



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO CIÊNCIAS DA SAÚDE E BIOLÓGICAS**  
**MESTRADO ACADÊMICO**

**THALYTA JULYANNE SILVA DE OLIVEIRA**

**ESTUDOS IN VIVO E IN SILICO BASEADOS EM METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS DA CAATINGA E NA ESPÉCIE CENOSTIGMA  
PYRAMIDALE (CATINGUEIRA) COMO POTENCIAIS LARVICIDAS EM  
AEDES AEGYPTI**

**PETROLINA-PE**

**2023**

**THALYTA JULYANNE SILVA DE OLIVEIRA**

**ESTUDOS IN VIVO E IN SILICO BASEADOS EM METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS DA CAATINGA E NA ESPÉCIE CENOSTIGMA  
PYRAMIDALE (CATINGUEIRA) COMO POTENCIAIS LARVICIDAS EM  
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.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Beserra de Alencar Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Feliciano Carmo

**PETROLINA- PE**

**2023**

Oliveira, Thalyta Julyanne Silva de  
O48e Estudos in vivo e in silico baseados em metabólitos Secundários da caatinga e na espécie cenostigma Pyramidale (catingueira) como potenciais larvicidas em Aedes aegypti / Thalyta Julyanne Silva de Oliveira. – Petrolina-PE, 2023.  
xviii, 98 f. : il. ; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde e Biológicas) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina-PE, 2023

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

Inclui referências.

1. Docking molecular. 2. Aedes aegypti. 3. Atividade larvicida - Cenostigma pyramidale. 4. Metabólitos secundários - Caatinga. I. Título. II. Alencar Filho, Edilson Beserra de. III. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 614.4323

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO CIÊNCIAS DA SAÚDE E BIOLÓGICAS**  
**MESTRADO ACADÊMICO**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

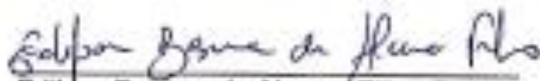
**THALYTA JULYANNE SILVA DE OLIVEIRA**

**ESTUDOS IN VIVO E IN SILICO BASEADOS EM METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS DA CAATINGA E NA ESPÉCIE CENOSTIGMA  
PYRAMIDALE (CATINGUEIRA) COMO POTENCIAIS LARVICIDAS  
EM AEDES AEGYPTI**

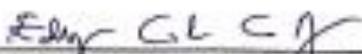
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências com ênfase na linha de pesquisa: Biodiversidade, Tecnologia e Recursos Naturais, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovado em: 28 de Fevereiro de 2023

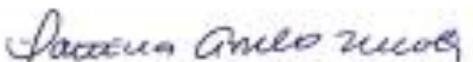
**Banca Examinadora**



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



Edigênia Cavalcante da Cruz Araújo, Doutora  
Universidade Federal do Vale do São Francisco – Univasf



Patricia Avello Nicola, Doutora  
Universidade Federal do Vale do São Francisco – Univasf

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus.

Ao meu orientador Edilson Beserra por todo ensinamento, dedicação e compreensão.

Aos colegas do Laboratório de Modelagem Molecular Aplicada à Farmácia (LAMMAF), João, Cíntia, Anderson, Vanessa, Luana e Amanda, que contribuíram na minha formação de mestre.

À minha mãe Eliane Silva de Oliveira pelo seu apoio e suporte de sempre.

Aos meus irmãos, Elayne, Wesley e Rayane.

Minha avó Julia.

Minha amiga Mirella.

A Silvandira e sua filha Sarah que me acolheram nos meses que morei em Petrolina-PE.

Ao Programa de Pós Graduação Ciências da Saúde e Biológicas (PPGCSB).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

A Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) pela oportunidade acadêmica.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

(Josué 1:9)

## RESUMO

O *A. aegypti* é uma espécie vetora de arboviroses de importância mundial, considerando a grande incidência anual dessas infecções virais, levando a quadros de doença e óbito. Este mosquito apresenta capacidade de resistência a inseticidas, os quais ainda são um dos principais métodos de controle, sendo considerada necessária a busca por novas alternativas potencialmente seguras e eficazes. As abordagens *in silico* tornaram-se métodos promissores na busca por ligantes com potencial atividade biológica devido a economia de tempo e dinheiro, permitindo ainda testes de bancada de forma direcionada. A Proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) tem função de realizar o transporte intracelular de colesterol no *A. aegypti* e sua inibição acarreta danos, principalmente na fase larval do inseto. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo *in vitro* e *in silico*, com base em metabólitos secundários da caatinga e da espécie vegetal *Cenostigma pyramidale* (catingueira) como potenciais larvicidas em *A. aegypti*. A utilização da planta veio a partir de trabalhos prévios do nosso grupo, que mostraram um biflavonóide presente nesta espécie como ligante de alta afinidade por PCE-2. Compostos análogos a metabólitos secundários, relatados como ligantes, foram investigados através de *screening* virtual por *Docking*. Os testes *in vitro* foram realizados com larvas em fase L3 e concentrações de frações obtidas de *C. pyramidale* à 500 ppm, para triagem inicial, bem como 700-100 ppm para obtenção do IC<sub>50</sub>. A PCE-2 foi extraída da plataforma RSCB-PDB (PDB ID: 1PZ4) e o *docking* molecular foi realizado no programa *Autodock vina*. Utilizou-se o banco de dados *PubChem* na busca por análogos da Ioniflavona, fargesina e proximadiol, previamente evidenciados. Os resultados indicaram que a fração metanólica e clorofórmica de *C. pyramidale* apresentaram potencial larvicida, confirmando a evidência da Ioniflavona como principal inibidor, além dos requisitos estruturais de biflavonóides e identificação de outros análogos com boas energias de interação para futuros direcionamentos.

**Palavras-chave:** *Docking molecular*; *Aedes aegypti*; Atividade larvicida; *Cenostigma pyramidale*; Metabólitos secundários; Caatinga.

## ABSTRACT

*A. aegypti* is a vector species of arboviruses of worldwide importance, considering the high annual incidence of these viral infections, leading to illness and death. This mosquito has the ability to resist insecticides, which are still one of the main methods of control, and it is considered necessary to search for new potentially safe and effective alternatives. *In silico* approaches have become promising methods in the search for ligands with potential biological activity due to time and money savings, also allowing bench tests in a targeted way. The sterol-carrying protein-2 (PCE-2) has the function of carrying out the intracellular transport of cholesterol in *A. aegypti* and its inhibition causes damage, mainly in the larval phase of the insect. The objective of this work was to carry out an *in vitro* and *in silico* study, based on secondary metabolites from the caatinga and the plant species *Cenostigma pyramidale* (catingueira) as potential larvicides in *A. aegypti*. The use of the plant came from previous work by our group, which showed a biflavonoid present in this species as a high affinity ligand for PCE-2. Furthermore, analogues to secondary metabolites, also reported as ligands in these previous works, were investigated here through *virtual screening* by *Docking*. The *in vitro* tests were carried out with larvae in the L3 phase and concentrations of fractions obtained from *C. pyramidale* at 500 ppm, for initial screening, as well as 700-100 ppm to obtain the IC<sub>50</sub>. PCE-2 was extracted from the RSCB-PDB platform (PDB ID: 1PZ4) and molecular docking was performed using the *Autodock vina* program. The PubChem database was used in the search for analogues of loniflavone, fargesin and proximadiol, previously evidenced. The results indicated that the methanolic and chloroformic fraction of *C. pyramidale* showed larvicidal potential, further confirming the evidence of loniflavone as the main inhibitor, in addition to the structural requirements of biflavonoids and identification of other analogues with good interaction energies for future directions.

**Keywords:** *Molecular docking; Aedes aegypti; Larvicidal activity; Cenostigma pyramidale; Secondary metabolites; Caatinga.*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Desenvolvimento do mosquito *A. aegypti*. Fase de ovo, larva (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto macho e fêmea. 22
- Figura 2:** Registro fotográfico da espécie *Cenostigma pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis. 32
- Figura 3:** Medianas da porcentagem de letalidade para as frações obtidas de *C. pyramidale* contra larvas (L3) de *A. aegypti*, a 500 ppm. (ME: Metanólico; AQ: Aquoso; ACE: Acetato de etila; 221 HE: Hexano; CL: clorofórmio. As barras verticais representam o erro padrão). 44
- Figura 4:** Proteína carreadora de esteróis-2 (PCE-2) juntamente com seu ligante co-cristalográfico (ácido palmítico) e enumeração das  $\alpha$ -hélices ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\alpha_4$ ) e folhas-  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$  e  $\beta_5$ ) de acordo com sua ocorrência na estrutura (A). Ligante co-cristalográfico ácido palmítico (AP) (B). 44
- Figura 5:** Estrutura 2D do ácido palmítico (AP) (A), sobreposição em ciano (ligante co-cristalográfico), rosa (*redocking*) acoplados na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B) e mapa de interação 2D (C). 46
- Figura 6:** Estrutura 2D do composto LNF (A), *docking molecular* na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B) e mapa de interação 2D (C). 50
- Figura 7:** Estrutura 2D do composto TAX (A), *docking molecular* na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B) e mapa de interação 2D (C). 51
- Figura 8:** Estrutura 2D do composto APG (A), *docking molecular* na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B) e mapa de interação 2D (C). 52
- Figura 9:** Estrutura 2D do composto KAE (A), *docking molecular* na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B) e mapa de interação 2D (C). 52
- Figura 10:** Estrutura 2D do composto CESA (A), *docking molecular* na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B) e mapa de interação 2D (C). 53

- Figura 11:** Sobreposição comparativa do AP e dos compostos presentes na fração metanólica (ME) e clorofórmica (CL) do extrato de *C. pyramidale*. AP (cinza), LNF (bege), CESA (azul), KAE(lilás), API (verde) e TAX (rosa). 54
- Figura 12:** Estruturas 2D dos compostos utilizados na triagem virtual. Loniflavona (A), fargesina (B) e proximadiol (C). 55
- Figura 13:** Estrutura 2D do composto 51 (A), *docking molecular* do composto análogo da L na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B) e mapa de interação 2D (C). 57
- Figura 14:** Estrutura 2D do composto 46 (A), *docking molecular* do composto análogo da L na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C). 58
- Figura 15:** Estrutura 2D do composto 122 (A), *docking molecular* do composto análogo da L na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C). 59
- Figura 16:** Estrutura 2D do composto 158 (A), *docking molecular* do composto análogo da L na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C). 60
- Figura 17:** Estrutura 2D do composto 26 (A), *docking molecular* do composto análogo da L na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C). 61
- Figura 18:** Estrutura 2D do composto 151 (A), *docking molecular* do composto análogo da F na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C). 62
- Figura 19:** Estrutura 2D do composto 12 (A), *docking molecular* do composto análogo da F na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C). 63
- Figura 20:** Estrutura 2D do composto 167 (A), *docking molecular* do composto análogo da F na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C). 63

**Figura 21:** Estrutura 2D do composto 45 (A), *docking molecular* do composto 64 análogo da F na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).

**Figura 22:** Estrutura 2D do composto 70 (A), *docking molecular* do composto 65 análogo da F na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).

**Figura 23:** Estrutura 2D do composto 37 (A), *docking molecular* do composto 66 análogo do P na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).

**Figura 24:** Estrutura 2D do composto 67 (A), *docking molecular* do composto 67 análogo do P na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).

**Figura 25:** Estrutura 2D do composto 74 (A), *docking molecular* do composto 68 análogo do P na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).

**Figura 26:** Estrutura 2D do composto 23 (A), *docking molecular* do composto 69 análogo do P na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).

**Figura 27:** Estrutura 2D do composto 60 (A), *docking molecular* do composto 71 análogo do P na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).

**Figura 28:** Sobreposição comparativa do AP (preto) e análogos da Ioniflavona, 72 L122 (laranja), L158 (azul), L26 (verde), L46 (roxo) e L51 (rosa) (A), Sobreposição comparativa do AP (preto) e análogos da fargesina, F151 (verde), F167 (azul), F45 (roxo), F70 (laranja) e F12 (rosa) (B), Sobreposição comparativa do AP (preto) e análogos do proximadiol, P23 (verde), P37 (roxo), P60 (laranja), P67 (azul) e P74 (rosa) (C).

**Figura 29:** Radar de biodisponibilidade do piroproxifeno. 74

<b>Figura 30:</b> Radar de biodisponibilidade dos compostos presentes na fração metanólica (ME) e clorofórmica (CL) do extrato de <i>C. pyramidale</i> .	74
<b>Figura 31:</b> Radar de biodisponibilidade dos análogos da Loniflavona (L).	76
<b>Figura 32:</b> Radar de biodisponibilidade dos análogos da Fargesina (F).	77
<b>Figura 33:</b> Radar de biodisponibilidade dos análogos da Proximadiol (P).	78
<b>Figura 34:</b> Curva ROC gerada a partir da análise de compostos ativos (True Positive Fraction) e inativos/ decoys (False Positive Fraction).	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2:</b> Energia de ligação do ligante co-cristalográfico (AP) e as melhores energias de ligação (Kcal / mol) dos compostos presentes na fração clorofórmica (CL).	49
<b>Tabela 3:</b> Energia de ligação do ligante co-cristalográfico (AP) e as melhores energias de ligação (Kcal / mol) da triagem virtual dos análogos da Ioniflavona (L), fargesina (F) e proximadiol (P) com valores maiores que $-7,0$ .	56
<b>Tabela 4:</b> Propriedades ADMET dos compostos presentes na fração metanólica (ME) e clorofórmica (CL) do extrato de <i>C. pyramidale</i> .	75
<b>Tabela 5:</b> Propriedades ADMET das moléculas análogas a L, F e P.	79
<b>Tabela 6:</b> Moléculas ativas com atividade <i>in vitro</i> na PCE-2.	81

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1:** Compostos presentes no extrato das fração metanólica (ME) e 48  
clorofórmica (CL) das folhas de *C. pyramidale*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME	Absorção Distribuição Metabolismo e Excreção.
AGA	Agastiflavona.
AME	Amentoflavona.
APG	Apigenina.
AP	Ácido Palmítico.
CID	Código de Identificação.
CESA	Cesalflavona A.
CL	Clorofórmico.
DFC	Domínio Fitogeográfico Caatinga.
KAE	Kaempferol.
F	Fargesina.
L	Loniflavona.
P	Proximadiol.
LNF	Loniflavona.
ME	Metanólico.
MoReNa	Monitoramento de Resistência.
P	Proximadiol.
PCE-2	Proteína Carreadora de Esteróis-2.
POD	Podocarpus Flavona A.
ROC	Curva Característica de Operação do Receptor.
RMSD	Desvio Quadrático Médio.

SEQ	Sequóiaflavona.
TAX	Taxifolina.
5' -HYD	5' -Hydroxy-amentoflavona.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAL TEÓRICO</b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	DISTRIBUIÇÃO, ECOLOGIA, REPRODUÇÃO E ANATOMIA DE AEDES AEGYPTI	21
<b>3.2</b>	PROTEÍNA CARREADORA DE ESTERÓIS-2 DE AEDES AEGYPTI	23
<b>3.3</b>	ARBOVIROSES	25
<b>3.4</b>	RESISTÊNCIA A INSETICIDAS E ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DE AEDES AEGYPTI	26
3.4.1	<b>Mecânico</b>	27
3.4.2	<b>Químico</b>	27
3.4.3	<b>Biológico</b>	28
<b>3.5</b>	DOMÍNIO MORFOCLIMÁTICO CAATINGA, PRODUTOS NATURAIS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	28
<b>3.6</b>	SCAFFOLDS MOLECULARES: BIFLAVONÓIDE, LIGNANA E SESQUITERPENOS	29
3.6.1	<b>Biflavonóides</b>	29
3.6.2	<b>Lignanas</b>	30
3.6.3	<b>Sesquiterpenos</b>	30
<b>3.7</b>	CENOSTIGMA PYRAMIDALE (Tul.) E. GAGNON & G.P. LEWIS	31
<b>3.8</b>	QUÍMICA MEDICINAL COMPUTACIONAL	33
<b>3.9</b>	ABORDAGENS <i>IN SILICO</i>	33
3.9.1	<b>Triagem Virtual</b>	34
3.9.2	<b><i>Docking Molecular</i></b>	35
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	COLETA DO MATERIAL VEGETAL	37
<b>4.2</b>	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DA ESPÉCIE CENOSTIGMA PYRAMIDALE	37

4.3	ATIVIDADE IN VIVO SOBRE LARVAS DE AEDES AEGYPTI	37
4.4	BUSCA E OTIMIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS PRESENTES NAS FRAÇÕES METANÓLICA E CLOROFÓRMICA DE CENOSTIGMA PYRAMIDALE	38
4.5	BUSCA E OTIMIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS ANÁLOGAS A LONIFLAVONA, FARGESINA E PROXIMADIOL	39
4.6	ESTRUTURA E PREPARAÇÃO DA PROTEÍNA CARREADORA DE ESTERÓIS-2 PARA O ESTUDO DE ENCAIXE	39
4.7	REALIZAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DO <i>REDOCKING</i> MOLECULAR	40
4.8	REALIZAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DO <i>DOCKING</i> MOLECULAR	40
4.9	ANÁLISE DO RADAR DE BIODISPONIBILIDADE E DAS PROPRIEDADES ADME DOS COMPOSTOS PRESENTES NA FRAÇÃO METANÓLICA E CLOROFÓRMICA DE CENOSTIGMA PYRAMIDALE E ANÁLOGOS DA LONIFLAVONA, FARGESINA E PROXIMADIOL	40
4.10	VALIDAÇÃO DO ALGORITMO DE ENCAIXE	41
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	42
5.1	ATIVIDADE IN VIVO FRENTE LARVAS DE AEDES AEGYPTI	42
5.2	PROTEÍNA CARREADORA DE ESTERÓIS-2	43
5.3	<i>REDOCKING</i>	44
5.4	<i>DOCKING MOLECULAR</i> DOS COMPOSTOS PRESENTES NA FRAÇÃO METANÓLICA E CLOROFÓRMICA NA ESTRUTURA DA PROTEÍNA CARREADORA DE ESTERÓIS-2	46
5.5	<i>DOCKING MOLECULAR</i> DOS ANÁLOGOS DA LONIFLAVONA, FARGESINA E PROXIMADIOL NA ESTRUTURA DA PROTEÍNA CARREADORA DE ESTERÓIS-2	55
5.6	RADAR DE BIODISPONIBILIDADE E PROPRIEDADES ADME DOS COMPOSTOS PRESENTES NA FRAÇÃO METANÓLICA E CLOROFÓRMICA	72
5.7	RADAR DE BIODISPONIBILIDADE E PROPRIEDADES ADME DOS ANÁLOGOS DA LONIFLAVONA, FARGESINA E PROXIMADIOL	74
5.8	VALIDAÇÃO DO ALGORITMO DE ENCAIXE	79
6	CONCLUSÃO	82



## 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Aedes aegypti* Linnaeus (1762) é um artrópode pertencente à ordem Diptera e família Culicidae, espécie vetora de arboviroses no qual resulta na transmissão de doenças, como a dengue, febre amarela, zika e chikungunya por meio da sua picada (Mc Gregor & Connelly, 2020). O *A. aegypti* é considerado uma espécie importante no mundo e de interesse mundial da saúde devido sua capacidade de infectar milhões de pessoas e estar presente em áreas tropicais e subtropicais (França et al., 2020).

A utilização de vacinas ainda não é amplamente difundida para aplicação e não há medicamentos específicos para o tratamento dessas doenças, o controle epidemiológico tem foco no vetor *A. aegypti*, limitando seus estágios de vida (Sierra et al., 2021; Nunes et al., 2015). O uso de inseticidas sintéticos levou a resistência dos mosquitos (Achee et al., 2019) e impactos ambientais, com isso, destaca-se a necessidade de métodos alternativos para combate destes mosquitos (Fernandes et al., 2019). Nesse contexto, os inseticidas à base de produtos naturais tem sido uma alternativa aos inseticidas sintéticos (Senthil-Nathan, 2020; Silva et al., 2020).

O domínio morfoclimático caatinga está localizado no semiárido do Nordeste Brasileiro, no qual possui uma rica diversidade de plantas (Pinheiro & Nair, 2018), das quais muitas possuem variados compostos promissores farmacêuticos e alimentícios. Os produtos naturais derivados de plantas mostram-se promissores no controle de *A. aegypti* devido sua seletividade, segurança e biodegradabilidade (Fernandes et al., 2019). As plantas produzem metabólitos secundários nos quais são extraídos e purificados (Richards et al., 2016).

Para que esses produtos químicos possam ser caracterizados, há necessidade de ensaios laboratoriais nos quais podem ser caros, demorados e podem apresentar baixa taxa de sucesso (Fine et al., 2021; Khanna, 2012), com isso, abordagens *in silico* estão sendo usadas para auxílio deste processo. A triagem virtual é uma das abordagens *in silico*, com finalidade de mostrar virtualmente uma diversidade química infinita de moléculas com potencial farmacológico (Abagyan & Totrov, 2001). Consistindo na abordagem baseada na estrutura, o *docking molecular*

é o mais utilizado para prever o encaixe de moléculas orgânicas em estruturas cristalinas (Das et al., 2020; Li et al., 2021).

Em um estudo publicado recentemente por nosso grupo de pesquisas (Mourão et al., 2020) foram evidenciados 3 *scaffolds* moleculares, provenientes de plantas da caatinga, com alta afinidade pela proteína carreadora de esterol- 2 (PCE-2) do *A. aegypti*. Esta proteína tem como função realizar o transporte intracelular de colesterol (Ahmed et al, 2020), quando afetada, a proteína não sintetiza mais o colesterol levando a morte do *A. aegypti* principalmente em sua fase larval (Krebs e Lan, 2003).

Os metabólitos secundários pertencem às classes, biflavonóide, sesquiterpeno e lignana, precisamente os compostos loniflavona, proximadiol e fargesina. Dentre os mais estáveis na interação com PCE-2, destacou-se a loniflavona, um biflavonóide presente na espécie *Cenostigma pyramidale* (catingueira), com potencial larvicida desta espécie frente ao *A. aegypti* (Mourão et al., 2020).

## 2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral da pesquisa foi realizar um estudo *in vivo* e *in silico* usando análogos dos *scaffolds* moleculares já identificados, bem como a espécie vegetal *C. pyramidale*, como potenciais agentes larvicidas em *A. aegypti*.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Buscar o isolamento do biflavonóide Ioniflavona e avaliar sua atividade *in vitro* contra larvas de *A. aegypti*;
- Realizar testes *in vitro* com o extrato e frações obtidos a partir das folhas de *C. pyramidale* em larvas de *A. aegypti*;
- Racionalizar os dados identificando na literatura moléculas já relatadas nas frações e extrato de *C. pyramidale* submetidos aos testes;
- Obter virtualmente estruturas químicas de compostos análogos das classes dos biflavonóides, lignanas e sesquiterpeno;
- Realizar o *redocking* e o *docking molecular* dos compostos na PCE-2;
- Avaliar o perfil físico-químico e farmacocinético das moléculas com base nas propriedades do *SwissADME* (absorção, distribuição, metabolismo e excreção);
- Validar o algoritmo de encaixe da PCE-2;

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 DISTRIBUIÇÃO, ECOLOGIA, REPRODUÇÃO E ANATOMIA DE AEDES AEGYPTI

*Aedes aegypti* Linnaeus (1762) é uma espécie de mosquito da ordem Diptera e família Culicidae, nativa da África e amplamente distribuída em todo o mundo (Carvalho e Moreira, 2017) sendo considerada antropofílica. Acredita-se que o ingresso do mosquito no Brasil ocorreu durante o transporte de escravos, no interior de grandes navegações, no período da colonização do país (Forattini, 1996; Zara et al., 2016). Atualmente, a distribuição geográfica do *A. aegypti* inclui em grande parte as áreas tropicais e subtropicais, estando presente na África, Ásia, Américas e Oceania (Oliveira, 2015).

O *A. aegypti* é uma espécie preferencialmente diurna e tende a ser mais ativa ao amanhecer e ao anoitecer, evitando os períodos mais quentes do dia. Seu ciclo de vida compreende quatro fases distintas: ovo, larva, pupa e adulto (Farnesi et al., 2009). Vivendo em média por 30 dias. A fêmea coloca entre 150 e 200 ovos. Os ovos são pequenos, medindo cerca de 0,5 mm, formato elíptico, de cor clara no momento da oviposição e que escurece ao longo do tempo (Figura 1) (Faull e Williams, 2015). Quando imersos em água, os ovos podem eclodir em minutos mas, na ausência de água, a alta resistência à dessecação permite que os ovos permaneçam viáveis por semanas, meses ou até mesmo mais de um ano.

A eclosão do ovo dá origem a larvas, que passam por quatro *instares* (L1, L2, L3, L4) de desenvolvimento (Figura 1). As larvas de *A. aegypti* são aquáticas e se alimentam de matéria orgânica. Os hábitos alimentares das larvas não são seletivos, sendo assim, além de partículas de matéria orgânica as larvas podem ingerir inseticidas. No período em que permanecem na fase pupal, fase pela qual possuem formato de “vírgula” (Figura 1), elas não se alimentam e permanecem flutuando na superfície da água para facilitar seu voo quando adultos, a passagem da fase pupal para adulta pode durar uma hora, até que o mosquito possa voar (França et al., 2020).

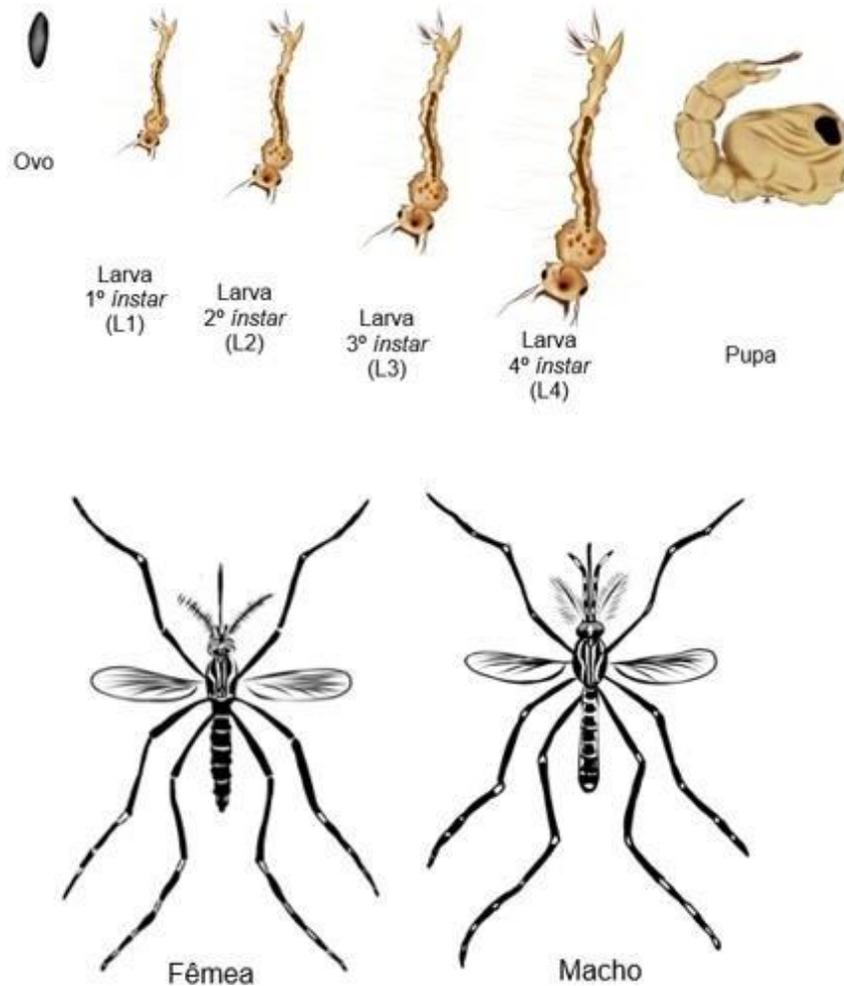
Quando adulto, possui porte de aproximadamente 5 mm de comprimento, possuindo o corpo escuro e as pernas marcadas por faixas brancas, apresentando o aspecto “listrado” (Salvi et al., 2021) no qual é a característica principal que as pessoas

veem facilmente a olho nu e conseguem distinguir parcialmente o *A. aegypti*. A fêmea dessa espécie consegue fazer várias ingestões de sangue durante um mesmo ciclo gonadotrófico e costuma depositar seus ovos em mais de um criadouro, elevando sua eficiência reprodutiva o macho alimenta-se de substâncias que contêm açúcar (néctar, seiva de plantas etc) sendo assim, apenas a fêmea transmite os arbovírus (Rey e Loubinos, 2015; Zara et al., 2016).

