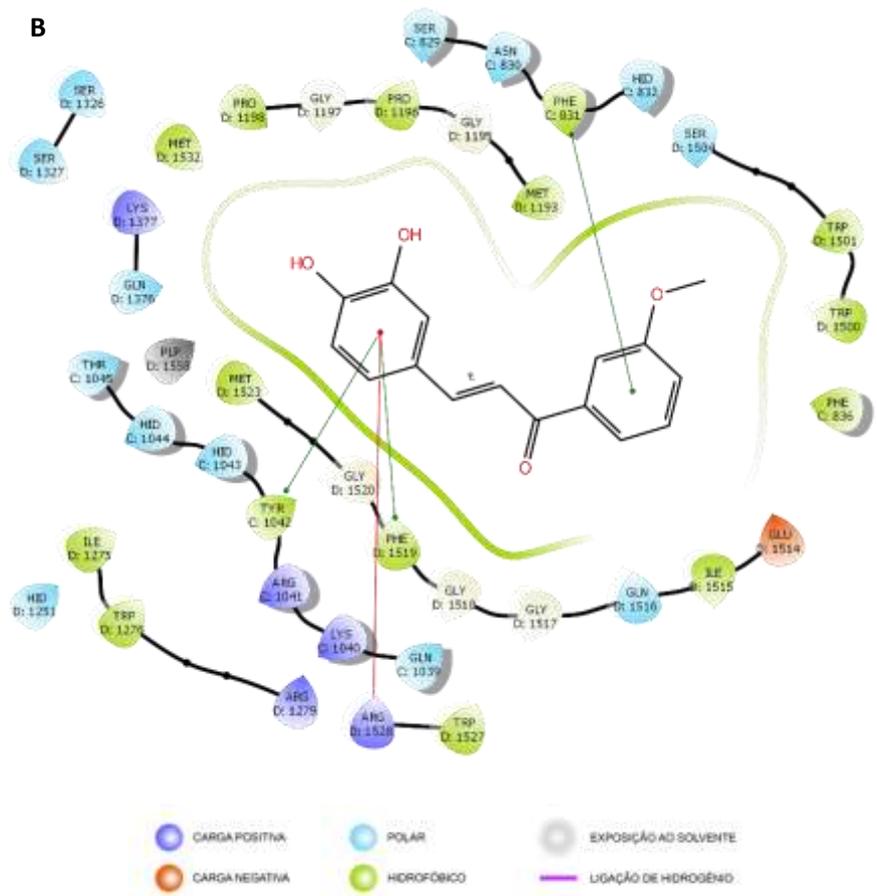
Para a proteína 6mfb, verificou-se que o Ligante 51 do banco de dados Plantas nativas da Caatinga (Figura 20) foi aquele que apresentou o melhor valor de energia de interação.

Através da avaliação do diagrama de interação, nota-se que o ligante realiza três interações do tipo pi-Stacking (PHE D:1519, TYR C:1042 e PHE C:831), dispostas pelas linhas verdes e uma do tipo pi-cátion (ARG D:1528), configurada pela linha vermelha.

Outro fator importante é que o ligante 51 não realiza interações hidrofílicas no seu sítio ativo, dessa forma, o valor de energia de interação obtido, pode estar correlacionado a uma maior hidrofobicidade, quando comparado ao padrão de ligação do ligante cristalográfico.

Figura 20 – A- Interações na cadeia da proteína alvo 6mfb com o ligante 51, em azul, obtido através do processo de docking no software Autodock (energia de interação: -9.2 kcal/mol). B- Diagrama de interação de aminoácidos obtido no software Discovery.





Fonte: Autoria Própria. Imagens obtidas através dos softwares chimera e discovery, respectivamente.

Após apreciação dos resultados, afim de subsidiar direcionamento para o embasamento teórico referente as potenciais plantas pertencentes ao domínio fitogeográfico da caatinga ricas em chalconas e, conseqüentemente, com perfil promissor para estudo in vitro de atividade larvicida para *Ae. aegypti*, foi realizada uma busca na literatura para compilação dessas espécies.

Dentre as espécies referenciadas, *Myracrodruon urundeuva* ou Aroreira do sertão, como é conhecida popularmente apresenta em estudos fitoquímicos realizados uma fração rica em chalconas, com maior teor expresso na casca do caule, obtida através de fracionamento com extrato de acetato de etila em estudo

realizado por Viana, Bandeira e Matos (2003), resultando em isolamento de três chalconas diméricas.