O dimorfismo sexual do mosquito era identificado com base no tamanho dos espécimes, pois considerava-se o macho menor do que as fêmeas, no entanto, observou-se que este não era um parâmetro ideal, devido a fatores como: a disponibilidade de alimento e a densidade larval em criadouros interferir no tamanho corporal (Forattini, 2002). Atualmente, para diferenciação sexual são consideradas a morfologia antenal no qual os machos possuem penas nas suas antenas e as fêmeas possuem cerdas, e a estrutura do aparelho bucal onde os machos apresentam palpos longos e as fêmeas palpos curtos (Figura 1) (Consoli e Oliveira, 1994).

O aumento da população de *A. aegypti* está relacionado há diversos fatores tais como, o aumento dos fatores climáticos (temperatura e pluviosidade), ações antrópicas, como o processo acelerado da urbanização, falta de eliminação da água parada em vasos de plantas, pneus, garrafas plásticas, piscinas sem uso, e recipientes pequenos, como tampas de garrafas (Busato et al., 2014; Salvi et al., 2021). Os serviços públicos são essenciais para o controle do mosquito vetor com isso, deve existir a coleta e destinação adequada de resíduos e disponibilidade de água potável para população (Tauil, 2001), ainda é observado vulnerabilidade devido o financiamento inadequado dos programas de controle de vetores, nos quais são associados ao sistemas de saúde pública (Wilder-Smith et al., 2010).

Figura 1: Desenvolvimento do mosquito *A. aegypti*. Fase de ovo, larva (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto macho e fêmea.



Fonte: autoria própria.

### 3.2 PROTEÍNA CARREADORA DE ESTERÓIS-2 DE AEDES AEGYPTI

A proteína carreadora de esterol-2 (PCE-2), também chamada de proteína de transferência de lipídios não específica, é conhecida por se ligar ao colesterol e foi descoberta há mais de 30 anos sendo considerada uma proteína pequena, com massa molecular de cerca de 13kDa (Gallegos et al., 2001; Dyer et al., 2003; Viitanenet al., 2006). A PCE-2 possui uma dobra semelhante às proteínas humanas e de coelho, no qual consiste em uma folha beta de cinco fitas acompanhada de quatro alfa-hélices que cobrem a folha-beta, nesta proteína há presença de uma grande cavidade que existe na interface da camada alfa-hélices e da folha-beta, que serve como local de ligação do ácido graxo (Dyer et al., 2003).

Pertence à família conhecida como genes PCE-2 na qual todas possuem um domínio homólogo a proteína carreadora de esterol -2 (Dyer et al., 2003). O gene PCE-2 tem dois locais de iniciação que codificam proteínas, onde compartilham um terminal C de SCP-2 comum de 13 kDa: (1) um local codifica para SCP-x de 58 kDa que é parcialmente clivado pós-tradução em PCE-2 de 13 kDa e uma proteína de 45 kDa e (2) um segundo local codifica para 15 kDa pro-PCE-2 que é completamente clivado pós-tradução em 13 kDa PCE-2 (Gallegos et al., 2001).

O esterol é um composto vital para grande parte dos insetos completarem seu ciclo de vida, entretanto os mesmos não possuem a capacidade de sintetizar o esterol onde as fêmeas realizam o repasto sanguíneo em humanos e os machos adquirem a partir de plantas onde é convertido para fitoesterol e posteriormente em colesterol para que seja possível o desenvolvimento e reprodução do inseto (Kumar et al., 2010). Esta conversão ocorre com a ajuda da PCE- 2 (Kumar et al., 2010).

A PCE-2 encontra-se expressa em níveis mais elevados no quarto instar larval de *A. aegypti* e está presente no seu intestino médio e fracamente na cabeça e no intestino posterior, nas pupas iniciais é observada no tórax, cabeça e parede corporal do abdome, mas não no intestino (Krebs & Lan, 2003), possuindo o dever de atender três necessidades biológicas: absorver o colesterol livre para a construção das membranas celulares, transferir o colesterol para o peroxissomo para catabolização e fornecer o colesterol como um precursor da mitocôndria para biossíntese de esteróide (Radek; Dyer; Lan, 2010; Krebs; Lan, 2003; Gallegos et al., 2001). Portanto, a captação e transporte de colesterol durante a alimentação dos estágios larvais são processos críticos em insetos.

A inibição da expressão da PCE-2 por meio de ligação competitiva nas larvas de último *instar* resulta em uma redução no nível de captação de colesterol, maior mortalidade e redução da fecundidade (Blitzer; Vyazunova; Lan, 2005). Em fêmeas adultas a inibição da expressão de PCE-2 leva a um nível reduzido de captação de colesterol quando ingerido sangue e pouco efeito sobre a absorção de ácido palmítico (Dyer et al., 2008). Sendo assim, torna-se interessante a inibição da PCE- 2 ainda no estágio larval para que possa ser evitado o desenvolvimento do *A. aegypti* até a fase adulta quando se torna transmissor de forma ativa de arboviroses.

Perera e Wijerathna (2019) relatam que a inibição da PCE-2 é um método promissor no controle populações de mosquitos vetores. Em estudos realizados com *docking molecular* com alvo a PCE- 2 do *A. aegypti* observou-se que os compostos alfa mangostina (-13, 65 kcal/ mol), pantenol (-9,3 kcal/ mol) (Kumar et al., 2010) 2-metil-4-oxo-3-fenilcromen-7-il) -1,3-benzodioxol -5-carboxilato (-12 kcal/ mol) 3-(4-metoxifenoxil) -2-metil-4-oxocromen-7-il]1,3-benzodioxol-5-carboxilato (-12,6 kcal/mol) (Lima et al., 2021) apresentaram afinidades promissoras com o sítio ativo da PCE-2.

### 3.3 ARBOVIROSES

Arboviroses são doenças acometidas no ser humano através de artrópodes que se alimentam de sangue, como exemplo o *A. aegypti*, no qual causa as doenças virais, dengue (DENV), febre amarela (FAV), zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) que têm sido motivo de preocupação de saúde pública em todo o mundo (Donalisio et al., 2017; Gould et al., 2017). As manifestações clínicas destas infecções por arbovírus podem variar de doença febril leve a síndromes febris hemorrágicos, problemas articulares e neurológicos (Teich; Arinelli; Fahham, 2017). O tratamento destas arboviroses se dá com o uso de analgésicos, antitérmicos e antiinflamatórios.

À prevenção das arboviroses no Brasil conta com o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), que tem como foco principal o controle do *A. aegypti* pela população e por profissionais, com apoio governamental, e com o Programa Nacional de Apoio ao Combate às Doenças Transmitidas pelo Aedes (PRONAEDES), que tem como objetivo o financiamento de projetos de combate à proliferação das doenças transmitidas pelo vetor (Teich; Arinelli; Fahham 2017).

Mesmo com os programas de prevenção há muitos registros de casos de arboviroses no Brasil de janeiro a maio de 2022, mais de 700 mil casos de dengue, aumento de 70% dos casos de chikungunya em relação ao ano anterior e de aproximadamente 200% para zika (Fiocruz, 2022). Araújo et al., (2015) e Paes de Andrade et al., (2016), relatam que existe uma baixa efetividade dos programas que tem como foco a redução das populações de vetores em níveis que poderiam interromper a transmissão das doenças. Apesar disso, é importante ressaltar que para haver uma diminuição efetivas populações de vetores é necessário a junção da ação da população e dos programas em prol do controle dos vetores.

### 3.4 RESISTÊNCIA A INSETICIDAS E ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DE Aedes Aegypti

A resistência a inseticidas pode ser descrita como um processo de evolução acelerada de uma população que responde a uma pressão seletiva, com a consequente sobrevivência dos indivíduos que possuem alelos que conferem resistência, sendo assim, um pequeno número de indivíduos possui características que permitem sua sobrevivência sob doses de inseticidas normalmente letais (Braga e Valle, 2007).

Ações para controle de insetos datam há mais de 2.000 anos na China onde eram realizados controles de pragas agrícolas. Os primeiros programas de controle eram baseados em medidas físicas e na aplicação de óleo ou de verde de Paris (acetoarsenito de cobre) nos criadouros (Rodhain e Rosen, 1997). O papel do controle de vetores na Saúde Pública é prevenir a infecção mediante o bloqueio ou redução da transmissão, sendo seus principais objetivos, manejar os problemas existentes (surto, epidemias, alta mortalidade e alta morbidade), prevenir epidemias ou a reintrodução de doenças e reduzir os fatores de risco ambiental da transmissão (Braga e Valle, 2007).

O uso de inseticidas organofosforados com propriedade larvicida tem sido a estratégia de escolha para o controle de larvas de *A. Aegypti*, porém, a Rede Nacional de Monitoramento de Resistência (MoReNa) detectou que a partir de 1999 o principal inseticida organofosforado utilizado, o Temefós Fersol 500 CE, passou a apresentar baixa eficácia, sendo substituído por inseticidas alternativos (Fonseca et al., 2019).

Com isso, outras substâncias têm sido propostas como alternativa aos inseticidas organofosforados, dentre as quais piriproxifeno (hormônio juvenil), novaluron (inibidor de quitina) e spinosad (biolarvicida) (De Jesus et al., 2021). O uso de inseticidas para controlar mosquitos deve estar sempre alinhado com o monitoramento e gerenciamento da resistência a inseticidas, que é um componente negligenciado nos esforços de controle de vetores (Dalpadado et al., 2021).

Ainda estão em desenvolvimento vacinas e terapias eficazes para a maioria das doenças humanas causadas por arbovírus (Swaminathan; Khanna, 2019;

Schram, 2016), sendo assim, os métodos de controle mais eficazes contra o vetor *A. aegypti*, podem ser categorizados em mecânicos, biológicos e químicos.

#### 3.4.1 Mecânico

A ação mecânica consiste em reduzir o contato do mosquito com a população humana, podendo haver a utilização de redes ou telas em portas e janelas para impedir o aparecimento do mosquito na área intradomiciliar como também a eliminação dos possíveis criadouros, retirando a água parada e limpando regularmente reservatórios de água (Morrison et al., 2008). É importante relatar um estudo realizado por Getachew et al. (2015) onde observaram que entre 301 casas em Dire Dawa analisadas com relação a presença de focos de *A. aegypti*, 208 casas possuíam focos nos quais as larvas e pupas foram encontradas em pneus (33,33%), tambores de plástico (24,19%), galões (19,01%) e barris. A grande parte destes materiais que serviram de focos estavam ao ar livre (93,06%), descobertos ou parcialmente cobertos (87,6%) e expostos total ou parcialmente ao sol (67,86%).

#### 3.4.2 Químico

O controle químico se dá na utilização de inseticidas que exterminam mosquitos na fase adulta e larval. São utilizados produtos químicos com ação neurotóxica, inibidores de crescimento e síntese proteica (Braga e Valle, 2007; Hamid et al., 2018). A utilização de inseticidas sintéticos no controle do mosquito possibilita a seleção de indivíduos resistentes podendo influenciar negativamente o controle do vetor e agredir o meio ambiente (Zara et al., 2016). Sendo assim, Braga e Valle (2007) ressaltam a importância do controle químico principalmente na fase larval de *A. aegypti* através da atividade inseticida provinda de plantas. Variados trabalhos afirmam esta eficácia, como, a atividade larvicida de *Gallesia integrifolia* (Pau-d'algo) (Bortolucci et al., 2021), *Ocimum americanum* (alfavaca do campo), *Nepeta cataria* (erva de gato), *Hyssopus officinalis* (erva sagrada), *Origanum scabrum* (orégano) (Santos et al., 2022), dentre outras.

### 3.4.3 Biológico

O controle biológico compreende a utilização de espécies de bactérias como as *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*, utilização de pequenos crustáceos Copépodes, como (*Mesocyclops leuckuarti* e *Mesocyclops scrassus*), peixes larvíforos, dentre eles (*Poecilia reticulata*, *Gambusia sp*, *Tilapia mossambica*) (Udayanga, et al., 2019; Han et al., 2015; Cavalcanti et al., 2007), fungos patógenos (*Metharizium anisopliae* e *Lagenedium giganteum*) e parasitas nematódeos (*Romanomermis culicivorax* e *Romanomermis iyengari*) (Scholte et al., 2003). Atualmente tem-se estudado bastante sobre o método *Wolbachia* no qual introduz a cepa da bactéria em diferentes estratégias de controle: (1) mosquitos machos com a cepa se juntam com mosquitos fêmeas não infectadas e com isso causa mortalidade, (2) redução do tempo de vida dos mosquitos pela metade após introdução da cepa e (3) invasão de uma cepa de *Wolbachia* que inibe a transmissão, reduzindo a capacidade dos vetores portadores de vírus de transmitir infecções (O'connor et al., 2012; Walker et al., 2011).

### 3.5 DOMÍNIO MORFOCLIMÁTICO CAATINGA, PRODUTOS NATURAIS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Caracterizar a caatinga como um bioma é um conceito restrito que não leva em consideração os variados tipos de substratos, fitofisionomias e florísticas. A partir desta restrição conceitual caracteriza-se atualmente o bioma caatinga como sendo um Domínio Morfoclimático Caatinga (DMC) composto por diferentes tipos de substratos, fitofisionomias e grupos florísticos (Moro et al., 2016), é uma das maiores áreas semiáridas tropicais do mundo localizado no Nordeste do Brasil com extensão de mais de 800.000 km<sup>2</sup> (Moro et al., 2016). Possui uma forte sazonalidade, com a estação seca durando 6-11 meses a cada ano e na maioria das áreas recebendo menos de 1.000 mm de chuva anual (IBGE, 2002; Nimer, 1989).

É rico em diversidade e endemismo, na qual apresenta cerca de 4.322 espécies de plantas, 744 endêmicas, distribuídas em 950 gêneros e 152 famílias, incluindo 29 gêneros endêmicos da região (Fernandes e Queiroz, 2018; Torres et al., 2021). Estima-se que apenas 8% da biodiversidade vegetal existente no DFC tem seus compostos ativos caracterizados, com 1.100 espécies avaliadas em relação às

suas propriedades medicinais (Brito et al., 2015; Torres et al., 2021). Parte desses compostos são provenientes de metabólitos secundários que são responsáveis por apresentar efeitos terapêuticos.

Metabólitos secundários são produtos naturais derivados de determinadas vias bioquímicas que não são totalmente necessárias para a vida das plantas, embora desempenhem um papel definitivo em sua sobrevivência (Zhang et al., 2021). A produção dos metabólitos secundários pelas plantas ocorre devido as condições edafoclimáticas (clima, relevo, temperatura, umidade, solo, precipitação pluvial, dentre outros) (Fernandes et al., 2015; Leite, 2009). Dentre os metabólitos secundários mais conhecidos estão os compostos fenólicos (flavonóides, taninos, antocianinas e antraquinonas), produtos contendo a porção amino (alcalóides e metilxantinas), bem como cumarinas, saponinas e outros (Souza et al., 2021).

Deste modo, o DFC apresenta diversas plantas que quando exploradas de forma correta e sustentável, possibilita o estudo para planejamento e desenvolvimento de novos medicamentos, sendo assim uma área relevante para indústrias farmacêuticas (Maia et al., 2017).

### **3.6 SCAFFOLDS MOLECULARES: BIFLAVONÓIDE, LIGNANA E SESQUITERPENO**

#### **3.6.1 Biflavonóides**

Os biflavonóides são metabólitos secundários polifenólicos de ocorrência natural, são membros da família dos flavonóides (Lee; Park; Rhee, 1996; He; Yang; Huang, 2021). Os dímeros de flavonóides resultam da ligação de duas unidades de flavona, flavanona, flavanonol, flavonol e auronas ou misturas destas, além de ocorrerem, menos comumente, os dímeros de chalconas e isoflavonas (Suzart et al., 2007). Compostos presentes na classe dos biflavonóides foram encontrados inicialmente por Furukawa em 1929 a partir de extratos de folhas da espécie de planta *Ginkgo biloba*, na forma de um sólido amarelo (Suzart et al., 2007).

Cerca de 592 biflavonóides são encontrados em plantas (He; Yang; Huang, 2021), nos quais em média 50% dos biflavonóides são encontrados nas seguintes famílias de plantas; Clusiaceae, Thymelaeaceae, Ochnaceae e Selaginellaceae (He;

Yang; Huang, 2021). Os biflavonóides comumente isolados são a gingentina, isogingentina, amentoflavona, morelloflavona, robustaflavona, hinoquiflavona e ochnaflavona (Lee; Park; Rhee, 1996). Coulerie et al. (2012) em seu estudo a partir do extrato de acetato de etila da espécie de planta *Dacrydium balansae* (*Podocarpaceae*), isolaram quatro biflavonóides, amentoflavona, podovarpusflavona A, isoginkgetina e hinokiflavona nos quais possuíram atividade viral contra o vírus da dengue.

### 3.6.2 Lignanas

As lignanas são metabólitos secundários pertencentes à família dos compostos fenólicos nos quais ocorrem naturalmente nas plantas e são os principais componentes bioativos de frutas. Estão presentes especificadamente em sementes oleaginosas, cereais integrais, legumes, vegetais, frutas e também em produtos lácteos, carnes, peixes dentre outros (Milder et al., 2005; Valsta et al., 2003; Durazzo et al., 2013). Eles são uma classe que pertencem ao grupo dos compostos difenólicos derivados da combinação de duas unidades fenilpropanóides e podem ser ligados a ligações adicionais de éter, lactona ou carbono (Lewis; Davin, 1999). Dentre os principais compostos comumente estudados e relatados são secoisolariciresinol, lariciresinol, matairesinol, pinioresinol, medioresinol e siringaresinol (Durazzo et al., 2018). Os compostos são comumente isolados de plantas do gênero *Schisandra* e *Kadsura* (Teponno; Kusari; Spiteller, 2016).

### 3.6.3 Sesquiterpenos

Os sesquiterpenos são metabólitos secundários pertencentes a classe dos terpenos, são encontrados naturalmente em plantas, fungos, algas marinhas, corais, esponja, insetos e outros (Arya et al., 2021; Kamolsukyeunyonng et al., 2021). Os terpenos são construídos pela junção repetitiva de unidades isoprenóides ramificadas e são categorizados de acordo com a unidade de isopreno, monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, tetraterpenos e polisoprenóides, sendo os monoterpenos e os sesquiterpenos os constituintes de maior abundância (Davis e Croteau, 2000).

A classe dos terpenos é estruturalmente diversa e amplamente distribuída em espécies de plantas contendo mais de 30.000 compostos identificados (Arya et al., 2021). Relatada a ampla ocorrência de sesquiterpenos no gênero de planta

*Trichoderma* (Shi et al., 2019), *Matricaria* (Souza et al., 2021), dentre outros. Albuquerque et al., (2022) em seus estudos relataram que o sesquiterpeno  $\beta$ -germacreno-D-4-ol possui atividade larvicida frente ao *A. aegypti* com IC<sub>50</sub> de 18,23  $\pm$  1,19 ppm.

### 3.7 CENOSTIGMA PYRAMIDALE (Tul.) E. GAGNON & G.P. LEWIS

A espécie *Cenostigma pyramidale* (Tul.) E. Gagnon & G.P. Lewis (Figura 2) pertencente à família Fabaceae e popularmente conhecida como catingueira, catingueira-verdadeira, catinga-de-porco e pau-de-rato, anteriormente classificada como *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz e *Caesalpinia pyramidalis* Tul (Oliveira et al., 2016; Frosi et al., 2021), é uma espécie endêmica do nordeste Brasileiro, abundante no Domínio Fitogeográfico Caatinga e considerada uma das espécies mais adaptadas a esta região (Frosi et al., 2021). Encontrada nos estados de Pernambuco, Bahia, Piauí, Rio Grande do Norte, Alagoas, Paraíba, Ceará e Sergipe (Oliveira et al., 2016).

É caracterizada pela ausência de espinhos, flores amarelas, folhas compostas, frutos achatados, com ápice pontiagudo e deiscente. A árvore pode atingir cerca de 10 metros de altura e quando adultas florescem na estação chuvosa por quatro meses (Figura 2) (Oliveira et al., 2016; Ribeiro et al., 2021). Chá, suco e xaropes das flores, folhas e frutos são tradicionalmente utilizados para o tratamento de tosse, bronquite, infecções respiratórias, gripe, asma, gastrite, febre, diarreia, inflamações, dentre outras (Chaves et al., 2016), como também para carvão vegetal.

É uma espécie rica em metabólitos secundários como flavonoides, fenóis, taninos, terpenos e biflavonóides (Bahia et al., 2005; Chaves et al., 2016). Sendo comprovada variadas atividades biológicas, como atividade antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antinociceptiva, gastroprotetor, neuroprotetor, anti-helmíntico e anti-inflamatória (Santos et al., 2011; Alviano et al., 2008; Cruz et al., 2007; Silva et al., 2011; Borges-dos-Santos et al., 2012; Diniz et al., 2015; Souza et al., 2018),

Dentre testes realizados frente a insetos utilizando a espécie *C. pyramidale*, Guimarães et al., (2015) ao expor a espécie *Anagasta kuehniella* (traça da farinha) ao

extrato das sementes da *C. pyramidale* observou uma diminuição significativa no peso larval e na sobrevivência, os efeitos se deram pelo comprometimento do processo de digestão, onde ocorreu a inibição das atividades de tripsina e quimotripsina, as principais enzimas digestivas nesta espécie. Melo et al. (2013), testou o pólen das flores de *C. pyramidale* adicionado aos alimentos basais este demonstrou ser tóxico para as abelhas da espécie *Apis mellífera* ocasionando mortalidade desses organismos. Relatos na literatura de testes com *C. pyramidale* frente ao *A. aegypti* não foram encontrados na literatura.

Santos et al. (2011), relatam que o extrato bruto de *C. pyramidale* merece mais estudos frente à purificação e isolamento dos compostos mais ativos como também, destaca o potencial para exploração da espécie e a possibilidade de gerar renda para as comunidades locais.

Figura 2: Registro fotográfico da espécie *Cenostigma pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis.

**A**



**B**



Fonte: autoria própria

### 3.8 QUÍMICA MEDICINAL COMPUTACIONAL

A química medicinal computacional é uma área da química que tem como finalidade o conhecimento completo da estrutura molecular, estudando a atividade biológica das moléculas bioativas, determinando os parâmetros que relacionam estrutura e atividade e finalmente aplicando estas métricas no planejamento racional das moléculas bioativas (Cohen et al., 1990), no qual compreende etapas de descoberta, otimização e desenvolvimento do protótipo.

A etapa de descoberta refere-se a seleção de um determinado alvo terapêutico seja para o tratamento de alguma fisiopatologia ou para um determinado alvo molecular que visem estratégias computacionais para simulação do mesmo (Lima, 2017). A otimização visa a melhoria da estrutura do protótipo com intuito de contribuir a níveis farmacofóricos, conformação bioativa e entender o reconhecimento do alvo molecular (Lima, 2017). A etapa de desenvolvimento do protótipo compreende o entendimento das propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) com intuito de viabilizar seu uso (Lima, 2017).

### 3.9 ABORDAGENS IN SILICO

Nas décadas de 60 e 70 iniciou-se as determinações de estruturas proteicas por difração de raios-X, a criação do primeiro computador de acesso múltiplo, criação do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) e as abordagens *in silico* para o processo de descoberta de moléculas bioativas (Domingues, 2013), considerando o desenvolvimento em tecnologia de computador e o rápido aumento de dados químicos e biológicos disponíveis, é notório como o uso de abordagens *in silico*, modelagem molecular e a inteligência artificial aumentaram significativamente nas últimas décadas (D'Agostino et al., 2013).

Estas abordagens referem-se a variadas metodologias computacionais para auxiliar na identificação e investigação de novas moléculas bioativas. Consistindo então na triagem virtual, *docking molecular*, dinâmica molecular, relação estrutura-atividade, relação quantitativa estrutura-atividade, dentre outros para pesquisar e projetar compostos ativos contra alvos (Brindisi et al., 2015).

Nos últimos anos os avanços ligados às técnicas utilizadas nessa área da ciência têm resultado em medicamentos disponíveis hoje ao alcance de muitas pessoas onde foram desenvolvidos através de estratégias racionais. Como exemplo, a primeira molécula bioativa anti-hipertensivo atuando através da inibição da enzima

conversora de angiotensina (captopril) obtido pelo veneno da serpente brasileira *Bothrops jararaca* foi desenvolvido na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto (Lima, 2007). Foi observado a perda de eficácia por administração oral do mesmo, para que isso fosse mudado houve modificações na estrutura deste protótipo, estratégias visando a modificação molecular no processo de reconhecimento molecular pelo sítio ativo da carboxipeptidase-A, metaloenzima, zinco dependente com elevada similaridade a enzima conversora de angiotensina (Lima, 2007).

### 3.9.1 Triagem Virtual

A triagem virtual começou a se tornar popular na indústria impulsionada pelo aumento da disponibilidade de estruturas de raios-X de alvos biológicos. A triagem virtual conhecida do inglês “*Virtual Screening*” é amplamente usada para prever a ligação de um grande banco de dados nos quais podem conter milhares de compostos para um alvo específico com o objetivo de identificar os compostos mais promissores do banco de dados para um estudo mais aprofundado (Cosconati et al., 2010).

Em vez de selecionar compostos aleatórios, o banco de dados pode ser filtrado com base nas propriedades físico-químicas dos compostos. Considerando que a biodisponibilidade de moléculas bioativas administrados pela via oral depende da permeabilidade pelas membranas celulares, solubilização nos fluidos estomacais e absorção pela mucosa intestinal, é necessário compreender os descritores moleculares capazes de prever as propriedades farmacocinéticas ideais (Barreiro e Fraga, 2014; Amaral e Montanari, 2002).

Com intuito de facilitar o processo de tomada de decisão e aumentar a probabilidade de encontrar e desenvolver compostos viáveis farmacologicamente foram desenvolvidos vários métodos multiparamétricos chamados de regras ou filtros (Mignani, et al., 2018). A regra de Lipinski, do inglês “*Rule of Five*” afirma que a maioria das moléculas “semelhantes a drogas” tem  $\log P \leq 5$ , peso molecular  $\leq 500$ , número de aceitadores de ligações de hidrogênio  $\leq 10$  e número de doadores de ligações de hidrogênio  $\leq 5$ . Moléculas que violam mais de um destes parâmetros podem ter problemas com a biodisponibilidade.

A triagem virtual compreende duas abordagens: a triagem virtual baseada no alvo molecular ou planejamento de moléculas bioativas baseado na estrutura do receptor do inglês “*Structure-Based Drug Design*” -SBDD e a triagem molecular baseada em ligantes ou planejamento de moléculas bioativas baseado na estrutura do ligante do inglês “*Ligand-Based Drug Design*” -LBDD. A primeira abordagem SBDD

considera a estrutura tridimensional (3D) do alvo terapêutico e utiliza como estratégia principal os cálculos de docagem para seleção de ligantes potenciais, com características químicas, eletrônicas e estruturais que favorecem interações com o sítio ligante do alvo molecular (Kontoyianni, McClellan & Sokol, 2004; Cosconati et al., 2010).

A segunda abordagem LBDD depende da estrutura tridimensional (3D) do complexo ligante-receptor e utilizam moléculas orgânicas com atividade biológica conhecida, funcionando como moldes para a triagem em bases de dados de novas entidades químicas com algum nível de similaridade, compartilhando com estes moldes a mesma atividade biológica (Sodero, 2011). A escolha da melhor estratégia depende das informações disponíveis relacionadas ao conhecimento das estruturas dos ligantes e do alvo (OOMS, 2000).

### 3.9.2 *Docking Molecular*

Para que seja possível a obtenção de uma nova molécula bioativa no mercado é necessário tempo como também custeio financeiro para obtenção do mesmo em testes de bancada. Sendo assim, Geldenhuys et al., (2006) ressaltam que são necessários de 12 a 24 anos para que uma molécula bioativa seja desenvolvida, com um gasto estimado entre 800 milhões a 1,4 bilhões de dólares.

O planejamento de novas moléculas bioativas auxiliado por computador (*Computer- Aided Drug Design*, CADD) pode ser empregado para melhorar a eficiência deste processo, podendo reduzir em até 50% o custo da pesquisa por um novo agente terapêutico (Geldenhuys et al., 2006; Meek et al., 2006).

As origens do *docking molecular* foram datadas de 1970 impulsionadas pelas necessidades da biologia molecular estrutural e da descoberta de drogas baseadas na estrutura (Domingues, 2013). O campo do *docking molecular* consiste em procedimentos computacionais que predizem o modo de ligação e a afinidade de um ligante com um alvo. Em suma, o objetivo do *docking molecular* é compreender e prever o reconhecimento molecular, tanto estruturalmente, encontrando modos de ligação prováveis, e energeticamente, prevendo afinidade de ligação (Morris e Lim-Wilby, 2008), sendo uma ferramenta importante para analisar como sistemas moleculares reagem, ou podem reagir diante de um meio ou situação (Lima et al., 2017). A energia de ligação entre a molécula bioativa e o sítio ativo provém da composição química dos grupos funcionais presentes na macromolécula e da conformação tridimensional destes grupos (Andrei et al., 2012).

Os programas de *docking molecular* são formados por uma combinação de dois componentes: um algoritmo de busca (orientação e conformação) e uma função de pontuação (Verdonk et al., 2003). Os algoritmos de busca, são um conjunto de regras e parâmetros aplicados com o objetivo de explorar a flexibilidade da estrutura dos ligantes em simulações de docagem empregado na pesquisa de possíveis modos de ligação entre o ligante e a proteína, a fim de se alcançar uma complementaridade estérica e eletrostática, pesquisando detalhadamente a energia potencial para que se obtenha o mínimo global (Morris e Lim-Wilby, 2008).

Os algoritmos de busca podem ser programados para utilizar o mesmo princípio da evolução biológica, denominando-se então, algoritmos genéticos. Estes algoritmos são representados por uma série binária que apresenta uma estrutura de codificação semelhante ao DNA, esta semelhança simula operações genéticas, como mutações e recombinações, sendo assim, a conformação de uma molécula deve ser representada de modo a permitir que um processo evolucionário de mutação e seleção ocorra.

A função de pontuação é aplicada para eleger os modos de ligação teoricamente mais próximos do modo de ligação “real”, dentre os modos de ligação explorados pelo algoritmo de busca, classificando-os de acordo com as energias de interação (Verdonk et al., 2003).

É importante ressaltar que o método de *docking molecular* encontre uma conformação relevante. Os métodos são normalmente validados por *redocking*, no qual, uma série de complexos conhecidos são separados (alvo e ligante) e, em seguida *redocked*, para que possa garantir que o algoritmo de encaixe possa reproduzir o modo de ligação observado (Meek et al., 2006).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas da espécie *C. pyramidale* foram coletadas na zona rural da cidade de Juazeiro, estado da Bahia nas respectivas coordenadas Lat: 09°37' 47.68" S e Lon: 040°19' 33.96" W. A exsicata do material vegetal foi depositada no Núcleo de Ecologia e Monitoramento Ambiental- NEMA da Universidade Federal do Vale do São Francisco- UNIVASF sob número PISF:1458. Este acesso foi cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Associado Conhecimento Tradicional (SIGGEN/Brasil) sob o código ABA0935.

### 4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DA ESPÉCIE CENOSTIGMA PYRAMIDALE

No Laboratório de Modelagem Molecular Aplicado a Farmácia- LAMMAF um total de 3, 750 kg de folhas de *C. pyramidale* foram secas na estufa de ar circulante e posteriormente moídas com o moinho de faca até a obtenção do pó (1,2 kg). Conforme Bahia, David & David (2010) após obtenção do pó foi acrescido metanol e após quatro dias o extrato foi obtido com auxílio do percolador e passado no rotaevaporador para fazer a secagem inicial do solvente e colocado o extrato na estufa, sequencialmente o extrato metanólico foi submetido a partições, obtendo as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, metanólica e aquosa obtidas por funil de separação. A tentativa de isolar o biflavonóide loniflavona da fração clorofórmica (Bahia et al., 2010) não teve sucesso, testamos então o potencial larvicida do extrato e frações obtidas.

### 4.3 ATIVIDADE IN VIVO SOBRE LARVAS DE Aedes Aegypti

Os testes larvicidas *in vivo* sobre *A. aegypti* foram realizados a partir da eclosão dos ovos obtidos na unidade de criação em massa da Mosamed Brasil, localizada em Juazeiro-BA, Brasil. A colônia da cepa foi originada de coletas de ovos da nossa região geográfica. Os mosquitos foram colonizados e domesticados de acordo com o protocolo descrito por Carvalho et al. (2014). Para eclosão dos ovos, a água mineral foi aquecida e posterior ao resfriamento os ovos foram adicionados. As larvas recém-eclodidas foram deslocadas em bandejas plásticas com água mineral, e o alimento larval adicionado diariamente composto por levedura de cerveja (35%), soja em pó (35%) e ração para

peixe TetraMin@ (30%) e usando condições climatizadas [ $27 \pm 2$  °C;  $65 \pm 10\%$  relativo a umidade; fotoperíodo de 12:12 (Claro:Escuro) horas] (Sá et al., 2022).

As frações de metanol (ME), hexano (HE), clorofórmio (CL) e acetato de etila (ACE) foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO), 500 g/mL. Para a fração aquosa (AQ), a mesma concentração (500 g/mL) foi usada com água como veículo. Todas as diluições (20  $\mu$ L) foram adicionadas a béqueres contendo 20 mL de água mineral e 20 larvas no ínstar L3, referindo-se então a 500 ppm (Sá et al., 2022). Os ensaios foram realizados em quintuplicatas. O controle negativo foi realizado com 0,1% de DMSO/água.

A letalidade foi determinada após 24 horas, considerando larvas mortas as que não responderam a estímulos mecânicos com a pipeta Pasteur, e foi expresso como a mediana das porcentagens obtidas para quintuplicatas, com o respectivo erro padrão. Após a triagem inicial *in vitro*, os mesmos procedimentos acima foram realizados apenas para ME e CL, em diferentes concentrações (700-100 ppm), visando calcular os valores de IC<sub>50</sub>. As medianas das porcentagens de letalidade foram determinados e depois usados em um modelo probit de *Finney*. A análise estatística foi realizada com o software Microsoft Excel®.

#### 4.4 BUSCA E OTIMIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS PRESENTES NAS FRAÇÕES METANÓLICA E CLOROFÓRMICA DE CENOSTIGMA PYRAMIDALE

A partir dos estudos de Mendes et al., (2000); Bahia et al., (2005); Bahia et al., (2010) e Andrade et al., (2018) obteve-se os compostos presentes nas frações metanólica e clorofórmica do extrato das folhas de *C. pyramidale*. As estruturas foram pesquisadas utilizando o *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) (Kim et al., 2021), baixadas em 2D e então adquiridas em formato sdf. Após obtenção, foi utilizado o programa *OpenBabel* para conversão em mol, posteriormente utilizado o programa *ACD/ChemSketch* para otimização das estruturas usando o método quântico semiempírico PM3. Em seguida utilizado o programa *TextPad* para ajuste do arquivo e posteriormente convertido para o formato pdbqt no programa *OpenBabel*.

#### 4.5 BUSCA E OTIMIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS ANÁLOGAS A LONIFLAVONA, FARGESINA E PROXIMADIOL

Foi realizado no estudo de Mourão et al. (2020) uma busca de espécies de plantas presentes no domínio fitogeográfico Caatinga registrado no livro da Maia (2004) e utilizado palavras-chave (LC – MS”, “GC – MS”, “metabólitos secundários” e “composição química”) e posteriormente a plataforma online *SciFinder* para obtenção dos compostos, após realização do *docking molecular* e dinâmica molecular concluiu-se que os compostos loniflavona, proximadiol e fargesina seriam promissores para pesquisas futuras e testes de bancadas.

Análogos das estruturas químicas das classes de biflavonóide, sesquiterpeno e lignana, respectivamente, os compostos loniflavona, proximadiol e fargesina foram utilizados neste estudo. A ferramenta de busca por similaridade utilizada foi a base de dados de moléculas *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) (Kim et al., 2021), na qual foram baixadas em 2D as estruturas análogas passando pelo filtro teórico (regra de Lipinski) e então adquiridas em formato sdf. Após obtenção, foi utilizado o programa *OpenBabel* para conversão em mol, posteriormente utilizado o programa *ACD/ChemSketch* para otimização da geometria das moléculas. Em seguida utilizado o programa *TextPad* para ajuste do arquivo e posteriormente convertido para o formato pdbqt no programa *OpenBabel*.

#### 4.6 ESTRUTURA E PREPARAÇÃO DA PROTEÍNA CARREADORA DE ESTERÓIS-2 PARA O ESTUDO DE ENCAIXE

A estrutura cristalina da Proteína Carreadora de Esteróis-2 (PCE-2) foi obtida no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) sob código (RCSB PDB ID: 1PZ4). Foi separado o alvo PCE-2 do ligante nativo co-cristalográfico (Ácido palmítico- AP), em arquivos no formato pdb. Na PCE-2 as moléculas de água foram removidas, adicionado hidrogênios, identificado e adicionado os resíduos faltantes e verificado os estados de protonação utilizando o programa UCFS *Chimera*. No ligante nativo AP foi verificado os estados de protonação. A PCE-2 passou pelo software APBS (<https://server.poissonboltzmann.org/>) para seleção do pH de 7,4 e o arquivo salvo em pqr.

#### 4.7 REALIZAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DO *REDOCKING* MOLECULAR

Para o processo de *redocking* molecular a PCE-2 e o AP foram abertos no programa *Autodock Tools* e salvos em arquivos separados em formato em *pdbqt*. O processo de *redocking* foi construído usando o programa *Autodock Tools*, onde a grid box foi centralizada no AP considerando as dimensões de 16x 18x 20x com espaçamento de 1 Å e centrado na PCE-2 com  $x = 25.574$ ,  $y = 28.264$  e  $z = 54.032$ . Posteriormente, o prompt de comando foi utilizado para realização do *redocking* considerando o executável *Autodock Vina*. O resultado do *redocking* foi visualizado a partir do arquivo de output no formato *pdbqt*, no programa *Autodock Tools*. A energia de interação do AP foi visualizada e logo em seguida a estrutura salva no formato *pdb* e visualizada no UCFS *Chimera* (Pettersen et al., 2004). Os arquivos foram salvos no formato *mol2* e abertos no *Zhang Lab* (<https://zhanggroup.org/DockRMSD/>) para obtenção do desvio quadrático médio (RMSD).

#### 4.8 REALIZAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DO *DOCKING* MOLECULAR

O prompt de comando foi utilizado juntamente com comando pertinente ao *Autodock Vina*, para realização do *docking* molecular, onde a PCE-2 e as estruturas químicas análogas da loniflavona, proximadiol e fargesina foram incluídas no formato *pdbqt*. O arquivo de saída *pdbqt\_log.log* gerado forneceu suas respectivas energias, seguindo o método de agrupamento proposto pelo *Autodock Vina* (Balci et al., 2021). O resultado do *docking* molecular foi visualizado a partir do arquivo *pdbqt.out* no programa *Autodock Tools*. O programa UCFS *Chimera* foi utilizado para visualizar as geometrias das melhores poses, previamente convertidas em formato *pdb* (Pettersen et al., 2004). Por fim, foi utilizado o programa *Discovery Studio Visualizer* para visualização das interações em 2D (Kemish; Fasnacht & Yan, 2017).

#### 4.9 ANÁLISE DO RADAR DE BIODISPONIBILIDADE E DAS PROPRIEDADES ADME DOS COMPOSTOS PRESENTES NO LARVICIDA PIRIPROXIFENO, NA FRAÇÃO METANÓLICA E CLOROFÓRMICA DE CENOSTIGMA PYRAMIDALE, ANÁLOGOS DA LONIFLAVONA, FARGESINA E PROXIMADIOL

Foi realizado a análise das propriedade ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e radar de biodisponibilidade na plataforma *SwissADME* (<http://www.swissadme.ch/>) dos compostos presentes no larvicida piriproxifeno, na fração metanólica (ME),

clorofórmica (CL) e dos análogos da Ioniflavona, fargesina e proximadiol, que apresentaram as melhores energias de ligação.

#### 4.10 VALIDAÇÃO DO ALGORITMO DE ENCAIXE

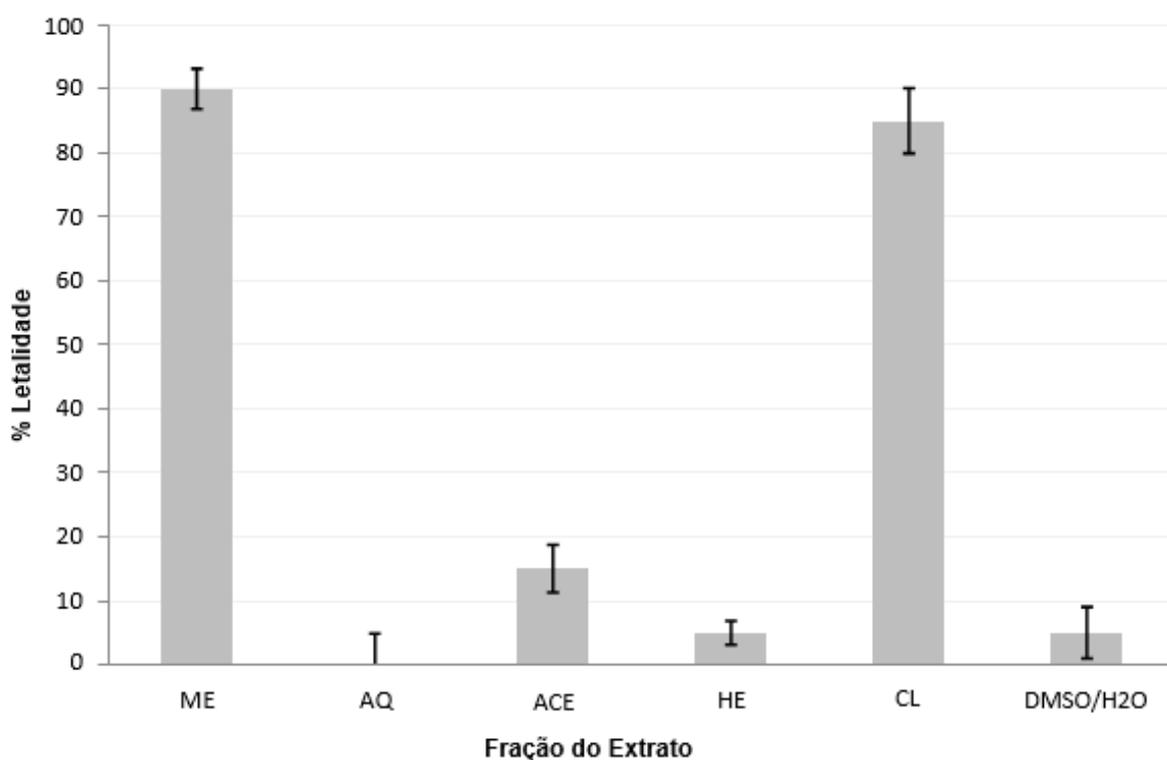
Para validação do algoritmo de encaixe foi realizado a área sob a curva (ROC) onde foram pesquisados inibidores da PCE-2 *in vitro* a partir de uma busca bibliográfica constatamos um total de 6 moléculas ativas (Anstrom et al., 2012; Kim; Wessely; Lan, 2005), utilizamos também a plataforma *Binding Database* (<https://www.bindingdb.org>) (Gilson et al., 2015) onde foram apresentados 2 moléculas (Da Silva et al., 2015), totalizando 8 moléculas ativas. Foram obtidos os códigos *SMILES* destes compostos e utilizado a plataforma DUDE (<http://dude.docking.org/generate>) (Mysinger et al., 2012) onde foram gerados 80 moléculas inativas (falsos positivos), após isto foi realizado o *docking molecular* destes compostos e os resultados indexados na plataforma (<http://stats.drugdesign.fr/>) para obtenção da curva ROC.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ATIVIDADE IN VIVO FRENTE LARVAS DE Aedes Aegypti

Os testes *in vivo* realizados com as frações, ME (metanólica), AQ (aquosa), ACE (acetato de etila), HE (hexânica) e CL (clorofórmica) para o potencial larvicida demonstraram que, na concentração de 500 ppm, apenas as frações metanólica (ME) e clorofórmica (CL) de *C. pyramidale* exibiram atividade expressiva contra *A. aegypti* (Figura 3). Este é um resultado interessante, considerando que a motivação para o uso da planta foi a identificação por nosso grupo de um biflavonóide, a loniflavona previamente extraída de sua fração CL (Bahia et al., 2010), que apresenta alta afinidade pela PCE-2 (Mourão et al., 2020).

Figura 3: Medianas da porcentagem de letalidade para as frações obtidas de *C. pyramidale* contra larvas (L3) de *A. aegypti*, a 500 ppm. (ME: Metanólico; AQ: Aquoso; ACE: Acetato de etila; 221 HE: Hexano; CL: clorofórmio. As barras verticais representam o erro padrão).



Considerando que a fração CL é obtido a partir da fração ME, isso explica a atividade de ambos, possivelmente pela presença da loniflavona. A tentativa de isolar o compostopuro não teve sucesso, incluindo o fato que Bahia et al. (2010) obtiveram apenas 10 mg de 680 g de folhas secas e moídas. Acreditamos que o potencial do extrato e fração pode facilitar o uso prático deste material como agente larvicida. A

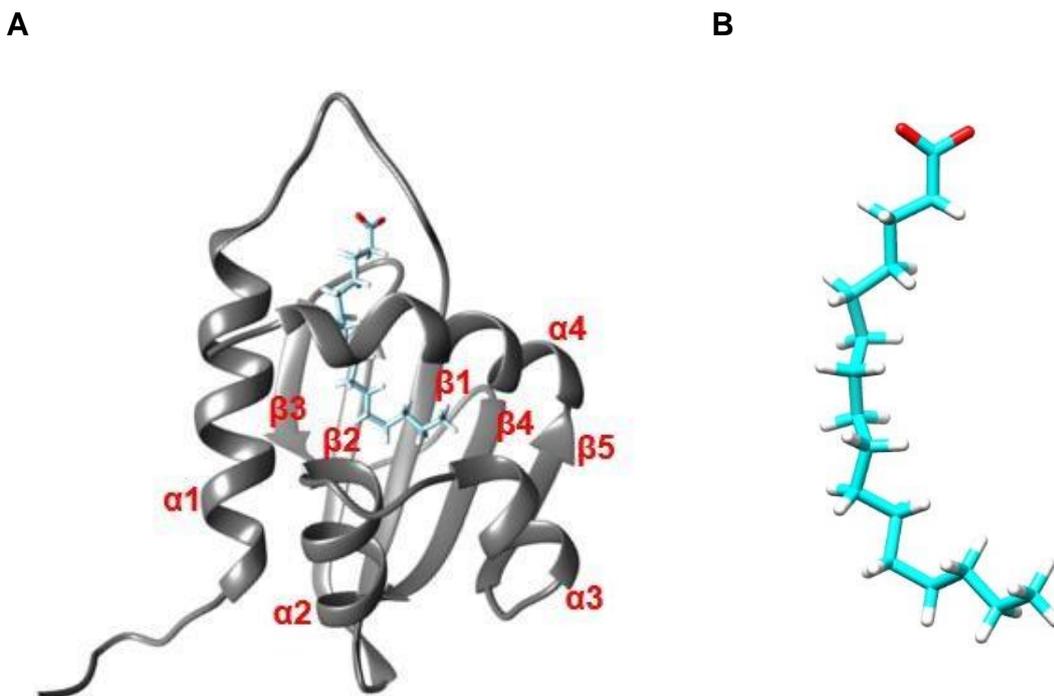
família de *C. pyramidale* 'Fabaceae' está entre as principais famílias que possuem o maior número de moléculas com atividade larvicida (Pavela et al., 2019).

Observamos que ME e CL apresentaram um percentual de letalidade muito maior do que os outros a 500 ppm (letalidade de 90 e 85% das larvas respectivamente), incluindo o controle negativo (DMSO/Água). O significado exibido pelas frações mais ativas relacionadas ao controle negativo corrobora sua eficácia. Considerando os resultados acima, o valor de  $IC_{50}$  foi obtido para ME e CL. A análise probit revelou que o  $IC_{50}$  foi de 199 ppm para ME e 194 ppm para CL. Os valores de  $IC_{50}$  foram muito próximos, o que pode estar relacionado inicialmente a presença da loniflavona nesses dois sistemas. Além disso, a literatura relata outros flavonóides estruturalmente semelhantes encontrados nestas mesmas frações (Mendes et al, 2000; Bahia et al, 2005; Bahia et al, 2010; Andrade et al, 2018).

## 5.2 PROTEÍNA CARREADORA DE ESTERÓIS-2

Segundo Dyer et al., (2003) a PCE-2 presente no *A. aegypti* (Figura 4A) apresenta uma bolsa hidrofóbica onde é o local do sítio de ligação e acomoda o ligante co-cristalográfico ácido palmítico (AP). O AP localiza-se bem entre a presença da alça que liga a  $\alpha$  hélice-1 e folha  $\beta$  -1 (Dyer et al., 2003). Na Figura 4B retrata o AP de forma isolada para uma melhor visualização da sua estrutura.

Figura 4: Proteína carreadora de esteróis-2 (PCE-2) juntamente com seu ligante co-cristalográfico (ácido palmítico) e enumeração das  $\alpha$ -hélices ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 e  $\alpha$ 4) e folhas-  $\beta$  ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4 e  $\beta$ 5) de acordo com sua ocorrência na estrutura (A). Ligante co-cristalográfico ácido palmítico (AP) (B).



### 5.3 REDOCKING

O redocking trata-se de uma validação na qual realiza-se o *docking molecular* do ligante co-cristalográfico (AP) e sobrepomos com o mesmo ligante co-cristalográfico nativo no qual foi extraído PCE-2. A finalidade do *redocking* é saber se o *docking* é capaz de retornar a conformação cristalográfica inicial. O resultado do *redocking* foi obtido com a *grid box* possuindo dimensões de 16x18x20x e espaçamento de 1Å, onde o ligante co-cristalográfico AP (rosa) foi acoplado na PCE-2 e comparado de acordo com sua sobreposição estrutural com o ligante nativo (ciano), representados na Figura 5B.

A Figura 5B apresenta a sobreposição dos ligantes no sítio ativo da PCE-2 onde localiza-se bem na cavidade hidrofóbica e ente a  $\alpha$  hélice-1 e folha  $\beta$  -1. O *redocking* apresentou energia de -6,4 Kcal/ mol e RMSD (desvio quadrático médio) de 1, 187 Å. Em estudos realizados com o ácido palmítico na PCE-2 foram evidenciados por Srinivasan et al. (2015) energia de -2, 9 Kcal/ mol e RMSD de 0.18Å e França et al. (2020) constataram energia de - 8, 05 Kcal/mol com RMSD de 1,04 Å.

O RMSD obtido é considerado aceitável, conforme Kirchmair et al., (2008) onde relatam que um *redocking* até 2 Å são permissíveis para um estudo de *docking*

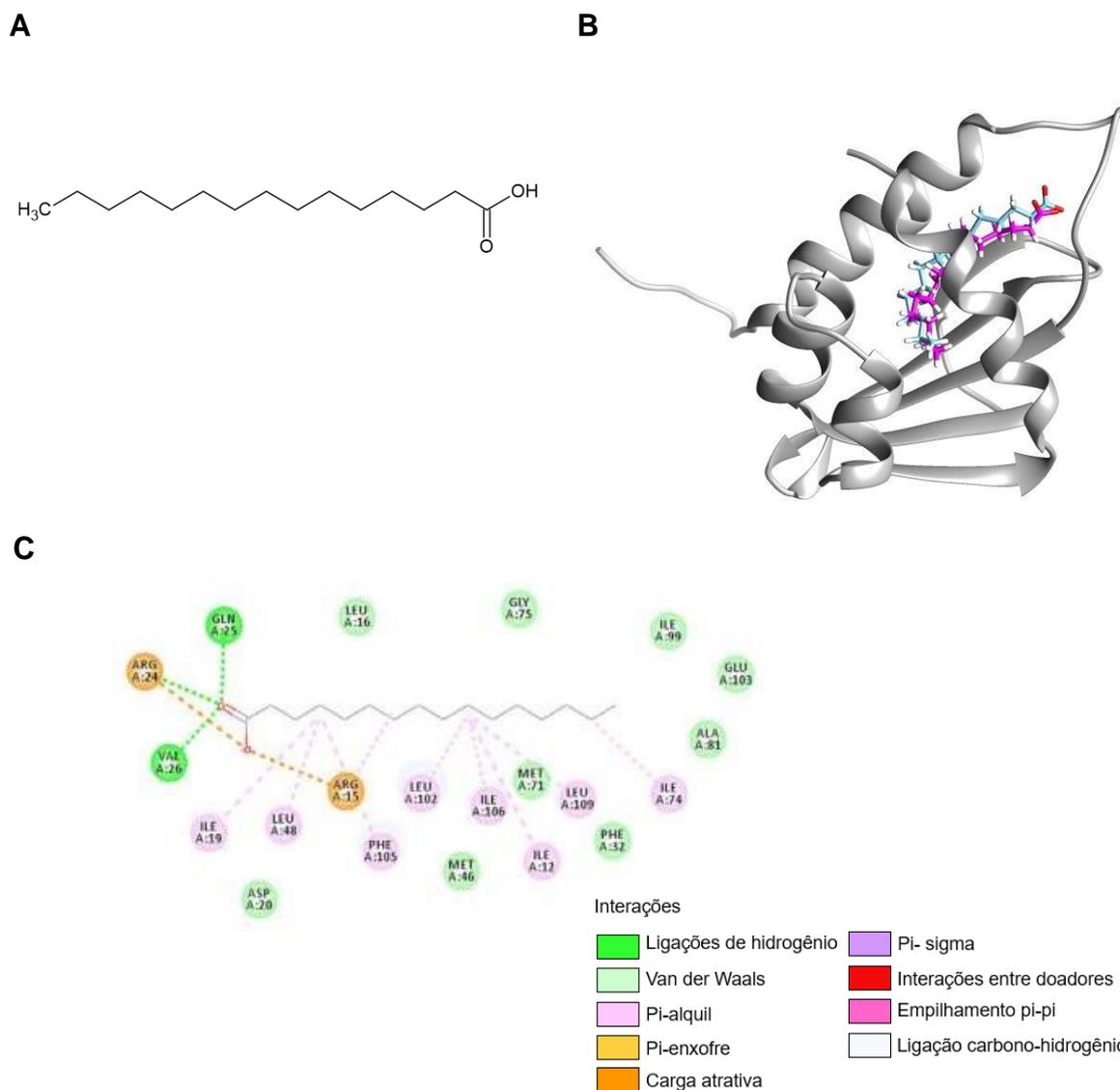
*molecular* e geram confiabilidade nas coordenadas da *grid box*, sendo necessário a obtenção do valor do RMSD para que seja possível entender a mudança na estabilidade e flexibilidade estrutural (Kumar et al., 2022) do AP. As dimensões da *gridbox* utilizadas no nosso trabalho para obtenção do RMSD constatam que a validação possui um grau de confiabilidade.

Observamos na Figura 5C as interações dos resíduos de aminoácidos com o AP apresentando ligações de hidrogênio interagindo com a cabeça polar do ligante co- cristalográfico, ocorrendo ligações de hidrogênio interagindo com GLN25 e VAL26 na carbonila e cargas atrativas com ARG24 e ARG15 na hidroxila. Na cauda metilênica há interações hidrofóbicas pi- alquil com ILE19, LEU48, PHE105, LEU102, ILE106, ILE12, LEU109, ILE74.

Dyer et al. (2003) publicaram a estrutura de raios-X de alta resolução (1,35 Å) da proteína PCE-2 co-cristalizada com o AP, neste estudo demonstraram que o AP localiza-se bem entre a  $\alpha$  hélice-1 e folha  $\beta$  -1 e que a cabeça do ácido palmítico é polar e localiza-se na abertura externa da bolsa hidrofóbica realizando ligações de hidrogênio com os aminoácidos ARG24 na carbonila, GLN25 e VAL26 na hidroxila, e a cauda metilênica do ácido palmítico interage hidrofobicamente com os resíduos de LEU45, MET46, LEU102, ILE99, LEU64, MET90, MET66, ILE74, PHE32, MET71, ILE12, ILE106, PHE105, SER108 e LEU16.

Quando comparamos as interações de resíduos de aminoácidos que evidenciamos (Figura 5C) com a relatada por Dyer et al. (2003) verificamos os mesmos resíduos de aminoácidos na cabeça polar do AP no entanto estão em locais e interações diferentes e a cauda metilênica apresenta algumas interações idênticas.