Outra espécie promissora é a *Libidibia ferrea*, denominada em âmbito popular como pau ferro ou jucaína, planta da caatinga que é característica do estado do Ceará, e apresenta potencial fitoquímico descrito em estudos como o realizado por Gonzalez (2005), que direcionam a presença de metabólitos como a chalconas.

Ademais, trata-se uma planta com alto potencial farmacológico estando incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) – RENISUS, favorecendo a ênfase de estudos com essa espécie (DA SILVA, 2014).

6.0 Considerações finais

Durante o desenvolvimento da pesquisa foi realizada uma triagem virtual com as moléculas oriundas do banco de dados ZINC e de Plantas bioativas da Caatinga. Após o procedimento de redocking para ambos os alvos moleculares, 6mfb e 5v13, obteve-se resultados de RMSD menores que 2 Å, possibilitando assim a utilização das proteínas e continuidade com os procedimentos de *docking*.

Neste sentido, foi possível avaliar que alguns grupos de moléculas alcançaram resultados de interação melhores que a do ligante cristalográfico. Assim essas moléculas possuem potencial para serem utilizadas em testes biológicos de bancada.

Em complemento à obtenção de valores de energia de interação, o estudo avaliou parâmetros físico-químicos que são considerados essenciais para o funcionamento adequado em meio biológico, bem como ao interagir com o meio ambiente. As avaliações ADMETox, permitiram ampliar a compreensão sobre propriedades gerais do grupo de moléculas avaliadas *in silico*, fornecendo maior subsidio e direcionamento para continuidade dos estudos em bancada.

Dessa forma, é possível considerar que a pesquisa atingiu os objetivos pré-estabelecidos, dando ênfase para o ligante 51 do banco de dados de plantas nativas da Caatinga, molécula considerada a mais promissora para realização dos testes *in vivo* em *Ae. aegypti*. A mesma pertence ao grupo químico das chalconas, o qual é vastamente encontrado em plantas, possui relativa facilidade sintética e preço acessível por fontes comerciais.

Diante disso, o estudo desenvolvido viabiliza sobremaneira os estudos em bancada visando aplicabilidade da pesquisa, etapa atualmente em andamento no nosso laboratório. Além de incentivar pesquisas que utilizem moléculas pertencentes aos biomas brasileiros como possíveis fontes inseticidas, atrelados ao uso de ferramentas computacionais.

7.0 Referências Bibliográficas

ADELUSI, Temitope Isaac et al. Dietary polyphenols mitigate SARS-CoV-2 main protease (Mpro)–Molecular dynamics, molecular mechanics, and density functional theory investigations. **Journal of molecular structure**, v. 1250, p. 131879, 2022.

ALVES, D. B. C. D. Síntese, Avaliação Da Atividade Larvívica E Estudo Dos Alvos Biológicos De Protótipos Moleculares Contendo Anéis Do 1,2,4-Oxadiazol E Do Isoxazol. Tese (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

AMARAL, C.P.M.; Criação em massa de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) para aplicação no controle vetorial autócida: validação de uma linhagem, otimização e planejamento. Tese (Dissertação de Doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo 2018.

ARAÚJO, Ana Paula et al. The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2013.

ARAUJO, J.L.; SANTOS, G.T.; BASTOS, R.S.; LIMA, F.C.A.; ROCHA, J.A. Predição computacional de alvos moleculares de um complexo metálico de rutênio com epissopiloturina e óxido nítrico. *Revista de Saúde*. 2020 Jan./Jun.; 11 (1): 42-48.

ARDUINO, B.M.; MUCCI, F. L.; SANTOS, L. M.; Importance of microenvironment to arbovirus vector distribution in an urban area, São Paulo, Brazil, *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*. Vol.:53, 2020.

BHATT, Samir et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.

CARVALHO, Daniella Romano de. **Enzimas calicreína e ciclooxigenase imobilizadas: Estudo de condições para triagem de inibidores**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2021

CHAKRAVORTY, Subhas J. et al. Nuisance compounds, PAINS filters, and dark chemical matter in the GSK HTS collection. *SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D*, v. 23, n. 6, p. 532-545, 2018.

CHOI, Yong-Soo et al. Molecular Characterization of Juvenile Hormone Esterase like (JHE-like) in *Apis cerana*. **Journal of Apiculture**, v. 32, n. 4, p. 353-357, 2017.

COSTA, Cristiano Fernandes da et al. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, p. e0006594, 2018.

COSTA, J. POTENCIAL USO DA MANIPUEIRA NO CONTROLE LARVICIDA DO AEDES AEGYPTI. Tese (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Sergipe, 2018.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–13, 2017.

DA SILVA, C.F. *et al.* Phenotypic evaluation and in silico ADMET properties of novel arylimidamides in acute mouse models of *Trypanosoma cruzi* infection. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 1095, 2017.

DA SILVA, F.A, SIMBIOSE MICORRÍZICA ARBUSCULAR EM PAU-FERRO (*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea*) VISANDO MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FITOQUÍMICOS FOLIARES COM POTENCIAL MEDICINAL. Tese (Dissertação de Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2014.

DAHLIN, Jayme L. et al. PAINS in the assay: chemical mechanisms of assay interference and promiscuous enzymatic inhibition observed during a sulfhydryl-scavenging HTS. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2091-2113, 2015.

EBERHARDT, Jerome et al. AutoDock Vina 1.2. 0: New docking methods, expanded force field, and python bindings. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 8, p. 3891-3898, 2021.

ERTL, Peter; SCHUFFENHAUER, Ansgar. Estimation of synthetic accessibility score of drug-like molecules based on molecular complexity and fragment contributions. **Journal of cheminformatics**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2009.

FOR CHIKUNGUNYA, The Translational Research Consortia TRC. Current Status of Chikungunya in India. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

FREITAS, Paula de Souza Silva et al. Síndrome congênita do vírus Zika: perfil sociodemográfico das mães. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 43, 2019.

GARRIDO, Raphael Mota; KOLB, Rosana Marta. Sustentabilidade na agricultura. **Aprendendo Ciência (ISSN 2237-8766)**, v. 10, n. 1, p. 43-46, 2021.

GILBERT, J. K; JUSTI, R. Modelling-based Teaching in Science Education. 1. ed. Netherlands: Springer, p. 17-40, 2016.

GONZALEZ, F.G. Estudo farmacognóstico e farmacológico de *Caesalpinia ferrea* Martius. 2005. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GROSSI, M. S. Isolamento, identificação e desenvolvimento de compostos com potencial atividade em *Aedes aegypti*. Tese (Dissertação de Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

HARAPAN, Harapan et al. Dengue: a minireview. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 829, 2020.

HERRERA-CALDERON, Oscar et al. GC-MS Profile, Antioxidant Activity, and In Silico Study of the Essential Oil from *Schinus molle* L. Leaves in the Presence of Mosquito Juvenile Hormone-Binding Protein (mJHBP) from *Aedes aegypti*. **BioMed Research International**, v. 2022, 2022.

IWAMURA, T.; HOSLT, G.A.; MURRAY, A. K. Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. *Nature Communications*, v.11., 2020.

KAVLOCK, Robert J. et al. Computational toxicology—a state of the science mini review. **Toxicological sciences**, v. 103, n. 1, p. 14-27, 2008.

Lombardino JG, Lowe JA. The role of the medicinal chemist in drug discovery — Thennow. **Nat Rev Drug Discov**, 2004.

LOPES, Gabriel; SILVA, André Felipe Cândido da. O *Aedes aegypti* e os mosquitos na historiografia: reflexões e controvérsias. *Tempo e Argumento*, Florianópolis, v. 11, n. 26, p. 67 - 113, jan./abr. 2019.

MA, Wenqiang et al. Zika virus causes testis damage and leads to male infertility in mice. **Cell**, v. 167, n. 6, p. 1511-1524. e10, 2016.

MACIEL, G. L.; OLIVEIRA, A.A.; ROMÃO, T.P; Discovery of 1,2,4-oxadiazole derivatives as a novel class of noncompetitive inhibitors of 3-hydroxykynurenine transaminase (HKT) from *Aedes aegypti*. *Journal Bioorganic e Medicinal Chemistry*, 2019.

MACIEL, Larissa Gonçalves. A enzima 3-hidróxi-quinurenina transaminase de *Aedes Aegypti* como alvo de 1, 2, 4-oxadiazóis. 2020.

MAGALHÃES, Natália Mendes Gomes. *Vismia gracilis* Hieron.(Hypericaceae): caracterizações químicas e atividade biológica em *Aedes aegypti*. 2020.

MAIA, R.C.P.; Investigação do Comportamento de Tolerância ao n, n-dimetilbenzilamida (DEET) em populações de *Aedes aegypti*, Tese (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2020.

MIKOVSKI D.; RIBAS, C. L. J.; BASSO, J.; Química Medicinal E A Sua Importância No Desenvolvimento De Novos Fármacos. Revista Saúde e Desenvolvimento, vol.12, n.13, 2018.