Figura 5: Estrutura 2D do ácido palmítico (AP) (A), sobreposição em ciano (ligante co-cristalográfico), rosa (*redocking*) acoplados na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B) e mapa de interação 2D (C).



#### 5.4 DOCKING MOLECULAR DOS COMPOSTOS PRESENTES NA FRAÇÃO METANÓLICA E CLOROFÓRMICA NA ESTRUTURA DA PROTEÍNA CARREADORA DE ESTERÓIS-2

A fração ME e CL apresentaram-se ativas frente as demais frações, nesse sentido, foram realizadas análises de *docking molecular* dos compostos presentes na fração ME e CL com intuito de verificar novos efeitos larvicidas. Os compostos presentes nas frações ME e CL foram elucidados a partir da análise do extrato das folhas de *C. pyramidale* nos estudo de Mendes et al. (2000); Bahia et al. (2005); Bahia et al. (2010) e Andrade et al. (2018) (Quadro 1), os compostos foram: Ioniflavona (LNF), taxifolina (TAX), apigenina (APG), kaempferol (KAE), agatisflavona

(AGA), podocarpus flavona A (POD), cesalflavona A (CESA), amentoflavona (AME), 5' - hidroxy- amentoflavona (5' -HYD) e Sequóiaflavona (SEQ).

Quadro 1: Compostos presentes no extrato das fração metanólica (ME) e clorofórmica (CL) das folhas de *C. pyramidale*.

COMPOSTO	FRAÇÃO	
	METANÓLICA	CLOROFÓRMICA
LNF	X	X
TAX	X	
APG		X
KAE		X
AGA	X	
POD	X	X
CESA		X
AME	X	
5' - HYD	X	
SEQ	X	

Fonte: adaptado (Mendes et al., 2000; Bahia et al., 2005; Bahia et al., 2010 e Andrade et al., 2018)

Os estudos de *docking molecular* envolvem a determinação da melhor orientação e conformação de um ligante no sítio de ligação de uma macromolécula alvo (Kitchen et al., 2004). Os compostos em formato 3D foram acoplados na proteína carreadora de esteróis-2 de *A. aegypti* (PCE-2) sob código (PDB ID: 1PZ4) a partir de cálculos realizados pelos programas de ancoragem molecular.

A inibição da PCE-2 afeta a captação e transporte de colesterol e tem efeitos sobre o *A. aegypti* (Larson et al., 2008), visando a mortalidade da espécie e quando se trata da PCE-2 sua expressão encontra-se acentuada na fase larval (*ínstar* L4),

pesquisas científicas visando novos inibidores com esse potencial tem sido de grande interesse tendo em vista a capacidade da espécie se tornar resistentes aos inibidores já existentes e a problemática frente ao meio ambiente. A característica mais importante da PCE-2 é a sua grande cavidade interna/ bolsa hidrofóbica com afinidade em acomodar ligantes hidrofóbicos (Gianotti; Ferreyra; Ermácora, 2018).

Ao realizar o *docking molecular* destes compostos na PCE-2 obtivemos a loniflavona apresentando maior energia de ligação no sítio ativo da proteína com energia de -13,4 kcal/ mol, seguido de APG (-9,0), KAE (-8,8), TAX (-8,2) e CESA (-7,6) (Tabela 2). Os demais compostos apresentaram energias de interação inferior a -7 kcal/ mol onde não são consideradas boas energias de interação (Tabela 1). Sendo assim, frente a outros compostos presentes na fração ME e CL (Quadro 1) a loniflavona ainda se mostra como sendo a mais relevante (Tabela 1).

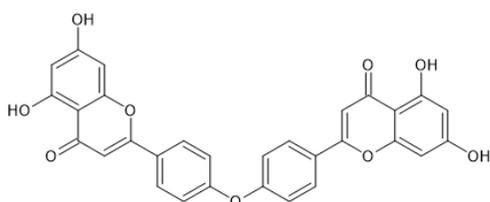
Tabela 1: Energia de ligação do ligante co-cristalográfico (AP) e as melhores energias de ligação (kcal / mol) dos compostos presentes na fração clorofórmica (CL).

<b>Composto</b>	<b>Energia de Ligação (Kcal/ mol) <math>\Delta G^\circ</math></b>
LNF	-13,4
TAX	-8,2
APG	-9,0
KAE	-8,8
AGA	-3,4
POD	-0,6
CESA	-7,6
AME	-1,9
5' - HYD	-3,6
SEQ	-2,4

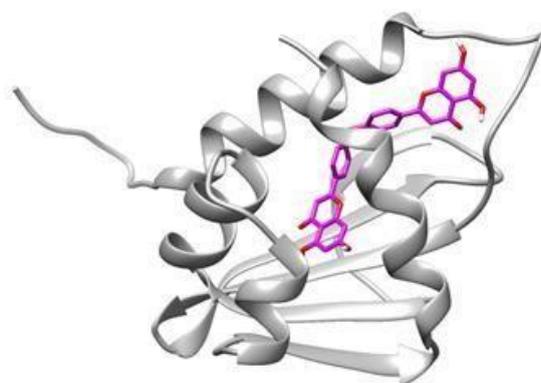
A Figura 6A apresenta a LNF. Na Figura 6B o acoplamento da LNF na PCE-2 (com energia de -13,4 kcal / mol) apresenta-se localizada entre  $\alpha$  hélice-1 e folha  $\beta$  -1 e cavidade hidrofóbica da proteína. As possíveis interações com os resíduos de aminoácidos (Figura 6C) tipo ligações de hidrogênio com ARG30, VAL82 e MET96, pi-sigma com ILE25, empilhamento pi-pi com PHE111, pi-alquil com LEU115, ILE18, ILE90, ILE105, ALA87, LEU106, pi-enxofre com MET72 e MET52.

Figura 6: Estrutura 2D do composto LNF (A), *docking molecular* na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B) e mapa de interação 2D (C).

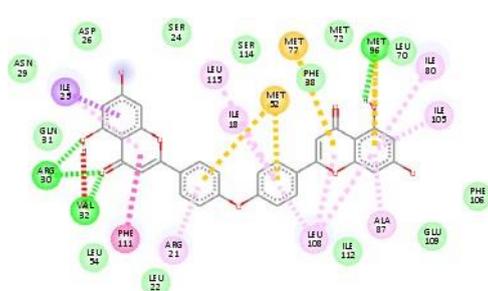
A



B



C

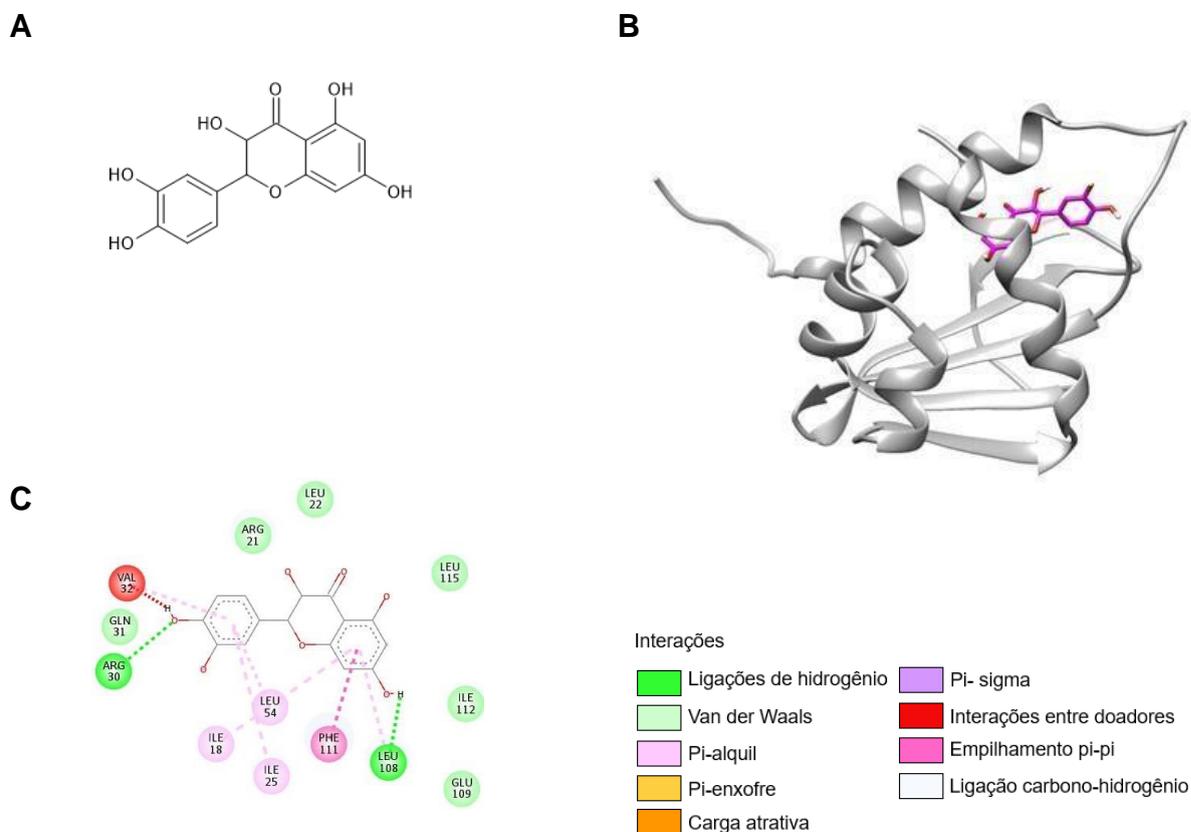


Interações

Ligações de hidrogênio	Pi- sigma
Van der Waals	Interações entre doadores
Pi-alquil	Empilhamento pi-pi
Pi-enxofre	Ligação carbono-hidrogênio
Carga atrativa	

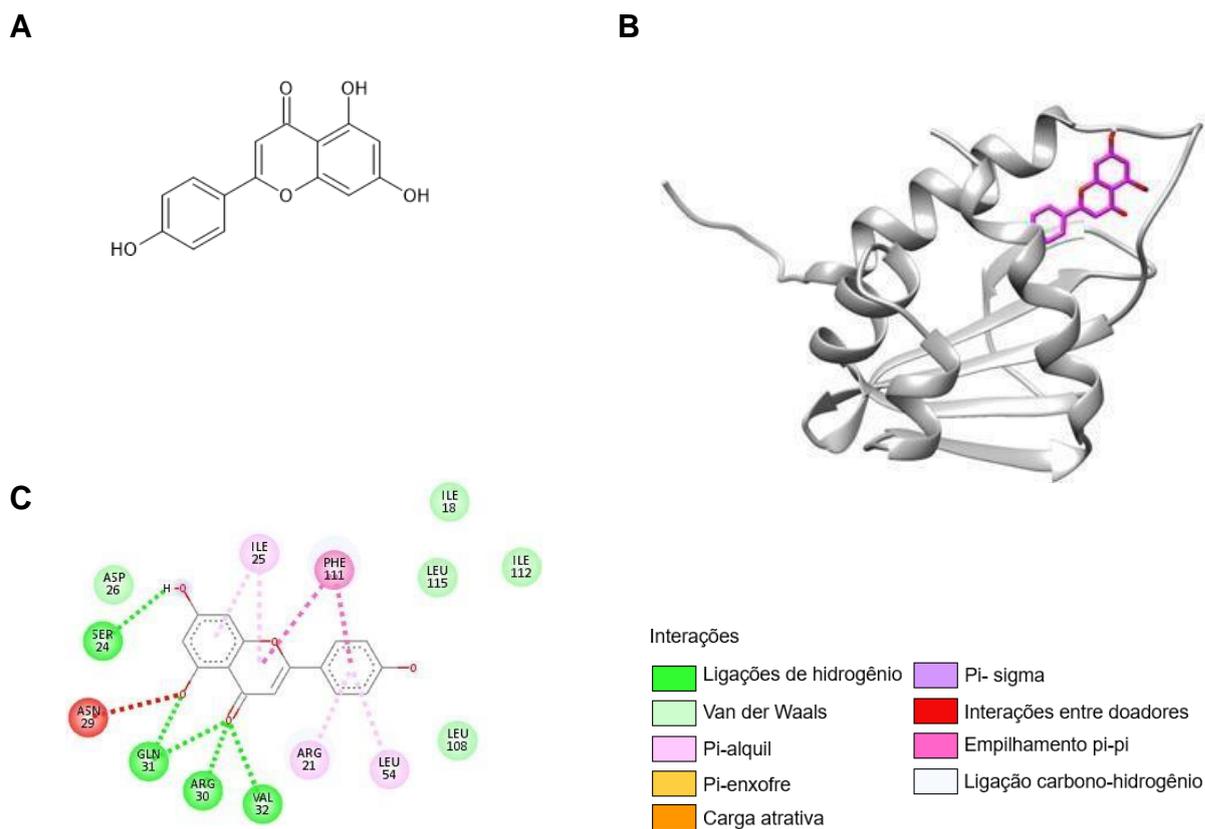
O composto TAX (Figura 7A), no acoplamento (Figura 7B) (energia de -8,2) apresenta-se bem localizada entre a  $\alpha$  hélice-1 e folha  $\beta$  -1. Possui interações entre doadores (VAL32), ligações de hidrogênio (ARG30, LEU108), empilhamento pi-pi (PHE111) e pi-alquil (LEU54, ILE18, ILE25) (Figura 7C).

Figura 7: Estrutura 2D do composto TAX (A), *docking molecular* na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B) e mapa de interação 2D (C).



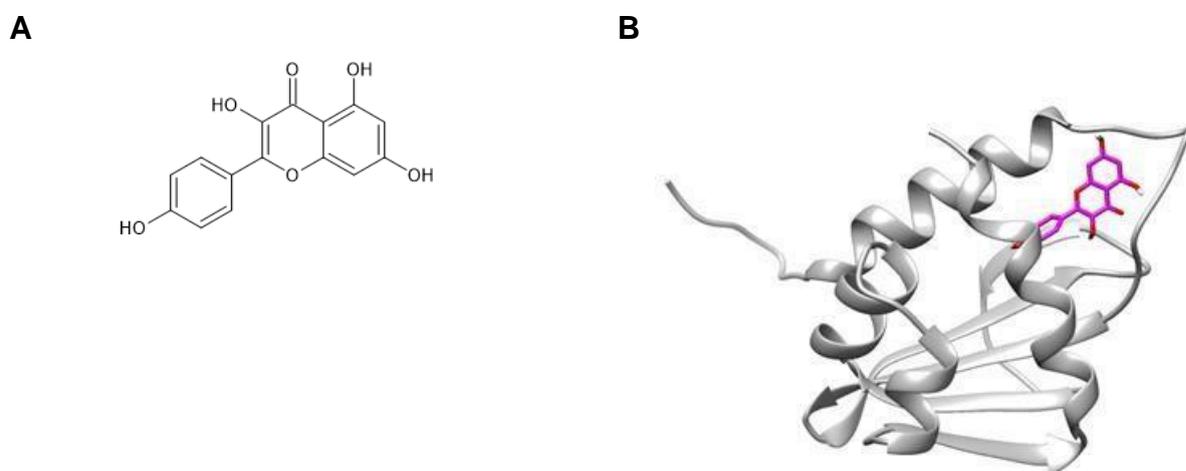
O APG (Figura 8A) tem seu acoplamento (Figura 8B) (energia de -9,0) bem localizado na cavidade hidrofóbica e entre a  $\alpha$  hélice-1 e folha  $\beta$  -1. As interações (Figura 8C) de ligação de hidrogênio (VAL32, ARG30, GLN111, SER24), interações entre doadores (ASN29), pi-álquil (ILE25, ARG21, LEU54) e empilhamento pi-pi (PHE111).

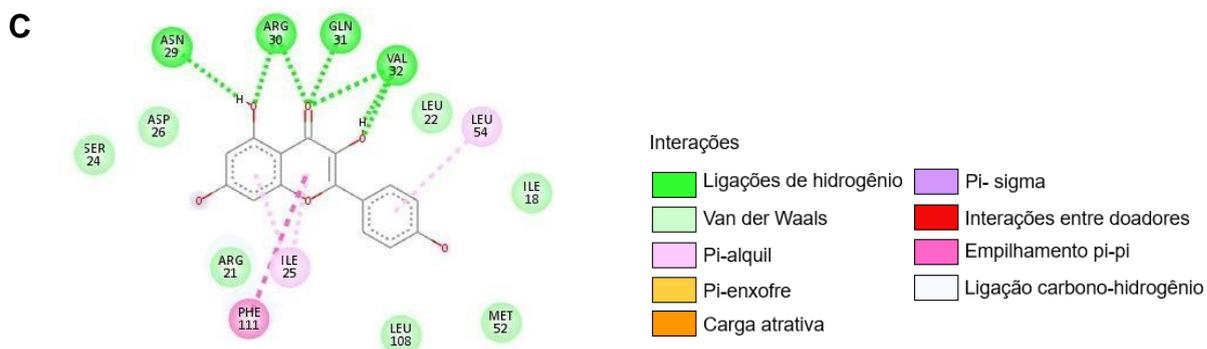
Figura 8: Estrutura 2D do composto APG (A), *docking molecular* na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B) e mapa de interação 2D (C).



O KAE (Figura 9A) acoplado (Figura 9B) (energia de -8,8) está bem localizado na cavidade hidrofóbica e entre a  $\alpha$  hélice-1 e folha  $\beta$  -1. As interações (Figura 9C) possui ligações de hidrogênio (ASN29, ARG30, GLN31, VAL32), empilhamento pi-pi (PHE111) e pi-álquil (ILE25, LEU54).

Figura 9: Estrutura 2D do composto KAE (A), *docking molecular* na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B) e mapa de interação 2D (C).

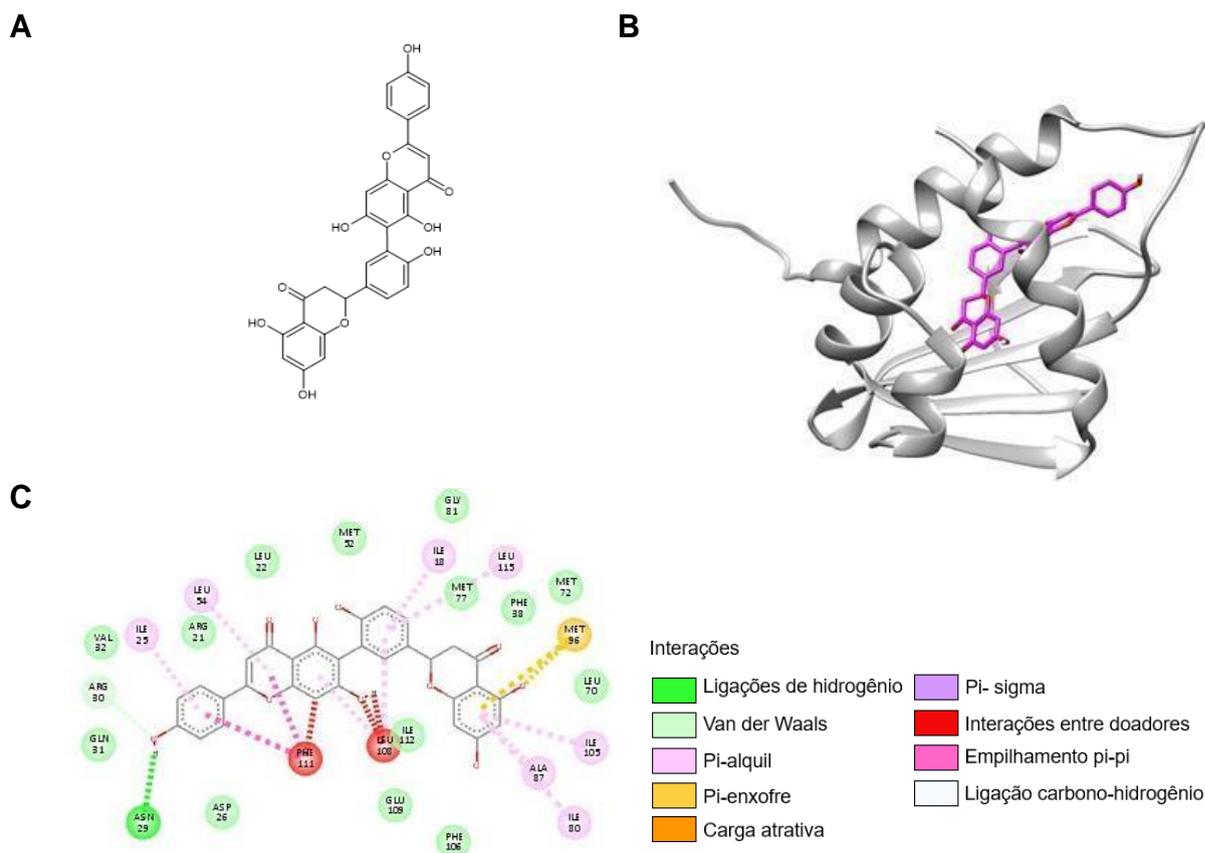




O CESA (Figura 10A) acoplado (Figura 10B) (energia de -7,6) apresenta-se bem localizado na cavidade hidrofóbica e entre a  $\alpha$  hélice-1 e folha  $\beta$  -1. Possui interações (Figura 10C) entre doadores (PHE111, LEU108), ligações de hidrogênio (ASN29), pi-alquil (ILE25, LEU54, ILE10, LEU115, ILE80, ALA87) e pi-enxofre (MET96).

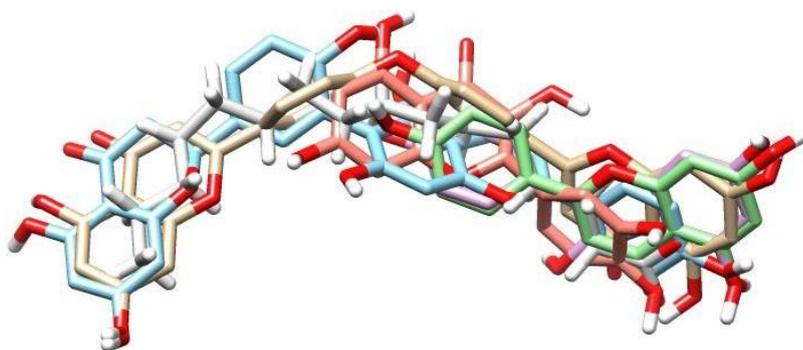
Observa-se que a ligação de hidrogênio (ARG30), empilhamento pi-pi (PHE111) assim como as interações com a GLN e VAL em variados tipos de interações são comuns entre todos os compostos exceto com o CESA (-7,6) que apresenta a menor energia de interação quando comparado aos demais. As interações com GLN e VAL estão presentes nos compostos (Figura 6-9) assim como observados no *redocking* do ligante co- cristalográfico (AP) da PCE-2 neste presente estudo como também aos enfatizados por Dyer et al., (2003) em seu estudo, mostrando serem importantes interações.

Figura 10: Estrutura 2D do composto CESA (A), *docking molecular* na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B) e mapa de interação 2D (C).



A sobreposição comparativa do AP e demais compostos (LNF, CESA, KAE, API e TAX) (Figura 11) recobre o ligante AP. O KAE, APG e TAX possuem menores estruturas, entretanto observamos que a localização na cavidade hidrofóbica e o posicionamento entre a  $\alpha$  hélice-1 e folha  $\beta$  -1 é crucial, onde notamos que possuindo esses requisitos os compostos apresentam uma boa energia de interação.

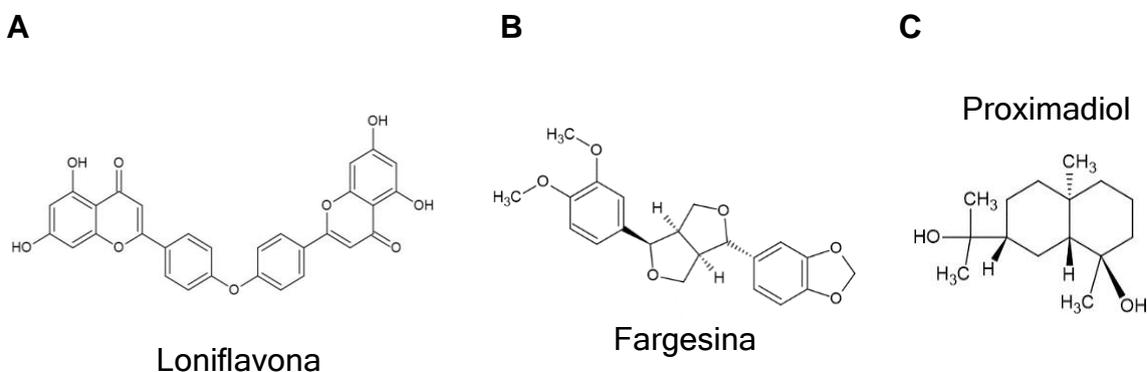
Figura 11: Sobreposição comparativa do AP e dos compostos presentes na fração metanólica (ME) e clorofórmica (CL) do extrato de *C. pyramidale*. AP (cinza), LNF (bege), CESA (azul), KAE(lilás), API (verde) e TAX (rosa).



## 5.5 DOCKING MOLECULAR DOS ANÁLOGOS DA LONIFLAVONA, FARGESINA E PROXIMADIOL NA ESTRUTURA DA PROTEÍNA CARREADORA DE ESTERÓIS-2

Após a realização da triagem virtual por análogos da loniflavona (biflavonóide) (Figura 12A), fargesina (lignana) (Figura 12B), proximadiol (sesquiterpeno) (Figura 12C) no banco de dados PubChem obtivemos respectivamente 1212, 77 e 420 compostos totalizando 1709 compostos.

Figura 12: Estruturas 2D dos compostos utilizados na triagem virtual. Loniflavona (A), fargesina (B) e proximadiol (C).



A Tabela 2 apresenta os compostos análogos utilizados na triagem virtual nos quais são nomeados por siglas e numerações, a loniflavona (L51, L46, L122, L158, e L26), fargesina (F151, F12, F167, F45 e F70) e proximadiol (P55, P67, P74, P23 e P60) seguidos de suas melhores energias obtidas a partir do cálculo de *docking molecular*.

O critério de corte de melhores energias de ligação dos 1709 compostos provindos dos análogos da L, F e P foram as energias superiores a -7,0 kcal/ mol, nas

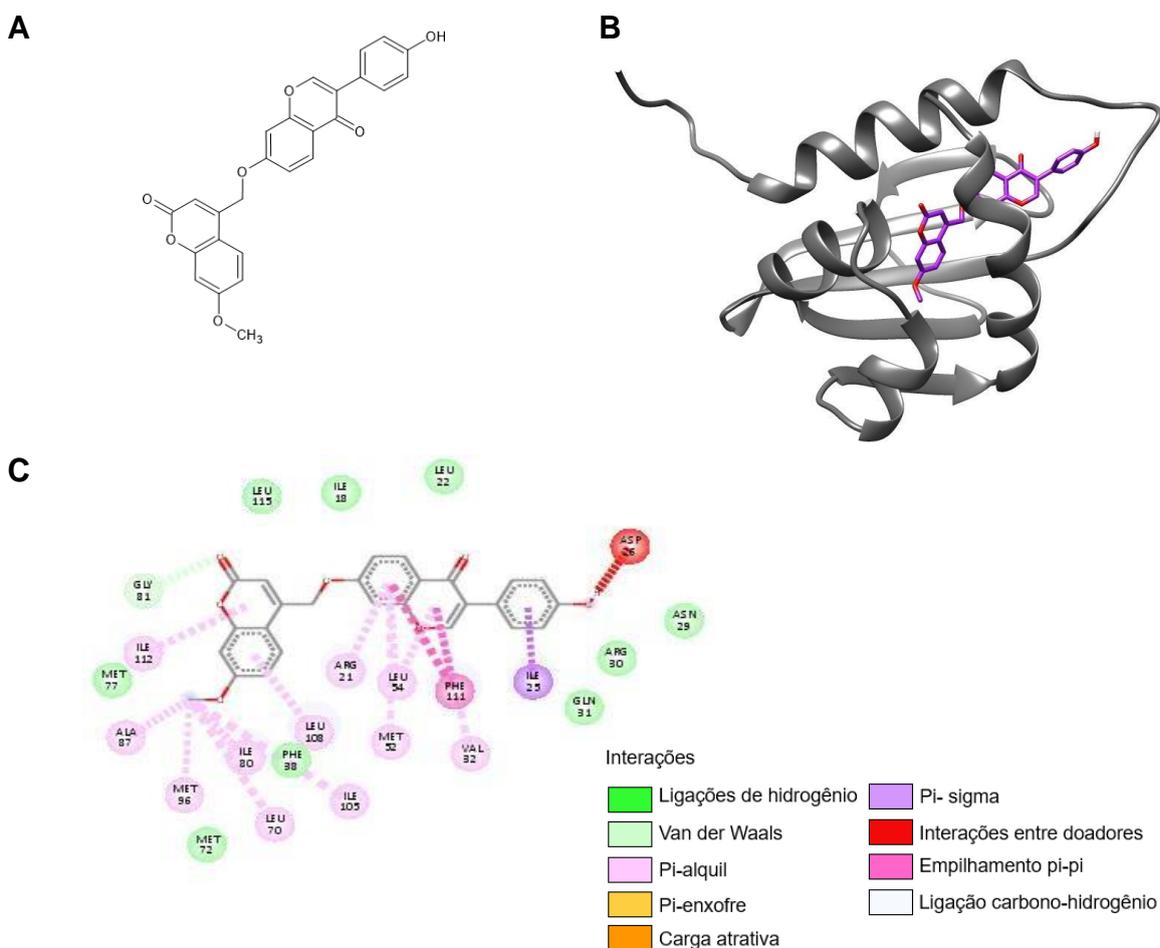
quais são consideradas como melhores energias, com isso, totalizaram-se 15 compostos provindos dos três análogos. Os análogos da L e F apresentaram as melhores energias sendo a F151 apresentando a melhor energia frente a todos os compostos com -12 kcal/ mol, o P apresentou as menores energias sendo em torno de -8 e -9 kcal/ mol (Tabela 2).

Tabela 2: Energia de ligação do ligante co-cristalográfico (AP) e as melhores energias de ligação (kcal / mol) da triagem virtual dos análogos da Ioniflavona (L), fargesina (F) e proximadiol (P) com valores maiores que -7,0.

<b>Composto</b>	<b>Energia de Ligação (kcal/ mol) <math>\Delta G^\circ</math></b>
L51	-11,9
L46	-11,9
L122	-11,9
L158	-11,8
L26	-11,8
F151	-12,0
F12	-11,8
F167	-11,8
F45	-11,7
F70	-11,7
P37	-9,3
P67	-8,5
P74	-8,3
P23	-8,2
P60	-8,1

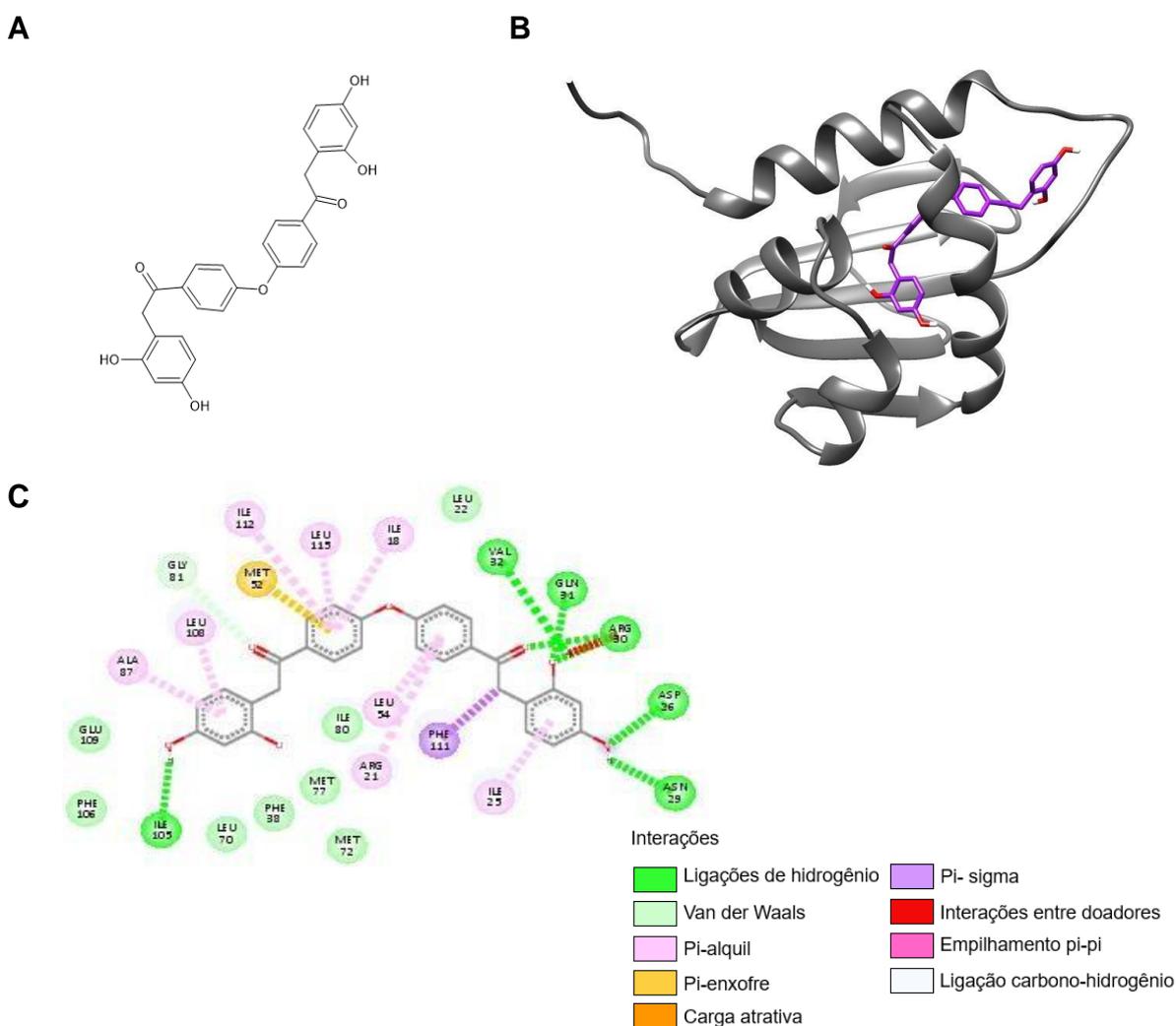
A Figura 13A apresenta o composto L51 (4 - [[3- (4-hidroxifenil) -4-oxocromen-7-il] oximetil] -7-metoxicromen-2-ona) (CID: 87336438). Na Figura 13B observamos o acoplamento deste composto 3D com energia de ligação de -11, 9 Kcal/ mol na PCE-2 no qual encontra-se na bolsa hidrofóbica e localizasse bem ente a  $\alpha$  hélice-1 e folha  $\beta$  -1. Na Figura 13C apresenta-se as possíveis interações com resíduos de aminoácidos, tipo Van der Waals com a GLY81, interações pi- alquil com ILE112, ALA87, MET96, ILE80, LEU70, ILE105, LEU108, ARG21, MET52, LEU54 e VAL32, interação pi- pi empilhamento com PHE111, interação pi- sigma com ILE25 e interação entre doadores com ASP 26.

Figura 13: Estrutura 2D do composto 51 (A), *docking molecular* do composto análogo da L na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B) e mapa de interação 2D (C).



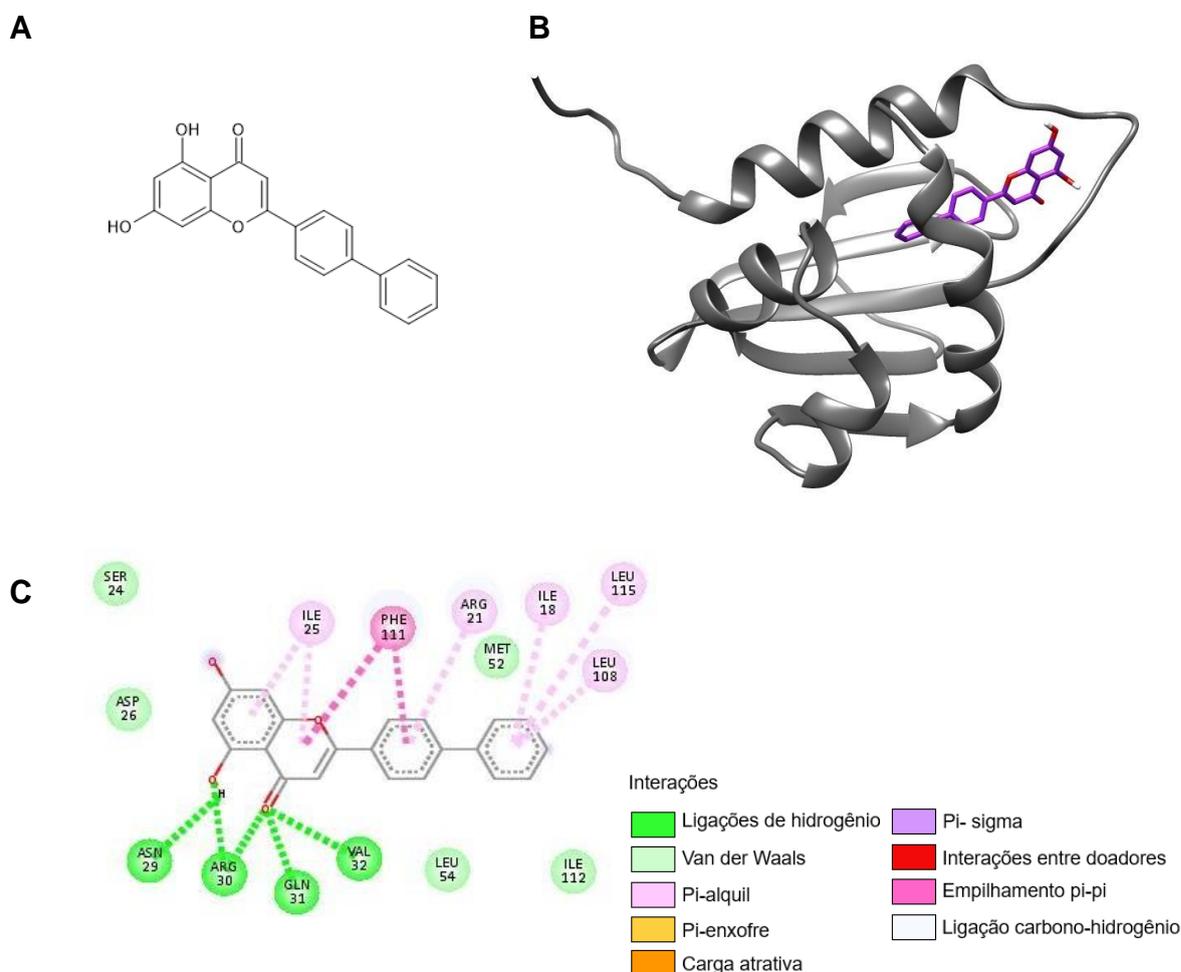
A Figura 14A apresenta a estrutura 2D do composto L46 (2- (2,4- dihidroxifenil) -1- [4- [4- [2- (2,4-dihidroxifenil) acetil] fenoxi] fenil] etanona) (CID: 123346742) acoplado na PCE-2 com energia de -11,9 Kcal/ mol bem posicionado na cavidade hidrofóbica e ente a  $\alpha$  hélice-1 e folha  $\beta$  -1 (Figura 14B), apresentando interações com os resíduos de aminoácidos (Figura 14C) por meio de ligações de hidrogênio a carbonila realiza interação com a ARG90 e a hidroxila com VAL32 e GLN31, sendo os mesmo resíduos (exceto as posições) encontrados fazendo interações na cabeça do ligante AP evidenciados por Dyer et al., (2003). Há outras interações como pi-álquil com resíduos de ILE25, LEU54, ARG21, ILE18, LEU115, ILE112, LEU108 e ALA87, pi- sigma com PHE111, cargas atrativas com MET52 e Vander Waals com GLY81.

Figura 14: Estrutura 2D do composto 46 (A), *docking molecular* do composto análogo da L na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).



Evidenciado na Figura 15A o composto em 2D da L122 (2- (1,1'-Bifenil-4-il) - 5,7-di-hidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona) (CID: 10336730). Seu acoplamento na PCE-2 com energia de -11,9 Kcal/ mol demonstra sua localização na cavidade hidrofóbica e sua porção inferior encontra-se distante da folha  $\beta$ - 1 (Figura 15B). Realiza ligações de hidrogênio com os resíduos ASN29 e ARG30 na hidroxila e ARG30, GLN31 e VAL32 na carbonila, observamos que as interações que acontecem na carbonila acontecem na carbonila e hidroxila do AP (Figura 15C) conforme Dyer et al., (2003). Ocorrem outras interações como pi- alquil com ILE25, ARG21, ILE18, LEU115 e LEU108, pi-pi empilhamento com PHE111.

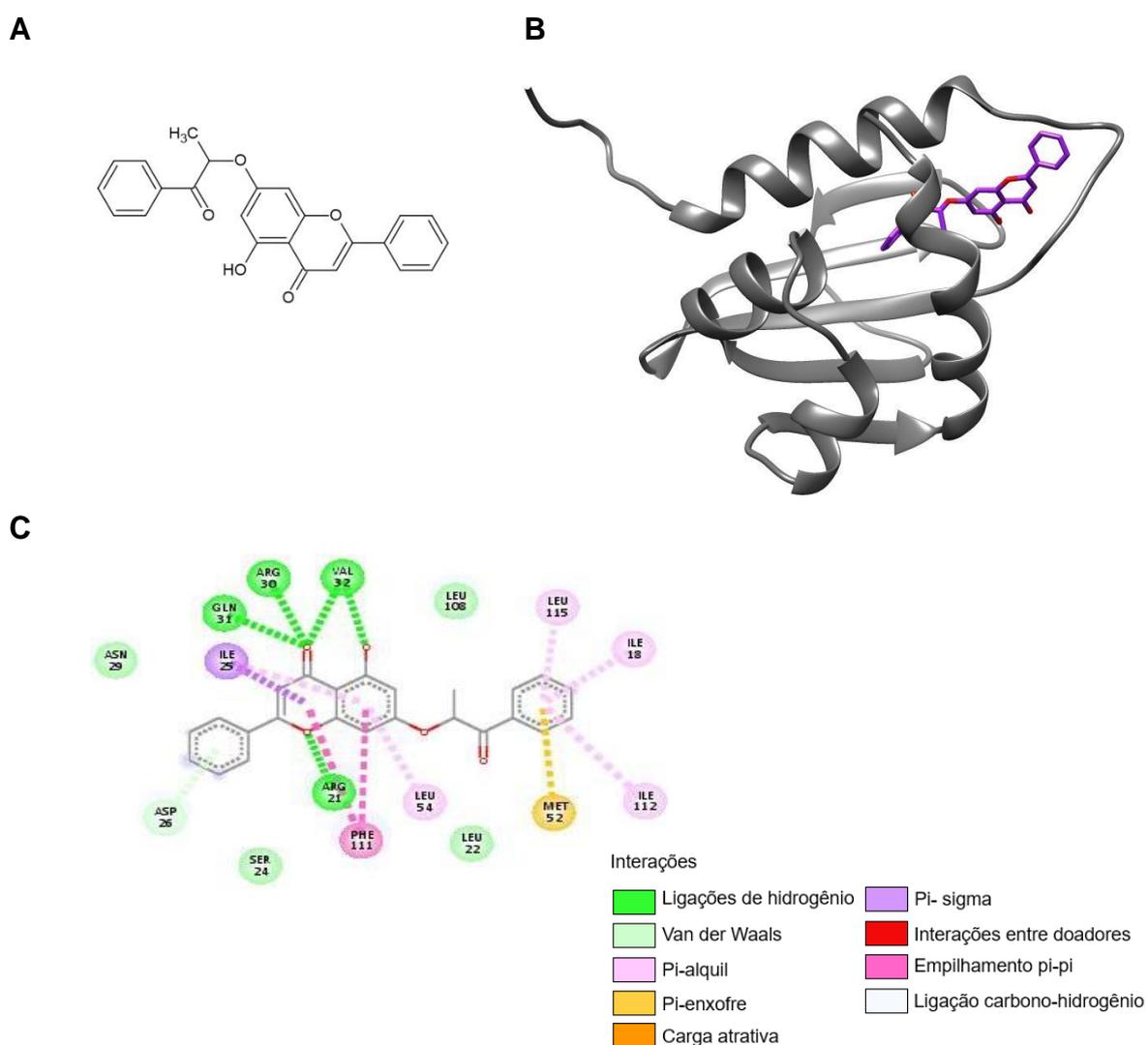
Figura 15: Estrutura 2D do composto 122 (A), *docking molecular* do composto análogo da L na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).



Observamos na Figura 16A o composto L158 5-hidroxi-7-(1-metil-2-oxo-2-feniletoksi) -2-fenil-4H-cromen-4-ona) (CID: 5898495), seu acoplamento 3D na PCE-2 (Figura 16B) com energia de -11,8 Kcal/ mol, o ligante se encontra na cavidade

hidrofóbica mas distante da folha  $\beta$  -1. As interações com resíduos de aminoácidos por ligações de hidrogênio ocorrem com oxigênio e ARG21, carbonila com a GLI31, ARG30, VAL32 e hidroxila com VAL32, outras interações ocorrem com pi-álquil com LEU115, ILE18, ILE112, LEU54, pi-pi empilhamento com PHE111, carga atrativa com MET52, pi-sigma com ILE25 e Van der Waals com ASP26 (Figura 16C). Este composto apresenta as mesmas interações de hidrogênio na carbonila como na L122 (Figura 15C).

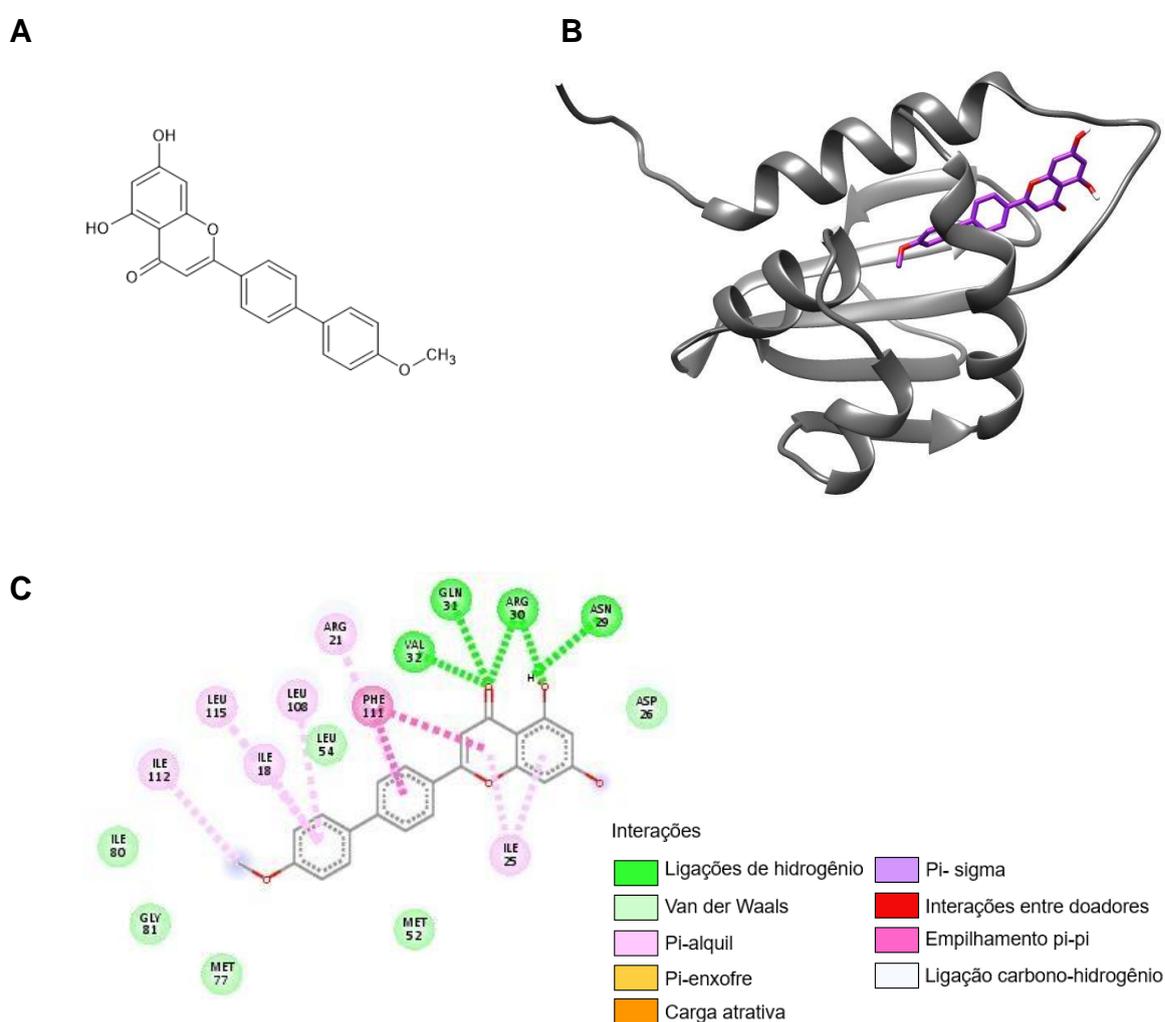
Figura 16: Estrutura 2D do composto 158 (A), *docking molecular* do composto análogo da L na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).



Na Figura 17A o composto L26 (5,7-dihidroxi-2- [4- (4-metoxifenil) fenil] cromen-4-ona) (CID: 152669496), acoplado na PCE-2 estando presente na cavidade hidrofóbica, mas distante da folha  $\beta$  -1 (Figura 17B) com energia de -11,8 Kcal/ mol.

As interações com os resíduos de aminoácidos (Figura 17C) demonstram interações por ligação de hidrogênio com a VAL32, GLN31 e ARG30 interagindo com a carbonila, ARG30 e ASN29 com hidroxila. Há presença de interações pi-alquil com ILE25, ARG21, LEU108, ILE18, LEU115 e ILE112, pi-pi empilhamento com PHE111. Os resíduos que interagem com a carbonila (VAL32, GLN31 e ARG30) também interagem na carbonila da L122 (Figura 15C) e L158 (Figura 16C).

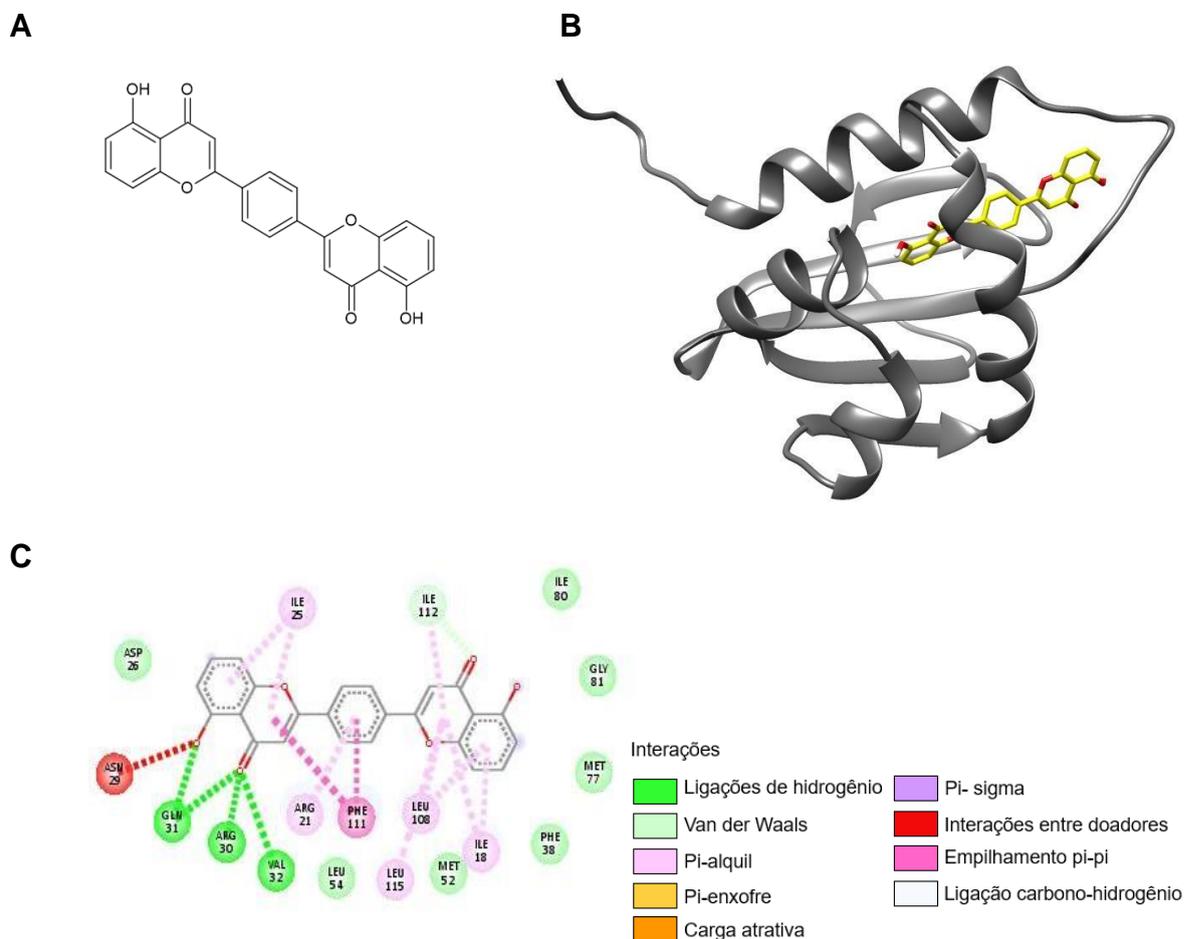
Figura 17: Estrutura 2D do composto 26 (A), *docking molecular* do composto análogo da L na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).



A Figura 18A apresenta o composto F151 (5-hidroxi-2-[4-(5-hidroxi-4-oxocromen-2-il) fenil] cromen-4-ona) (CID:21015400), ancorado na PCE-2 em formato 3D com energia de -12 Kcal/ mol (Figura 18B) posicionado na cavidade hidrofóbica, mas distante da folha  $\beta$  -1. As interações dos resíduos de aminoácidos ocorrem com ASN29 tipo interações entre doadores, ILE25, ARG21, LEU115, LEU108 e ILE18 tipo

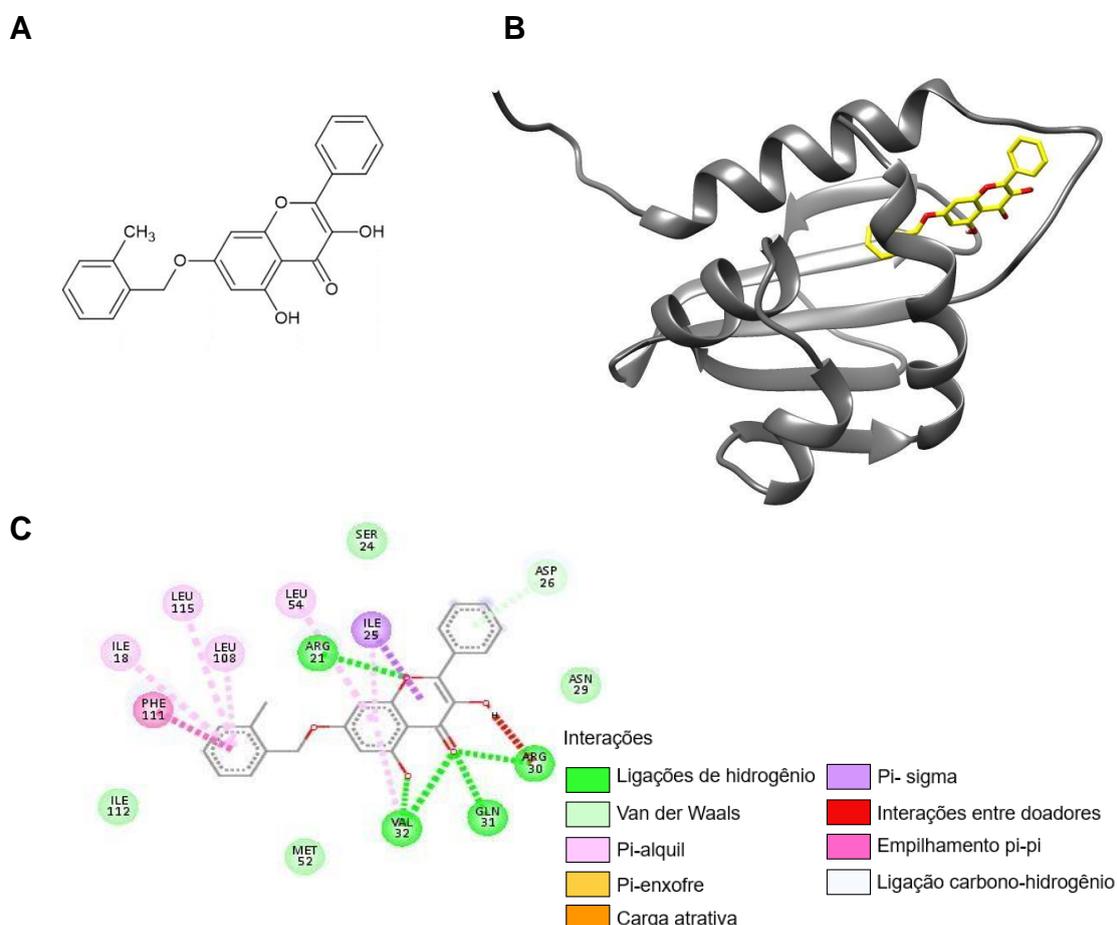
pi-alquil e ILE112 tipo Van de Waals, as ligações de hidrogênio ocorrem entre uma das carbonilas presentes realizando interações com GLN31, ARG30, VAL32 e uma das hidroxilas com a GLN3 (Figura 18C).