MOREIRA, M.K.; MAGALHÃES, M. C.; *Aedes aegypti* in the network: an analysis of combat strategies against the mosquito in the sites of Brazil's National Health Department, Revista Mídia Cotidiano, vol.13,2019.

NASCIMENTO, Josué Bandeira do et al. Investigação da presença de anticorpos antidengue em indivíduos com quadro clínico de Dengue, Zika e Chikungunya. 2017.

OLIVEIRA, C. S. W. G.; Avaliação dos danos morfológicos e estruturais sofridos por larvas do terceiro instar de *Stegomyia aegypti*, expostas ao óleo essencial de *schinus terebenthifolia raddi* (linnaeus, 1762). Tese (Dissertação Mestrado). Universidade Vila Velha. Espírito Santo,2020.

PARK, Dong Hwan et al. Mosquito larvicidal activities of farnesol and farnesyl acetate via regulation of juvenile hormone receptor complex formation in *Aedes* mosquito. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 23, n. 3, p. 689-693, 2020.

PESSOA, Letície Zulmira da Silva et al. Nanosuspensão de quercetina: obtenção, caracterização e avaliação da atividade larvicida frente a *Aedes Aegypti* (Linnaeus 1792)(Diptera: Culicidae). 2018.

PHAM, T. Ngoc Han et al. Improving ligand-ranking of AutoDock Vina by changing the empirical parameters. **Journal of Computational Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 160-169, 2022.

PHAM, T. Ngoc Han et al. Improving ligand-ranking of AutoDock Vina by changing the empirical parameters. **Journal of Computational Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 160-169, 2022.

PHONG, Nguyen Viet et al. SARS-CoV-2 main protease and papain-like protease inhibition by abietane-type diterpenes isolated from the branches of *Glyptostrobos pensilis* using molecular docking studies. **Natural Product Research**, p. 1-8, 2022.

RIBEIRO, A. F. Ação do Regulador de Crescimento de Artrópodes, Piriproxifen, sobre *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), em infestações artificiais, em coelhos. Tese (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

RODRIGUEZ, M.M; RUIZ, A.; PIEDRA, L.; Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Boyeros municipality, Cuba and associated mechanisms. **Journal Acta Tropica**,2020.

SANTOS, P.L.F.; SILVA, G.R.L; Predição Numérica Do Controle Mecânico Na Dinâmica Populacional Dos Mosquitos Da Dengue. Rev. Bras. Biom., Lavras, v.36, n.2, p.316-335, 2018.

SCHULLER, Marion et al. Fragment binding to the Nsp3 macrodomain of SARS-CoV-2 identified through crystallographic screening and computational docking. **Science advances**, v. 7, n. 16, p. eabf8711, 2021.

SEGATA, J.O. Aedes aegypti e o digital. Horizontes Antropológicos, v. 23, n.48, p.19-48,2017.

SILVA, Nayara Messias da et al. Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, p. e2017127, 2018.

Sippy, R., Lippi, C., Stewart, A., Ryan, S. Endemic and emerging arboviruses of mosquitoes in Ecuador. Revista Prática Familiar Rural.Vol.5, 2020.

SOARES-DA-SILVA, Joelma et al. Isolation of Bacillus thuringiensis from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, p. 01-06, 2015.

TETKO, Igor V. et al. Can we estimate the accuracy of ADME–Tox predictions. **Drug discovery today**, v. 11, n. 15-16, p. 700-707, 2006.

TOKACHIL, Najir; YUSOFF, Nuraini. Effect of rainfall duration on *Aedes aegypti* population. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing LLC, 2018.

TRIPATH, A.; KRISHNA, K. Molecular docking: a structure-based drug design approach, J. bioinformatics, v.2, n.1, p. 1015, 2017.

VALLE, Denise; BELINATO, Thiago Affonso; MARTINS, A. de J. Controle químico de *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas e alternativas. **Dengue: teorias e práticas Rio de Janeiro: Fiocruz**, p. 93-126, 2015.

VIANA,G.S.B; BANDEIRA, M.A.M; MATOS, F.J.A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from Myracrodruon urundeuva Allemão. Phytomedicine. V.10, p.189-195,2003.

WILDER-SMITH, Annelies et al. Dengue. **The Lancet**, v. 393, n. 10169, p. 350-363, 2019.

ZARA, Ana Laura de Sene Amâncio et al. Estratégias de controle do Aedes aegypti: uma revisão. Epidemiol. Serv. Saúde, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p.1-2, 2016.