Figura 18: Estrutura 2D do composto 151 (A), *docking molecular* do composto análogo da F na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).



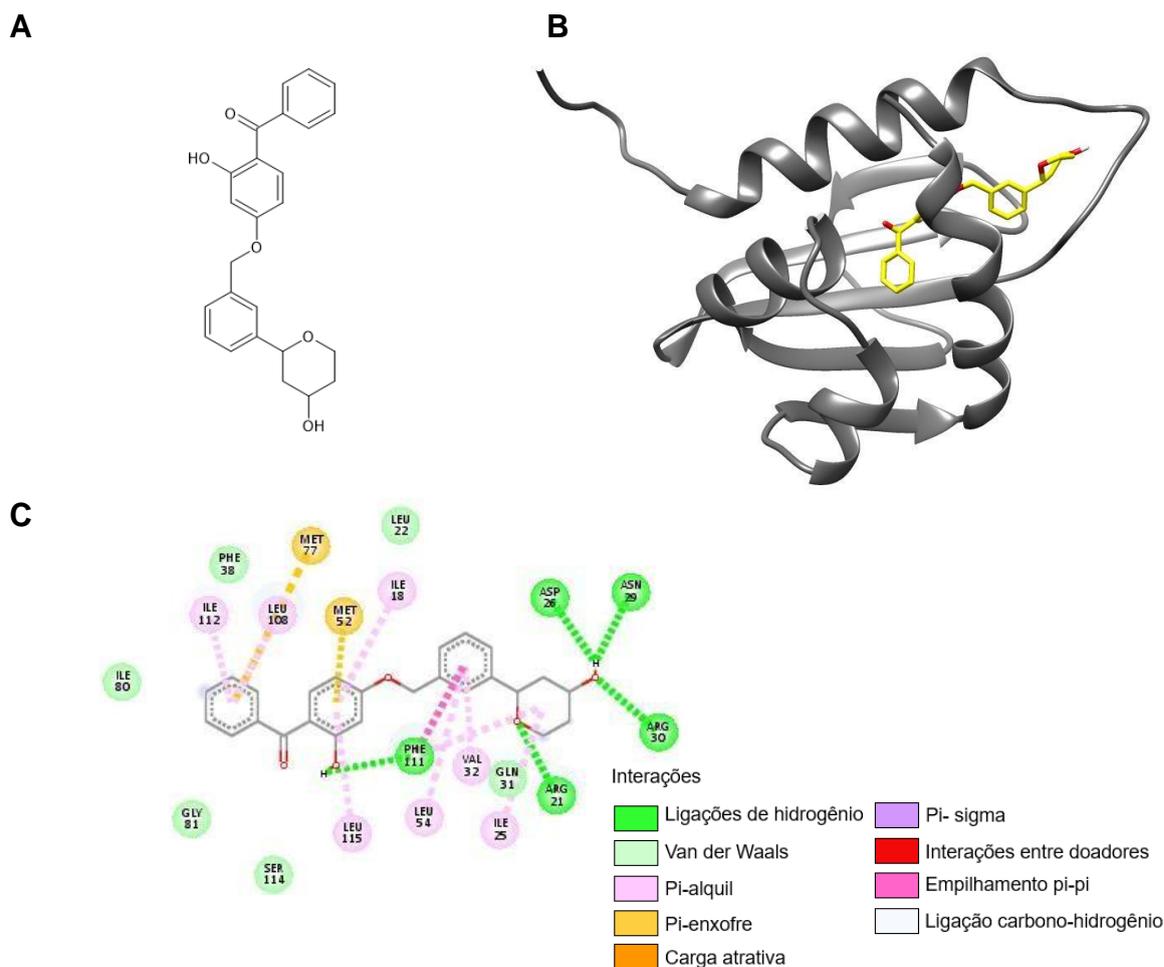
A Figura 19A demonstra a molécula F12 (3,5-Dihidroxi-7- (o-tolilmetoxi) -2-fenil-cromen-4-ona) (CID: 52946275), e sua estrutura 3D acoplada na PCE-2 com energia de -11,8 Kcal/ mol (Figura 19B) situada na cavidade hidrofóbica e distante da folha  $\beta$  -1. As ligações de hidrogênio ocorrem frente aos resíduos de VAL32, GLN31, ARG30 na carbonila e ARG2 e VAL32 na hidroxila, ocorrem outras interações tipo pi-sigma com ILE25, tipo pi- alquil com LEU54, LEU108, LEU115 e ILE18, e tipo pi-pi empilhamento com PHE111 (Figura 19C). Observamos as mesmas interações de resíduos de aminoácidos tipo ligação de hidrogênio na carbonila da F151 (Figura 18C).

Figura 19: Estrutura 2D do composto 12 (A), *docking molecular* do composto análogo da F na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).



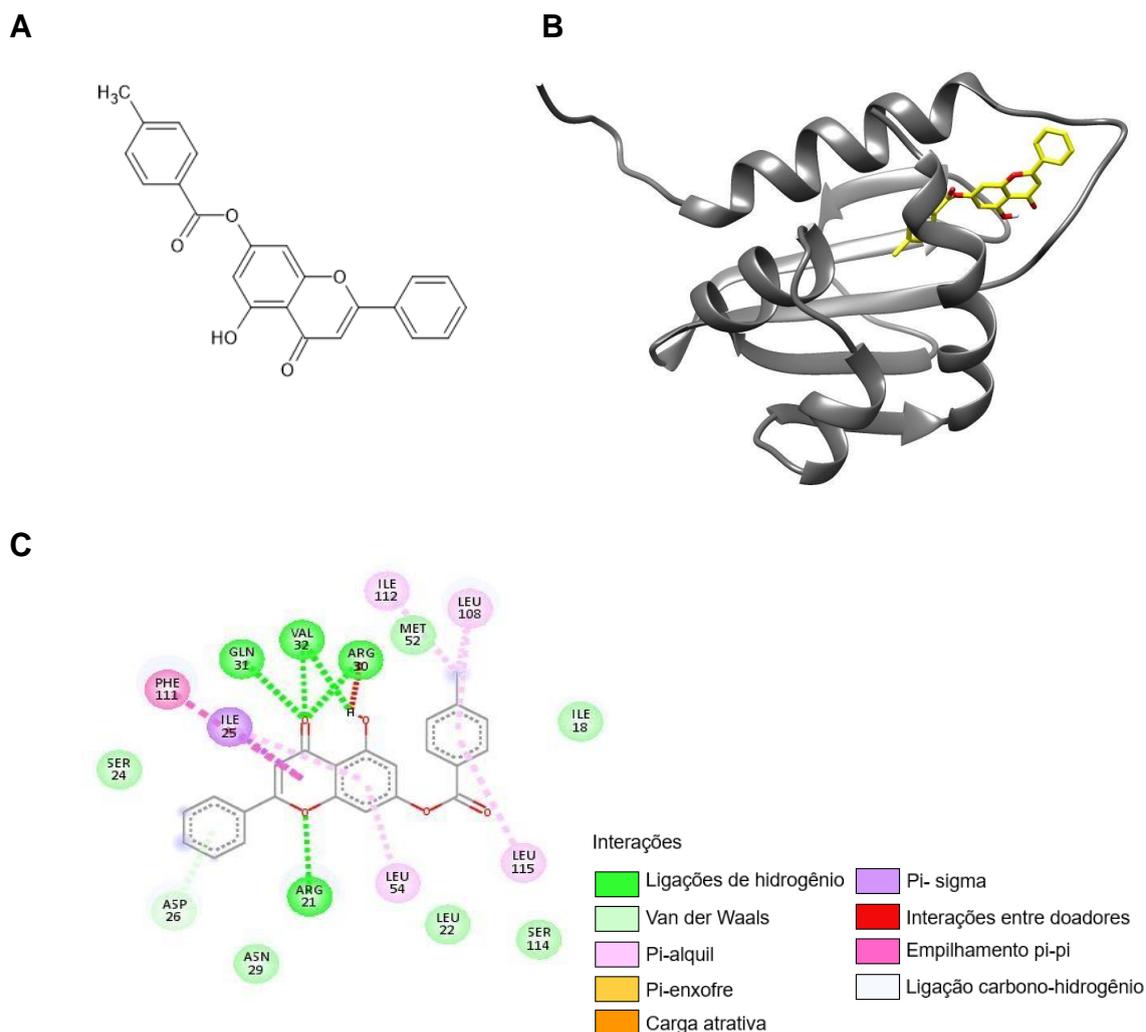
A Figura 20A demonstra a estrutura 2D da F167 (2-hidroxi-4 - [[3- (4-hidroxi-oxan-2-il) fenil] metoxi] fenil] -fenilmetanona) (CID: 19933031), e sua estrutura 3D acoplada na PCE-2 com energia de -11,8 Kcal/ mol (Figura 20B) bem localizada na cavidade hidrofóbica,  $\alpha$  hélice-1 e  $\beta$  -1. As interações com os resíduos de aminoácidos apresentam ligações de hidrogênio com ASP26, ASN29, ARG30, PHE111 na hidroxila e ARG21 na carbonila, outras interações ocorrem, tipo pi-álquil com VAL32, ILE25, LEU54, LEU115, ILE112, LEU108 e ILE18, tipo carga atrativa com MET27 e MET52 (Figura 20C). Diferentemente da F151 (Figura 18C) e F12 (Figura 19C) a F167 (Figura 20C) não apresenta os mesmo resíduo na carbonila.

Figura 20: Estrutura 2D do composto 167 (A), *docking molecular* do composto análogo da F na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).



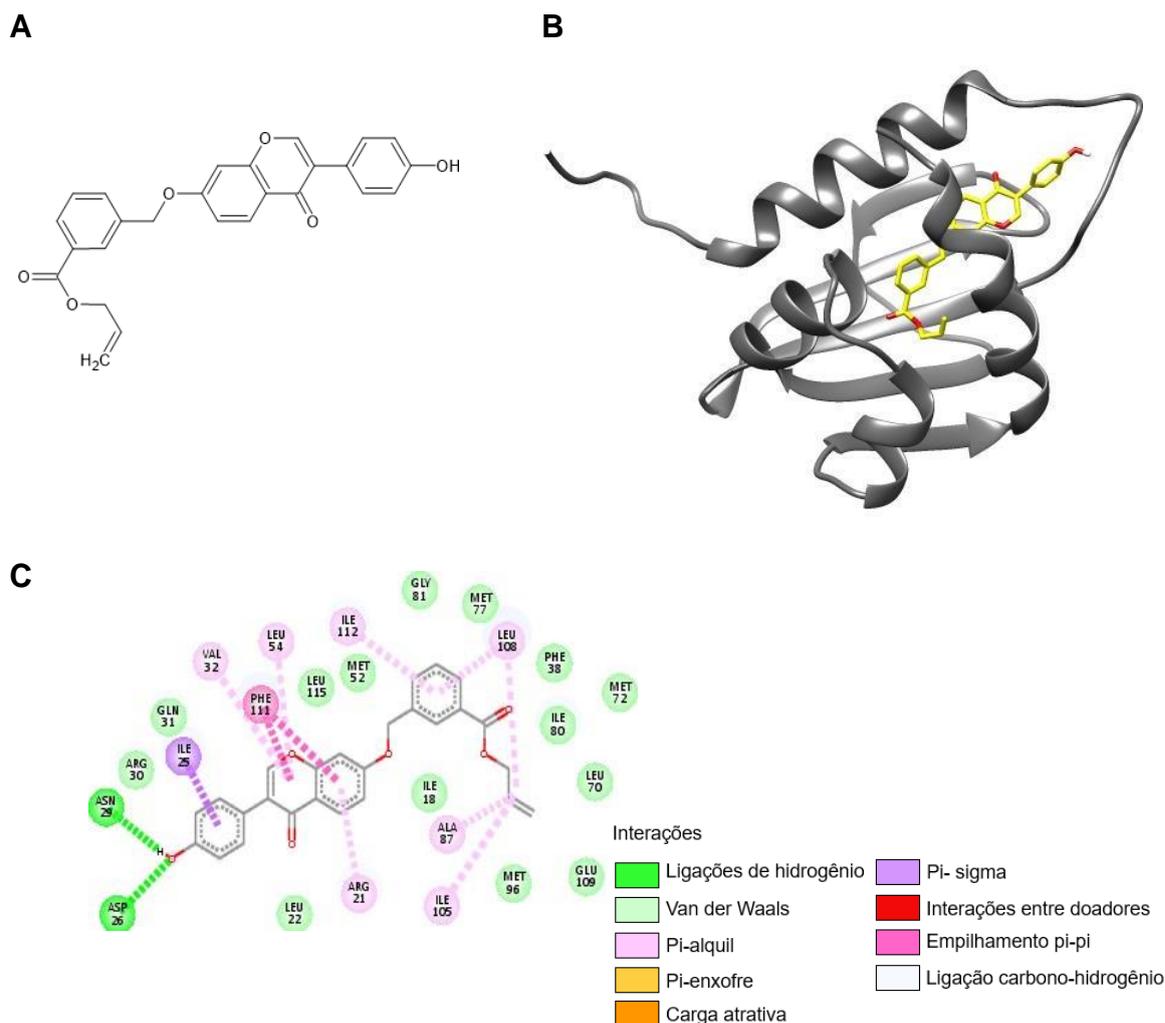
A Figura 21A demonstra a estrutura 2D da F45 (5-hidroxi-7- (4-metilbenzoiloxi) flavona) (CID: 44382144), e sua estrutura 3D acoplada na PCE-2 com energia de -11,7 kcal/ mol, encontra-se na cavidade hidrofóbica, mas longe da folha  $\beta$  -1 (Figura 21B). Ocorrem ligações de hidrogênio com a carbonila e os resíduos de GLN31, VAL32 e ARG30, a hidroxila interage com a ARG21, outras interações ocorrem tipo pi-álquil com ILE112, LEU106, LEU115 e LEU54, e tipo pi-pi empilhamento com PHE111 (Figura 21C). Igualmente a F151 (Figura 18C) e F12 (Figura 19C) nas ligações de hidrogênio com a carbonila observamos os mesmo resíduos de GLN31, VAL32 e ARG30 também na carbonila. A interação com a hidroxila apresenta-se por pi-pi empilhamento com a PHE111 como encontrado também na hidroxila da F167 (Figura 20C).

Figura 21: Estrutura 2D do composto 45 (A), *docking molecular* do composto análogo da F na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).



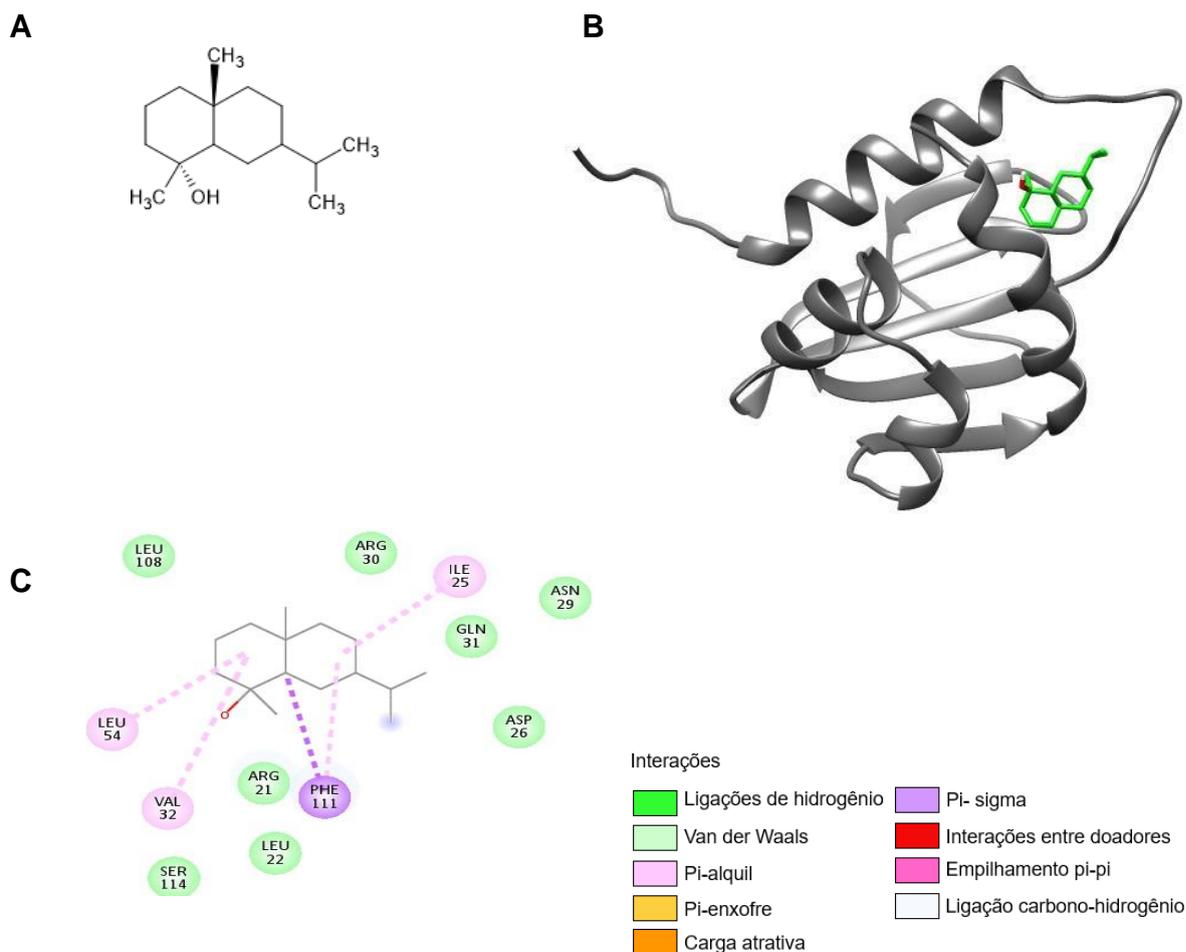
A Figura 22A demonstra o composto 2D da F70 (Prop-2-enil 3 - [[3- (4-hidroxifenil) -4-oxocromen-7-il] oximetil] benzoato) (CID: 42606259), e seu formato 3D acoplado na PCE-2 com energia de -11,7 kcal/ mol (Figura 22B), localizada na cavidade hidrofóbica e entre a  $\alpha$  hélice-1 e  $\beta$  -1. As interações mostram ligações de hidrogênio ASP26 e ASN29 na hidroxila, outras interações ocorrem tipo pi-sigma com ILE25, pi-pi empilhamento com PHE111 e pi-alkil com VAL32, LEU54, ILE112, LEU108, ALA87, ILE 105 e ARG21 (Figura 22C). Apresenta interações com a hidroxila por ligações de hidrogênio que também interagem com a F167 (Figura 20C).

Figura 22: Estrutura 2D do composto 70 (A), *docking molecular* do composto análogo da F na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).



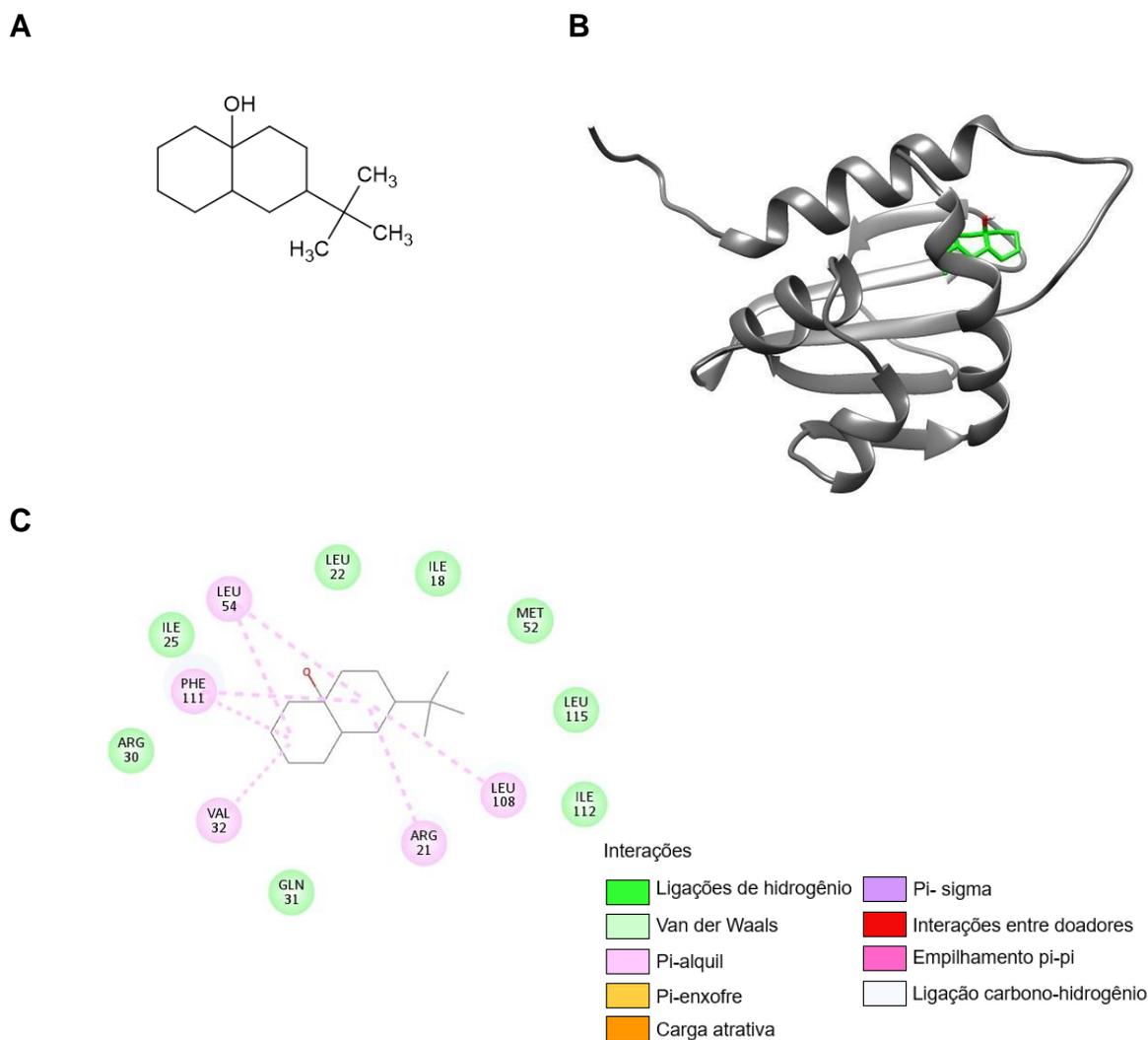
A Figura 23A demonstra o composto P37 (Selin-4.alpha.-ol) (CID: 91749978), seu formato 3D acoplado na PCE-2 possuindo energia de -9,3 kcal/ mol onde tem uma porção localizada na cavidade hidrofóbica, entretanto longe da folha  $\beta$  -1 sendo importante enfatizar o tamanho da estrutura do mesmo em comparação com o ligante co- cristalográfico (AP) (Figura 23B). Nas interações de resíduos de aminoácidos (Figura 23C) observamos interações pi- alquil com LEU54, VAL32 e ILE25 e pi-pi empilhamento com PHE111.

Figura 23: Estrutura 2D do composto 37 (A), *docking molecular* do composto análogo do P na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).



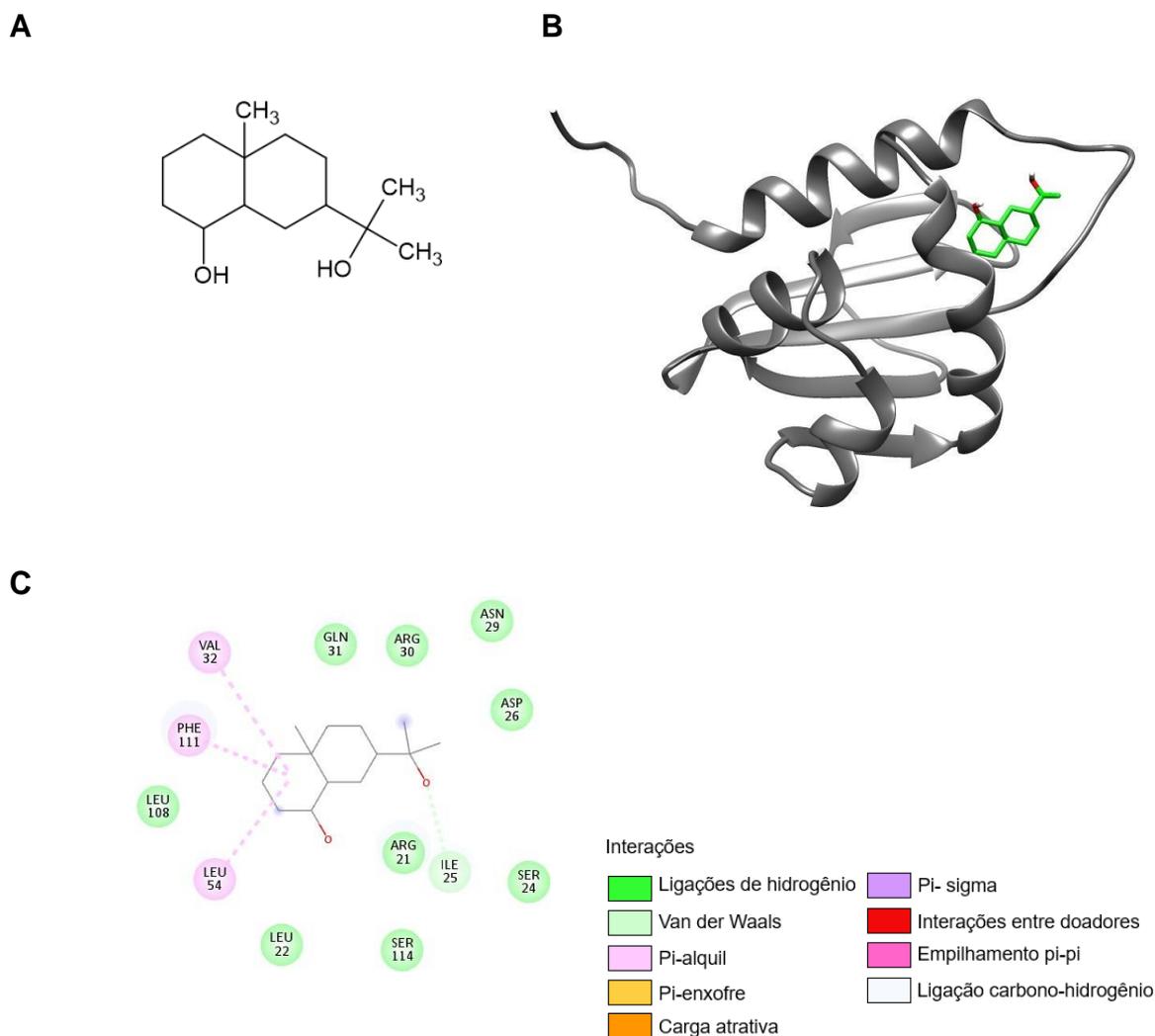
A Figura 24A demonstra o composto P67 (8-t-butil-biciclo[4.4.0] decanol-1) (CID: 12450469), e seu acoplamento na PCE-2 com energia de -8,5 kcal/ mol onde demonstra que sua localização não se encontra bem situada na cavidade hidrofóbica da PCE-2, mesmo estando entre a  $\alpha$  hélice-1 e folha  $\beta$  -1 ainda não demonstra a posição similar ao ligante co-cristalográfico AP tendo em vista o tamanho da sua estrutura (Figura 24B). Nas interações dos resíduos de aminoácidos (Figura 24C) observamos interações tipo pi-alkil com LEU54, PHE111, VAL32, ARG21 e LEU108.

Figura 24: Estrutura 2D do composto 67 (A), *docking molecular* do composto análogo do P na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).



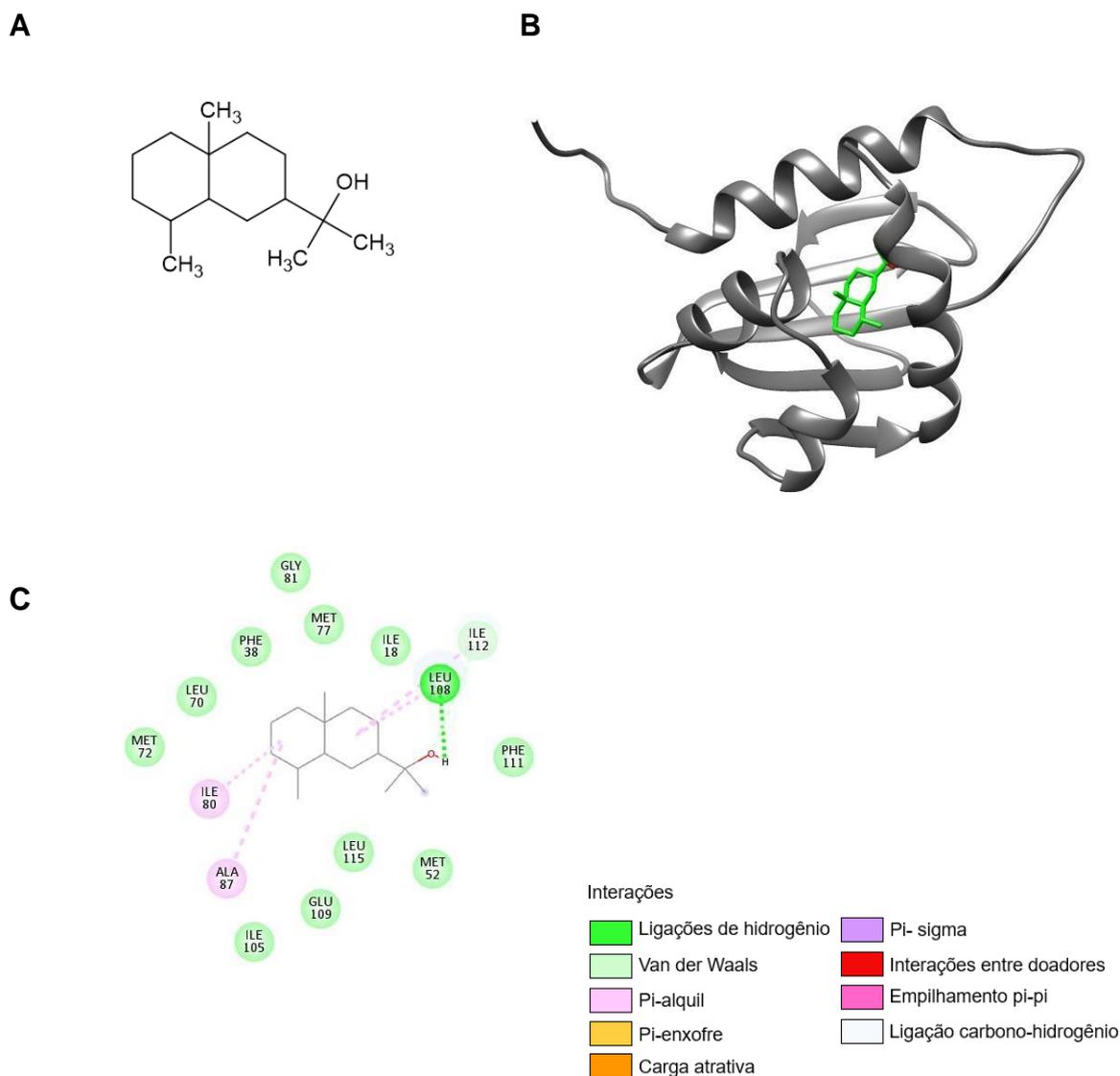
A Figura 25A demonstra o composto P74 (7-(1-Hidroxi-1-metil-etil)-4a-metil-decalin-1-ol) (CID: 494432), acoplado na PCE-2 com energia de -8,3 kcal/ mol (Figura 25B), a localização do ligante tem uma porção localizada na cavidade hidrofóbica mas observa-se um grande distanciamento da folha  $\beta$  -1. Existe interações tipo Van der Waals com ILE25 e tipo pi- alkil com VAL32, PHE111 e LEU54 (Figura 25C).

Figura 25: Estrutura 2D do composto 74 (A), *docking molecular* do composto análogo do P na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).



A Figura 26A demonstra o composto P23, e seu formato 3D acoplado na PCE-2 com energia de  $-8,2$  kcal/ mol (Figura 26B). O P23 não se localiza na cavidade hidrofóbica e situa-se distante da  $\alpha$  hélice-1. Ocorrem interações tipo pi-álquil com ILE80 e ALA87, ligação de hidrogênio com LEU108 e Van der Waals com ILE112 (Figura 26C).

Figura 26: Estrutura 2D do composto 23 (A), *docking molecular* do composto análogo do P na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).



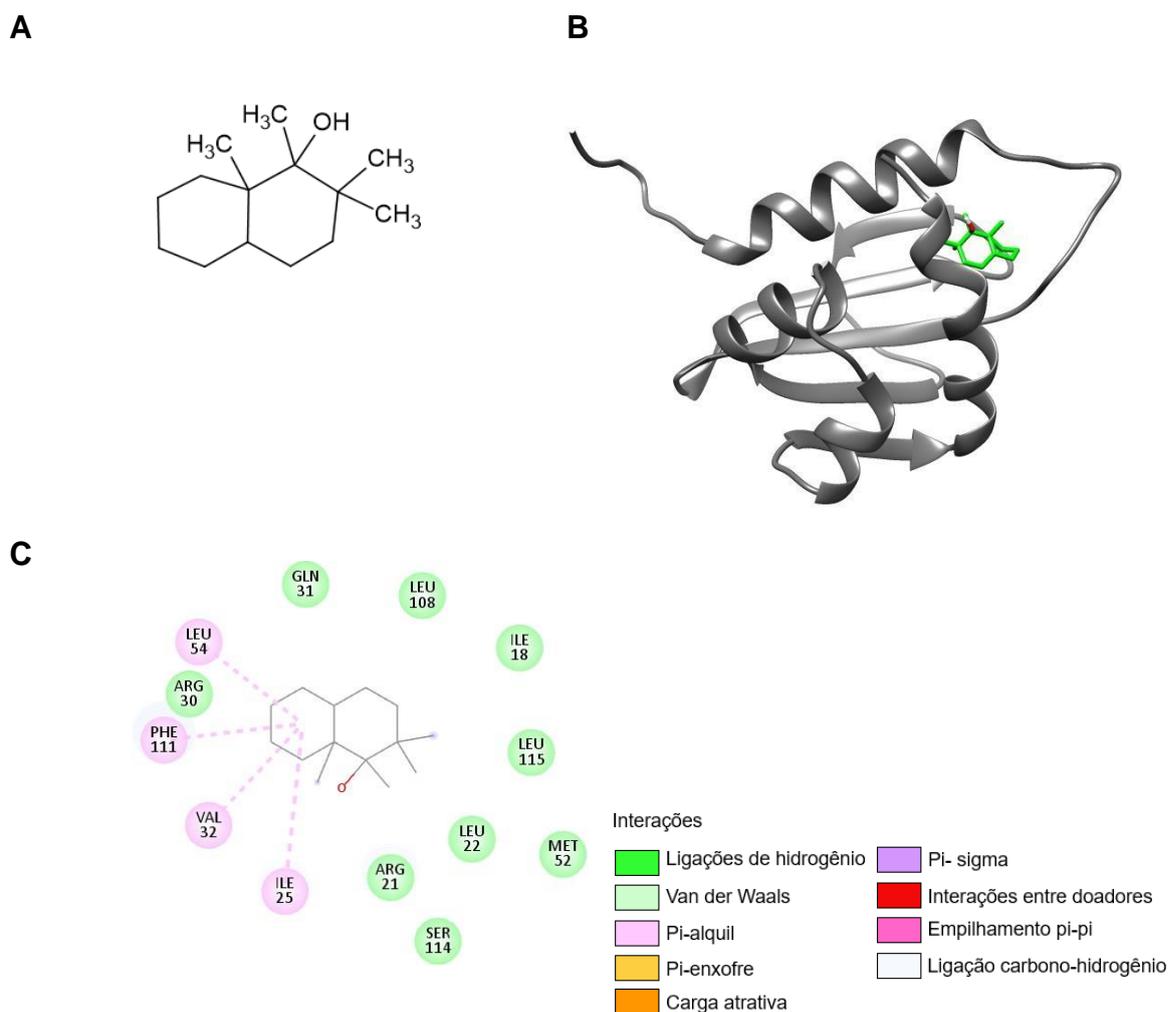
A Figura 27A demonstra o composto P60 (1,2,2,8a-tetrametil-4,4a,5,6,7,8-hexa-hidro-3H-naftalen-1-ol), seu formato 3D acoplado na PCE-2 apresentando energia de -8,1 kcal/ mol (Figura 27B), o ligante não se localiza na cavidade hidrofóbica mais externa e encontra-se distante da folha  $\beta$  -1. As interações de aminoácidos são do tipo pi- alkil com LEU54, PHE111, VAL32 e ILE25 (Figura 27C). Os análogos da L e F apresentaram boas energias, realizaram interações tipo ligação de hidrogênio assim como interagiram com a carbonila e hidroxila, corroborando com os resultados obtidos no *redocking* onde interagiram com a VAL26 e GLN25 na carbonila assim como os enfatizados por Dyer et al., (2003).

A localização dos ligantes na cavidade hidrofóbica indicaram as melhores (L e F) e piores energias (P), comparando o posicionamento entre a  $\alpha$  hélice-1 e folha  $\beta$  -

1 os resultados variaram para L e F onde alguns possuíram uma boa localização entre a hélice-1 e folha  $\beta$  -1 e outras apresentaram uma certa distância da folha  $\beta$  -1, no entanto sempre localizadas na cavidade hidrofóbica.

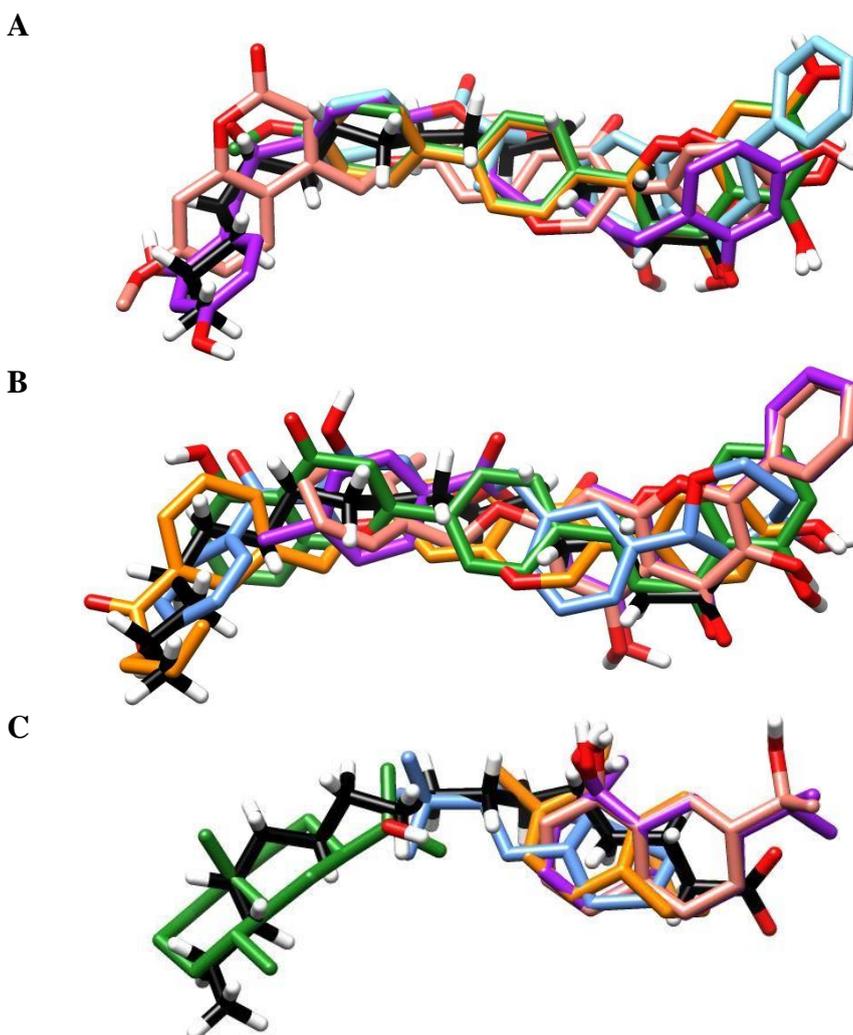
Para os análogos ao P constatamos as menores energias como também a localização dos ligantes na PCE-2 não foram satisfatórios onde variaram desde ausência do ligante na cavidade hidrofóbica mais externa, distanciamento da  $\alpha$  hélice-1 e folha  $\beta$  -1 ou apenas da folha  $\beta$  -1. Apenas o P23 apresentou uma única interação com o hidrogênio (LEU108) os demais análogos de P não apresentaram nenhuma ligação com hidrogênio e temos que quando comparados com os análogos L e F esta é uma ligação crucial para uma boa interação no sítio da PCE-2, justificando assim os análogos de P como sendo os que apresentaram menores energias de ligação.

Figura 27: Estrutura 2D do composto 60 (A), *docking molecular* do composto análogo do P na proteína carreadora de esteróis- 2 (PCE-2) (B), mapa de interação 2D (C).



Na Figura 28 a sobreposição comparativa dos análogos L (Figura 20A), F (Figura 20B) e P (Figura 20C) com o AP, os análogos da L e F possuem grandes cadeias quando comparados aos análogos de P, cadeias estas que recobrem todo o ligante co-cristalográfico AP, entretanto é notório que a localização do ligante na cavidade hidrofóbica e aproximação na  $\alpha$  hélice-1 e folha  $\beta$  -1 é importante para energia de ligação.

Figura 28: Sobreposição comparativa do AP (preto) e análogos da Ioniflavona, L122 (laranja), L158 (azul), L26 (verde), L46 (roxo) e L51 (rosa) (A), Sobreposição comparativa do AP (preto) e análogos da fargesina, F151 (verde), F167 (azul), F45 (roxo), F70 (laranja) e F12 (rosa) (B), Sobreposição comparativa do AP (preto) e análogos do proximadiol, P23 (verde), P37 (roxo), P60 (laranja), P67 (azul) e P74 (rosa) (C).



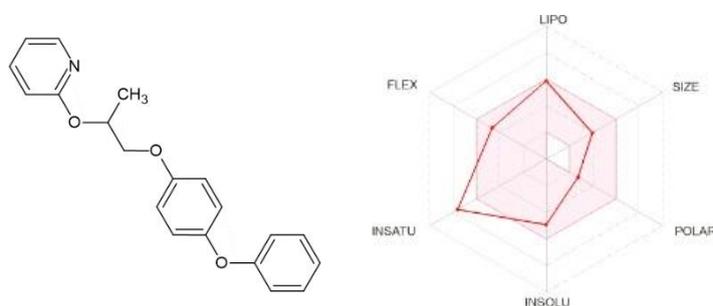
## 5.6 RADAR DE BIODISPONIBILIDADE E PROPRIEDADES ADME DOS COMPOSTOS PRESENTES NA FRAÇÃO METANÓLICA E CLOROFÓRMICA

As propriedades ADME visam prever a capacidade de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um determinado composto (Daina; Michielin; Zoete, 2017), importante para que seja possível saber principalmente a solubilidade e permeabilidade por entre as membranas biológicas durante o desenvolvimento de novas moléculas bioativas (Dreassi & Zizzari et al., 2009).

Analisamos as propriedades de cada composto quanto a sua predição ADME. Este radar visa dar uma visão primária de algumas propriedades dos compostos nos quais se assemelham a medicamentos, exatas seis propriedades físico-químicas são destacadas no radar: lipofilicidade (Log P), tamanho (massa molecular), polaridade (TPSA<sup>[a]</sup>), insolubilidade (Log S), insaturação (fração de carbonos na hibridização sp<sup>3</sup>) e flexibilidade (número de ligações rotacionáveis) (Daina; Michielin; Zoete, 2017). Quando o tracejado vermelho se alinha totalmente ao radar em coloração rosa considera-se como um ótimo composto.

Na Figura 29 observa-se a estrutura química e o radar de biodisponibilidade do piriproxifeno (PPX), um larvicida regulador de crescimento de insetos amplamente utilizado no combate das larvas de *A. aegypti*, no radar consta a insaturação além do preconizado, a insolubilidade se aproximando do preconizado e a lipofilicidade se alinhando.

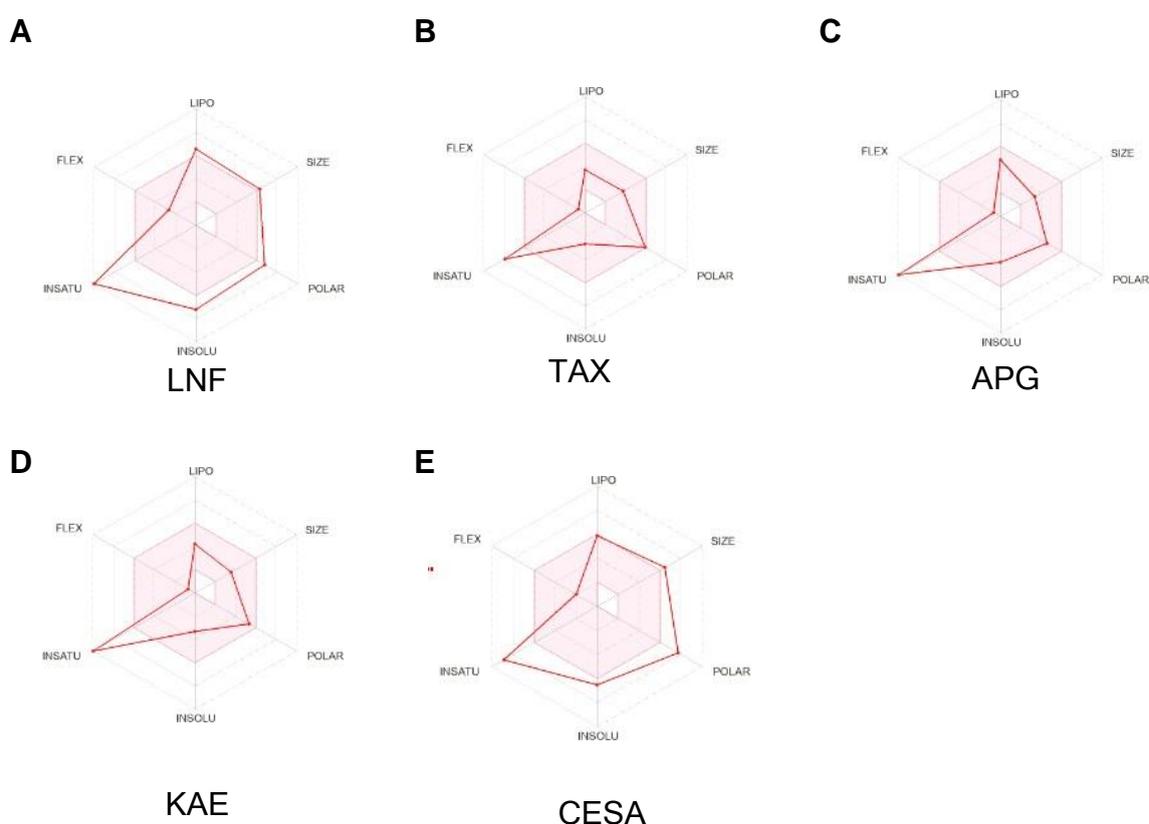
Figura 29: Radar de biodisponibilidade do piriproxifeno.



A LNF apresenta insaturação e insolubilidade além do radar preconizado (Figura 30A). A TAX (Figura 30B), APG (Figura 30C) e KAE (Figura 30D) também

apresentam suas insaturação além do radar. O composto CESA (Figura 30E) além da insaturação apresenta a polaridade e insolubilidade expressivas. Com base nos radares da Figura 30, possuir insaturações é importante para ser considerado um composto com boa energia de interação, o radar do piroproxifeno (PPX) (Figura 29) reafirma essa importância ao também apresentar insaturações expressivas.

Figura 30: Radar de biodisponibilidade dos compostos presentes na fração metanólica (ME) e clorofórmica (CL) do extrato de *C. pyramidale*.



Na Tabela 3 as propriedades ADMET dos compostos presentes na fração ME e CL não violaram a regra de Lipinski e possuem uma boa acessibilidade sintética. A LNF e CESA apresentam baixa absorção gastrointestinal. Nenhum dos compostos permeiam a barreira hematoencefálica. Os compostos são pouco solúveis ou moderadamente solúvel.

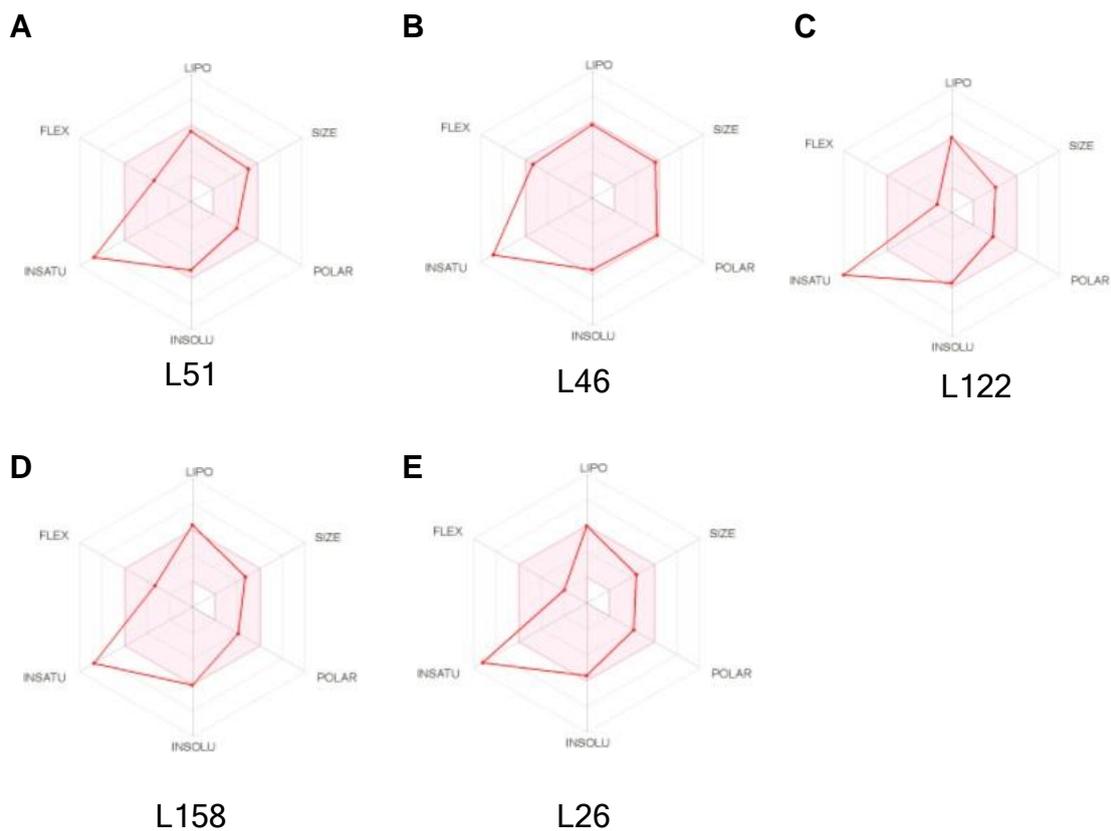
Tabela 3: Propriedades ADMET dos compostos presentes na fração metanólica (ME) e clorofórmica (CL) do extrato de *C. pyramidale*.

	<b>Absorção GI</b>	<b>Permeação BBB</b>	<b>Acessibilidade sintética</b>	<b>Solubilidade em água</b>
LNF	Baixo	Não	3,39	Pouco solúvel
TAX	Alto	Não	3,51	Pouco solúvel
APG	Alto	Não	2,96	Moderadame nte solúvel
KAE	Alto	Não	3,14	Pouco solúvel
CESA	Baixo	Não	4,60	Pouco solúvel

### 5.7 RADAR DE BIODISPONIBILIDADE E PROPRIEDADES ADME DOS ANÁLOGOS DA LONIFLAVONA, FARGESINA E PROXIMADIOL

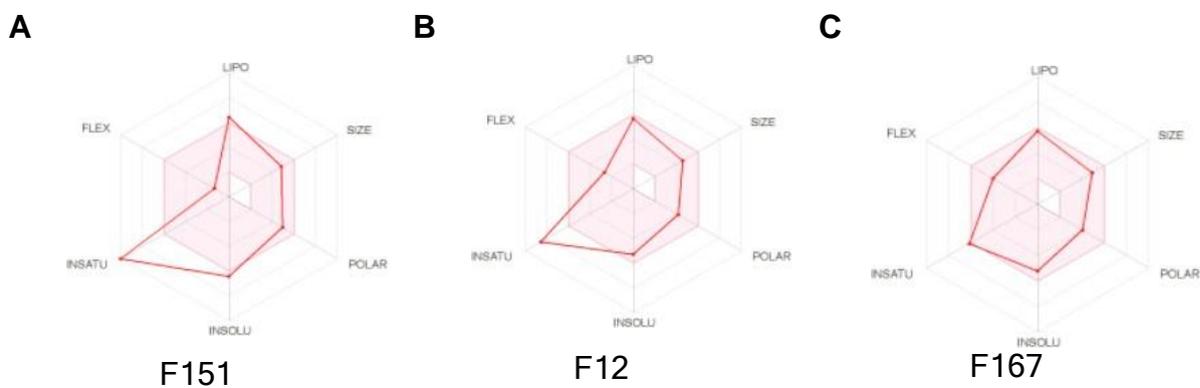
Observamos na Figura 31 que a propriedade em comum que todos os análogos (L) apresentam onde o tracejado vermelho sai totalmente do radar rosa é a insaturação. Verificando as outras propriedades todas estão dentro do espectro esperado. A L46 (Figura 31B) destaca-se das demais por apresentar tamanho e polaridade de acordo com o preconizado pelo radar. Notamos que a insaturação, lipofilicidade e insolubilidade são propriedades que todos os análogos apresentam, de forma expressiva no caso da insaturação e dentro ou alinhadas ao radar na lipofilicidade e insolubilidade.

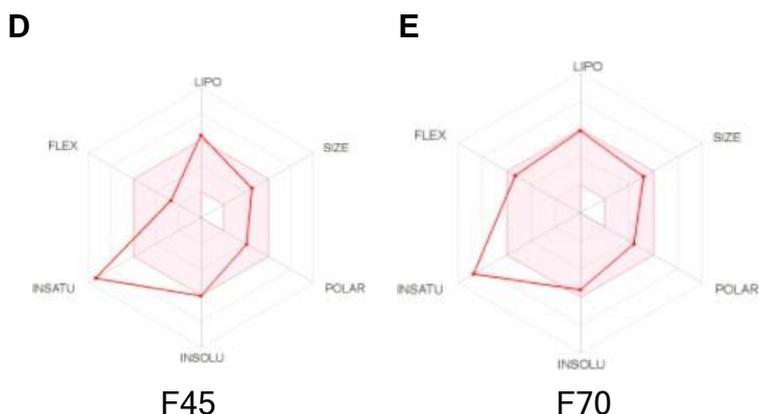
Figura 31: Radar de biodisponibilidade dos análogos da Loniflavona (L).



No radar de biodisponibilidade dos análogos da F na Figura 32. A F167 (Figura 32C) apresenta as melhores disposições no radar (Figura 32C). A insaturação está além do radar em todos os análogos exceto na A F167 (Figura 32C). Assim como os análogos da L (Figura 31) os análogos da F apresentam, insaturação e no caso da lipofilicidade e insolubilidade dentro ou alinhadas ao radar.

Figura 32: Radar de biodisponibilidade dos análogos da Fargesina (F).



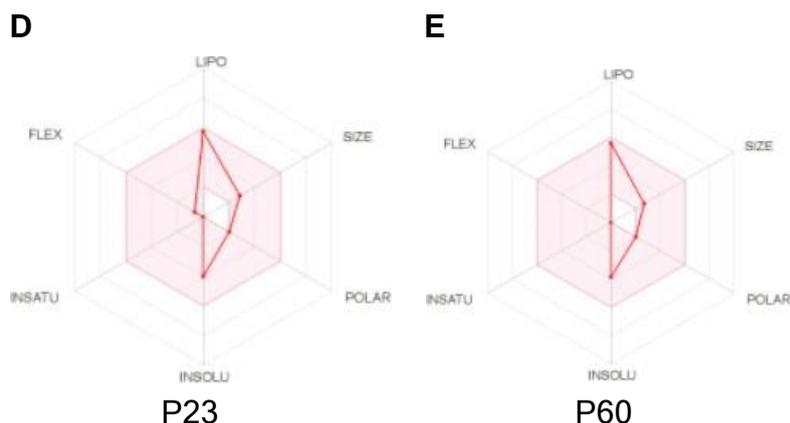


Visualizamos no radar da Figura 33 que todos os análogos do P estão dentro do espectro mas a linha vermelha permanece muito distante das bordas do radar na maioria das propriedades. Assemelha-se aos análogos da L (Figura 31) e F (Figura 32) apenas ao apresentar a lipofilicidade quase que alinhadas ao radar e diverge ao não apresentar insaturação de modo expressivo.

Com base nos radares da L (Figura 31A-E) e F (Figura 32A-E) os análogos que possuem as melhores energias de interação devem possuir insaturações, o radar do piroproxifeno (PPX) (Figura 29) reafirma ao também apresentar insaturações expressivas.

Figura 33: Radar de biodisponibilidade dos análogos da Proximadiol (P).





Na Tabela 4 a análise das propriedades ADMET mostram que todos os compostos seguiram a regra de Lipinski. Os compostos possuem uma boa acessibilidade sintética. Apenas a L46 apresenta baixa absorção gastrointestinal (absorção GI). PPX, L122, F167 e todos os análogos ao P permeiam a barreira hematoencefálica. Ocorre uma variação quanto a solubilidade em água, sendo a maioria dos compostos pouco solúvel seguido de moderadamente solúvel, apenas os análogos do P possuem compostos totalmente solúveis (P67, P74 e P60). Observa-se que a solubilidade é um fator crucial na afinidade dos ligantes na PCE-2 onde a pouca ou moderada solubilidade demonstra boas energias de interações quando comparado aos totalmente solúveis que demonstram uma menor energia de interação (Tabela 3-4). Para os compostos que não possuem total solubilidade pode-se fazer a utilização de carreadores. É necessário estudos para avaliação da quantificação da absorção GI e da barreira hematoencefálica e até mesmo modificações moleculares tendo em vista que larvicidas são colocados em depósitos de água nos quais são utilizados no consumo humano.

Tabela 4: Propriedades ADMET das moléculas análogas a L, F e P.

	<b>Absorção GI</b>	<b>Permeação BBB</b>	<b>Acessibilidade de sintética</b>	<b>Solubilidade em água</b>
<b>PPX</b>	Alto	Sim	3,30	Moderadamente solúvel
<b>L51</b>	Alto	Não	3,84	Moderadamente solúvel

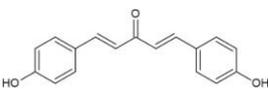
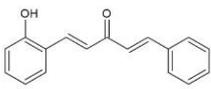
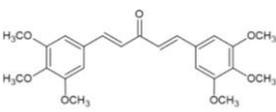
<b>L46</b>	Baixo	Não	3,00	Pouco solúvel
<b>L122</b>	Alto	Sim	3,35	Pouco solúvel
<b>L158</b>	Alto	Não	3,90	Pouco solúvel
<b>L26</b>	Alto	Não	3,39	Pouco solúvel
<hr/>				
<b>F151</b>	Alto	Não	3,50	Pouco solúvel
<b>F12</b>	Alto	Não	3,74	Moderadamente solúvel
<b>F167</b>	Alto	Sim	4,00	Moderadamente solúvel
<b>F45</b>	Alto	Não	3,49	Pouco solúvel
<b>F70</b>	Alto	Não	3,64	Pouco solúvel
<hr/>				
<b>P37</b>	Alto	Sim	3,23	Moderadamente Solúvel
<b>P67</b>	Alto	Sim	2,98	Solúvel
<b>P74</b>	Alto	Sim	3,44	Solúvel
<b>P23</b>	Alto	Sim	3,23	Moderadamente Solúvel
<b>P60</b>	Alto	Sim	2,98	Solúvel
<hr/>				

## 5.8 VALIDAÇÃO DO ALGORITMO DE ENCAIXE

O sucesso do *docking molecular* depende da qualidade da função de pontuação de encaixe, entre outros fatores. Uma função de pontuação imperfeita pode enganar ao prever geometrias de ligantes incorretas ou ao selecionar moléculas não-ligantes sobre ligantes verdadeiros. Esses acertos falso-positivos podem ser considerados iscas/ decoys. Para avaliar a eficiência do algoritmo de encaixe utilizamos 8 moléculas ativas (Tabela 5) nas quais apresentaram atividade *in vitro* frente a PCE-2 do *A. aegypti*, a partir destas 8 moléculas (compostos ativos) foram geradas 80 inativos (falsos positivos) para validação do modelo.

O IC<sub>50</sub> das 8 moléculas (Tabela 5) que demonstraram atividade *in vitro* (compostos ativos) na PCE-2 apresentadas no estudo de Anstrom et al., (2012) com IC<sub>50</sub> de 2.38, 2.02, 0.65 uM, Kim; Wessely; Lan, (2005) 0.059 ± 0.021, 0.042 ± 0.008, 0.065 ± 0.001 µM e Da silva et al., (2015) 5.0 e 0.6 µM, todos se mostraram potentes inibidores.

Tabela 5: Moléculas ativas com atividade *in vitro* na PCE-2.

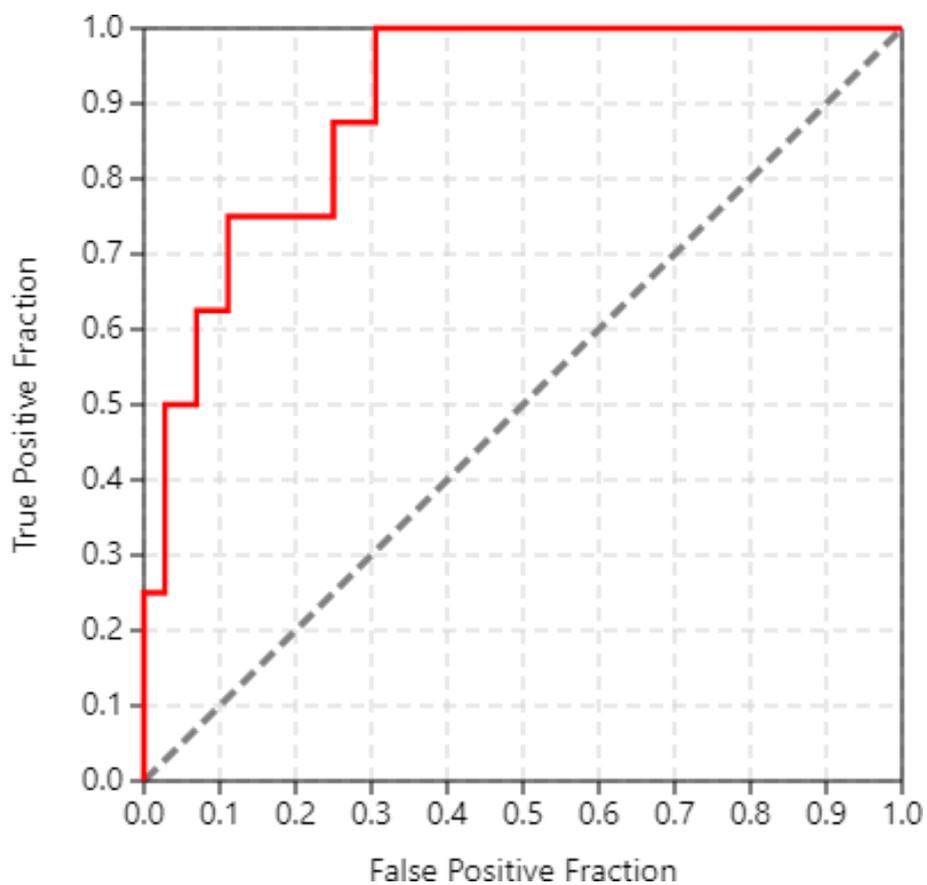
Molécula	Nomenclatura e Referência	IC <sub>50</sub>
	(1E,4E)-1,5-bis(4-hidroxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (Anstrom et al., 2012)	2.38 µM
	1-(2-Hidroxifenil)-5-fenil-1,4-pentadien-3-ona (Anstrom et al., 2012)	2.02 µM
	1,5-Bis-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona (Anstrom et al., 2012)	0.65 µM

	<p>8-Cloro-2-(3-metoxifenil)-4,4-dimetil- 4,5-di-hidroisotiazol[5,4-c]quinolonia- 1(2h)-tione</p>	<p>0.059 ± 0.021 μM</p>
<p>(Kim; Wessely; Lan, 2005)</p>	<hr/>	
	<p>3-bromo-N-{2-[(4-cloro-2- nitrofenil)amino]etil}-4- etoxibenzamida</p>	<p>0.042 ± 0.008 μM</p>
<p>(Kim; Wessely; Lan, 2005)</p>	<hr/>	
	<p>4,4,8-trimetil-5-(3-metilbutanoil)-4,5- di-hidro-1H-[1,2]ditiolo[3,4- c]quinolonia-1-tione</p>	<p>0.065 ± 0.001 μM</p>
<p>(Kim; Wessely; Lan, 2005)</p>	<hr/>	
	<p>1-(p - Hidroxi-benzilideno)tiossemicar bazida</p>	<p>5.0 μM</p>
<p>(Da silva et al., 2015)</p>	<hr/>	
	<p>2-(4-Metoxifenoxi) acetaldéido tiossemicarbazona</p>	<p>0.6 μM</p>
<p>(Da silva et al., 2015)</p>	<hr/>	

Entende-se que a área sob a curva ROC (Curva Característica de Operação do Receptor) é uma representação gráfica que demonstra o desempenho de um sistema classificador binário (falsos positivos e falsos negativos) à medida que o seu limiar de discriminação varia. Um classificador perfeito tem uma taxa de falsospositivos igual a zero e a taxa de verdadeiros positivos igual a um. A validação do algoritmo de encaixe demonstrou que a curva ROC possuiu o valor de 0.901,

indicando assim que o *Autodock Vina* apresentou em seus cálculos um bom *ranking* dos compostos ativos (Figura 34).

Figura 34: Curva ROC gerada a partir da análise de compostos ativos (True Positive Fraction) e inativos/ decoys (False Positive Fraction).



## 6. CONCLUSÃO

- Os testes larvicidas *in vitro* com diferentes frações do extrato das folhas de *C. pyramidale* demonstrou que a fração metanólica (ME) e clorofórmica (CL) têm potencial como agentes larvicidas contra *A. aegypti*, corroborando com a triagem virtual realizada anteriormente por nosso grupo de pesquisa, que evidenciaram um biflavonóide previamente isolado da fração CL (loniflavona) como potencial ligante inibidor da PCE-2.
- Outros biflavonóides presentes nos extratos de CL e ME também foram investigados por cálculos de *docking molecular*, dos quais a loniflavona continua sendo o principal metabólito capaz de inibir a PCE-2.
- Análogos da loniflavona (L) e fargesina (F) apresentaram-se sendo inibidores potenciais com ótimas energias de interação e boa localização no sítio ativo da PCE-2.
- As insaturações e a baixa solubilidade em água mostraram-se importantes em todos os compostos analisados no estudo.
- A curva ROC mostrou que o *Autodock Vina* obteve excelente função de pontuação.

## REFERÊNCIAS

- ABAGYAN, R.; TOTROV, M. High-throughput docking for lead generation. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 5, n. 4, p. 375–382, 2001.
- ACHEE, N. L.; GRIECO, J. P.; VATANDOOST, H.; SEIXAS, G.; PINTO, J.; CHING, N.G. L.; MARTINS, A. J.; JUNTARAJUMNONG, W.; CORBEL, V.; GOUAGNA, C.; DAVID, J. P.; LOGAN, J. G.; ORSBORNE, J.; MAROIS, E.; DEVINE, G. J.; VONTAS, J. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 13, n. 1, 2019.
- AHMED, T.; LIAQAT, I.; HYDER, M. Z.; AKHTAR, S.; BHATTI, A. H.; BUTT, S. B.; ABBAS, S. Elucidation of larvicidal potential of metallic and environment friendly food-grade nanostructures against *Aedes albopictus*. **Environmental Geochemistry and Health**. 43, 1903-1925, 2021.
- ALDER, B.J.; WAINWRIGHT, T.E. Studies in Molecular Dynamics. I. General Method. **Journal of Chemical Physics**. V.31, p. 459-466, 1959.
- AMARAL, A. T.; MONTANARI, C. A. Química medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. **Química Nova**. v. 25, p. 39-44, 2002.
- ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FACCIÓN, M.; FARIA, T. J., Da Química Medicinal à Química Combinatória e Modelagem Molecular: **Um Curso Prático**. São Paulo: Manole, 2012.
- ANDRADE, A.W.L.; MACHADO, K.C.; MACHADO, K.C.; FIGUEIREDO, D.R.D.; DAVID, J.M.; ISLAM, M.T.; UDDIN, S.J.; JAMIL, A.; COSTA, S.P. *In vitro* antioxidant properties of the biflavonoid agathisflavone. **Chemistry Central Journal**. V. 12, p. 75-29, 2018.
- ANSTROM, D. M.; ZHOU, X.; KALK, N. C.; SONG, B.; LAN, Q. Mosquitocidal Properties of Natural Product Compounds Isolated From Chinese Herbs and Synthetic Analogs of Curcumin. **Journal of Medical Entomology**. v. 49, n.2, p. 350-355, 2012.
- ARAÚJO, H.; CARVALHO, D. O.; IOSHINO, R. S.; COSTA-DA-SILVA, A. L.; CAPURRO, M. L. *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. **Insects**. v. 6, n. 2, p. 576-594, 2015.

- ARYA, A.; CHAHAL, R.; RAO, R.; RAHMAN, M. H.; KAUSHIK, D.; AKHTAR, M. F.; SALEEM, A.; KHALIFA, S. M. A.; EL-SEEDI, H. R.; KAMEL, M.; ALBADRANI, G. M.; ABDEL-DAIM, M. M.; MITTAL, V. Acetylcholinesterase Inhibitory Potential of Various Sesquiterpene Analogues for Alzheimer's Disease Therapy. **Biomolecules**. v. 11,n.3, 2021.
- BAHIA, M.V.; SANTOS, J.B.; DAVID, J.P.; DAVID, J.D. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.16, p. 402-1405, 2005.
- BAHIA, M.V.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Occurrence of biflavones in leaves of *Caesalpinia pyramidalis* specimens. **Química Nova**. v. 33, p.1297-1300, 2010.
- BALCI, A.; BADEM, E. A.; YILMAZ A. E.; DEVRIM-LANPIR, A.; AKINOĞLU, B.; KOCAHAN, T.; HASANOĞLU, A.; HILL, L.; ROSEMAN, T.; KNECHTLE, B. Current Predictive Resting Metabolic Rate Equations Are Not Sufficient to Determine Proper Resting Energy Expenditure in Olympic Young Adult National Team Athletes. **Frontiers in Physiology**. v.4, n.12, 2021.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. Artmed Editora. 2014.
- BINDER, K.; HORBACH, J.; KOB, W.; PAUL, W.; VARNIK, F. Molecular dynamics simulations. **Journal of Physics: Condensed Matter**. v. 16, n. 5, 2004.
- BLITZER, E. J.; VYAZUNOVA, I.; LAN, Q. Functional analysis of AeSCP-2 using gene expression knockdown in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**. v. 14, n. 3, p. 301-307, 2005.
- BORTOLUCCI, W. C.; MARKO-DE-OLIVEIRA, H. L.; ROQUE-OLIVA, L.; GONÇALVES, J. E.; PIAU-JÚNIOR, R.; MARIANO-FERNANDEZ, C. M.; BARROS-COLAUTO, N.; GIANI-ANDREA, L.; ZILDA-CRISTIANI, GAZIM. Crude extract of the tropical tree *Gallesia integrifolia* (Phytolaccaceae) for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Revista de Biología Tropical**. v. 69, n. 1, 2020.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 16, n. 4, 2007.
- BRINDISI, M.; BROGI, S.; RELITTI, N.; VALLONE, A.; BUTINI, S.; GEMMA, S.; NOVELLINO, E.; COLOTTI, G.; ANGIULLI, G.; DI CHIARO, F.; FIORILLO, A.; ILARI, A.; CAMPANI, G. Structure-based discovery of the first non-covalent inhibitors of *Leishmania major* trypanothione peroxidase by high throughput docking. **Scientific Reports**. v. 5, n. 1, p. 9705, 2015.

BRITO, S. M. O.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA, A.T.P.; CORONEL, C.; BARBOSA, A.G. R. VEGA, C.; FIGUEIREDO, F. G.; TINTINO, S. R.; LIMA, L. F.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; MENEZES, I. R. A. Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. using HPLC-DAD. **Food Chemistry**. v. 186, p. 185-191, 2015.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**. v. 32, p. 335-73. 2003.

BUSATO, M. A.; CORRALO, V. S.; GUARDA, C.; ZULIAN, V.; LUTINSKI, J. Á.; BORDIN, S. M. S. Evolução da infestação por *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) nos municípios do oeste do estado de Santa Catarina. **Revista de Saúde Pública**. v. 7, n. 9, p. 107-18, 2014.

CARVALHO, F. D.; MOREIRA, L. A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species?. **Neotropical Entomology**. v. 46, n. 3, p. 243-255, 2017.

CAVALCANTI, L. P. G.; PONTES, R. J. S.; REGAZZI, A. C. F.; JÚNIOR, F. J. P.; FRUTUOSO, R. L.; SOUSA, E. P.; DANTAS, F. F. F.; LIMA, J. W. O. Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório. **Revista de Saúde Pública**. v. 41, n. 4, p. 638-644, 2007.

COHEN, N. C.; BLANEY, J. M.; HUMBLET, C.; GUND, P.; BARRY, D. C. Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 33, n. 3, 1990.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, L. R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Fiocruz, Rio de Janeiro. p, 228, 1994.

COSCONATI, S.; FORLI, S.; PERRYMAN, A. L.; HARRIS, R.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. Virtual screening with AutoDock: theory and practice. **Expert Opinion on Drug Discovery**.v. 5, n. 6, p. 597-607, 2010.

COULERIE, P.; EYDOUX, C.; HNAWIA, E.; STUHL, L.; MACIUK, A.; LÉBOUVIER, N.; CANARD, B.; FIGADÈRE, B.; GUILLEMOT, J. C.; NOUR. M. Biflavonoids of

*Dacrydium balansae* with potent inhibitory activity on dengue 2 NS5 polymerase.

**Planta Médica.** v. 78, n.7, p. 672-7, 2012.

D'AGOSTINO, D.; CLEMATIS, A.; QUARATI, A.; CESINI, D.; CHIAPPORI, F.; MILANESI, L.; MERELLI, I. Cloud Infrastructures for *In Silico* Drug Discovery: Economic and Practical Aspects. **BioMed Research International.**2013.

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

DALPADADO, R.; GUNATHILAKA, N. G.; AMARASINGHE, D.; UDAYANAGA, L. A challenge for a unique dengue vector control programme: assessment of the spatial variation of insecticide resistance status amongst *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* populations in gampaha district, Sri Lanka. **BioMed Research International.** v. 2021, p. 1-8, 2021.

DAS, S.; SARMAH, S.; LYNDEN, S.; ROY, A. S. An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.** p. 1-11, 2020.

DAVIS, E. M.; CROTEAU, R. Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes. **Biosynthesis.** p. 53-95, 2000.

DA SILVA, J.B.P.; NAVARRO, D.M.D.A.F.; DA SILVA, A. G.; SANTOS, G. K. N.; DUTRA, K. A.; MOREIRA, D. R.; RAMOS, M. N.; ESPÍNDOLA, J. P. W.; DE OLIVEIRA, A. D. T.; BRONDANI, D.J.; LEITE, A. C. L.; HERNANDES, M. Z.; PEREIRA, V. R. A.; DA ROCHA, L. F.; DE CASTRO, M. C. A. B.; DE OLIVEIRA, B. C.; LAN, Q.; MERZ JR, K. M. Thiosemicarbazones as *Aedes aegypti* Larvicidal, **European Journal of Medicinal Chemistry.** 2015.

DE LIMA ALBUQUERQUE, B. N.; DA SILVA, M. F. R.; DA SILVA, P. C. B.; PIMENTEL, C. S. D. L.; DA ROCHA, S. K. L.; DE OLIVEIRA FARIAS, J. C. R.; NAVARRO, D. M. D. A. F. Oviposition deterrence, larvicidal activity and docking of  $\beta$ -germacrene-D-4-ol obtained from leaves of *Piper corcovadensis* (Piperaceae) against *Aedes aegypti*. **Industrial Crops and Products.** v. 182, 2022.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. Arboviruses emerging in

Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**. v. 51, 2017.

DOMINGUES, B. F. **3D-Pharma: Uma Ferramenta para Triagem Virtual Baseada em Fingerprints de Farmacoforos**. 2013. 119 f. Tese. Doutorado em Bioinformática. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.

DREASSI, E.; ZIZZARI, A. T.; FALCHI, F.; SCHENONE, S.; SANTUCCI, A.; MAGA, G.; BOTTA, M. Determination of permeability and lipophilicity of pyrazolo-pyrimidine tyrosine kinase inhibitors and correlation with biological data. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 44, n. 9, p. 3712- 3717, 2009.

DURAZZO, A.; ZACCARIA, M.; POLITO, A.; MAIANI, G.; CARCEA, M. Lignan content in cereals, buckwheat and derived foods. **Foods**. v. 2, p. 53-63, 2013.

DURAZZO, A. Lignans. **In Phenolic Compounds in Food: Characterization and Analysis (Food Analysis and Properties)**. LEO, M.L.N.; JANET, A.G.U.; Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2018; Chapter 11.

DYER, D. H.; LOVELL, S.; THODEN, J. B.; HOLDEN, H. M.; RAYMENT, I.; LAN, Q. The structural determination of an insect sterol carrier protein-2 with a ligand-bound C16 fatty acid at 1.35-Å resolution. **Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 40, p. 39085-39091, 2003.

DYER, D.; WESSELY, V.; KATRINA, F. T.; LAN, Q. Three-dimensional structure/function analysis of SCP-2-like2 reveals differences among SCP-2 family members. **Journal of Lipid Research**. v. 49, n. 3, p. 644-653, 2008.

FAULL, K. J.; WILLIAMS, C. R. Intraspecific variation in desiccation survival time of *Aedes aegypti* (L.) mosquito eggs of Australian origin. **Journal of Vector Ecology**. v. 40, n. 2, p. 292-300, 2015.

FARNESI, L.C.; MARTINS, A.J.; VALLE, D.; REZENDE, G.L. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.104, n.1, p.124-126, 2009.

FERNANDES, A. W.; AQUINO, S. Á. M. C.; GOUVEIA, G. V.; ALMEIDA, J. R. G. S.; COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos de plantas do bioma caatinga em isolados de *Escherichia coli* de suínos. **Revista Brasileira de Plantas**

**Medicinais**. v. 17, n. 4, p. 1097-1102, 2015.

FERNANDES, D. A.; BARROS, R. P. C.; TELES, Y. C. F.; OLIVEIRA, L. H. G.; LIMA, J. B. L.; SCOTTI, M. T.; NUNES, F. C.; CONCEIÇÃO, A. S.; SOUZA, M. F. V. Larvicidal Compounds Extracted from *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) Evaluated against *Aedes aegypti* L. **Molecules**. v. 24, n. 12, 2019.

FERNANDES, M. F.; QUEIROZ, L. P. Vegetação e flora da Caatinga. **Ciência e Cultura**. v. 70, n. 4, p. 51-56, 2018.

FINE, P. V. A.; MARTIN, R. E.; METZ, M. R.; MISIEWICZ, T. M.; ASNER, G. P. Exploring the links between secondary metabolites and leaf spectral reflectance in a diverse genus of Amazonian trees. **Ecosphere**. v. 12, n. 2, 2021.

FONSECA, E. O.; MACORIS, M. L. G.; SANTOS, R. F.; MORATO, D. G.; SANTA, M. D. S.; CERQUEIRA, I. N. A.; MONTE-ALEGRE, A. F. Estudo experimental sobre a ação de larvicidas em populações de *Aedes aegypti* do município de Itabuna, Bahia, em condições simuladas de campo. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 28, n. 1, 2019.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia**. São Paulo. v. 2, 1996.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica**. São Paulo, p. 860, 2002.

FRANÇA, L. P.; AMARAL, A. C. F.; RAMOS, A. S.; FERREIRA, J. L. P.; MARIA, A. C. B.; OLIVEIRA, K. M. T.; JR, A. S. E.; DALVANA, R. A.; SILVA, J. N.; SILVA, N. G.; BARROS, G. D. A.; CHAVES, F. C. M.; TADEI, W. P.; SILVA, J. R. A. *Piper capitarianum* essential oil: a promising insecticidal agent for the management of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 28, n. 8, p. 9760-9776, 2020.

**Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)**. 2022. Brasil tem alta de casos de dengue, zika e chikungunya. Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://informe.enasp.fiocruz.br/noticias/53045>>. Acesso em: 28/07/2022.

GALLEGOS, A. M.; ATSHAVES, B. P.; STOREY, S. M.; STARODUB, Ó.; PETRESCU, A. D.; HUANG, H.; MCINTOSH, A. L.; MARTIN, G. G.; CHAO, H.; KIER, A. B.; SCHROEDER, F. Gene structure, intracellular localization, and

functional roles of sterol carrier protein-2. **Progress in lipid research**. v. 40, n. 6, p. 498-563, 2001.

GELDENHUYS, W. J.; GAASCH, K. E.; WATSON, M.; ALLEN, D. D.; VAN DER SCHYF, C. J. Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. **Drug Discovery Today**. v. 11, p. 127-132, 2006.

GETACHEW, D.; TEKIE, H.; GEBRE-MICHAEL, T.; BALKEW, M.; MESFIN, A. Breeding sites of *Aedes aegypti*: potential dengue vectors in dire dawa, east ethiopia. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**. v. 2015, p. 1-8, 2015.

GILSON, L. L.; MAYNARD, M. T.; JONES YOUNG, N. C.; VARTIAINEN, M.; HAKONEN, M. Virtual teams research: 10 years, 10 themes, and 10 opportunities. **Journal of management**. v. 41, n. 5, p.1313-1337, 2015.

GOGA, N.; MAYRHOFER, L.; TRANCA, L.; NEDEA, S.; HEIJMANS, K.; VEERAPANDIAN, P.; VASILATEANU, A. A review of recent developments in molecular dynamics simulations of the photoelectrochemical water splitting process. **Catalysts**. v. 11, n. 7, p. 807, 2021.

GOULD, E.; PETTERSSON, J.; HIGGS, S.; CHARREL, R.; LAMBALLERIE, X. Emerging arboviruses: Why today?. **One Health**. v. 4, p. 1-13, 2017.

HAMID, P. H.; NINDITYA, V. I.; PRASTOWO, J.; HARYANTO, A.; TAUBERT, A.; HERMOSILLA, C. Current status of *Aedes aegypti* insecticide resistance development from Banjarmasin, Kalimantan, Indonesia. **BioMed Research Internationa**. v. 2018, p. 1-7, 2018.

HAN, W. W. et al. Efficacy and community effectiveness of larvivorous fish for dengue vector control. **Tropical Medicine & International Health**. v. 20, n. 9, p. 1239-1256, 2015.

HE, X.; YANG, F.; HUANG, X. Proceedings of Chemistry, Pharmacology, Pharmacokinetics and Synthesis of Biflavonoids. **Molecules**. v. 26, n. 19, 2021.

**Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)**. 2002. Mapa de clima do Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em:

<[https://geofpt.ibge.gov.br/informacoes\\_ambientais/climatologia/mapas/brasil/Map\\_BR\\_clima\\_2002.pdf](https://geofpt.ibge.gov.br/informacoes_ambientais/climatologia/mapas/brasil/Map_BR_clima_2002.pdf)>. Acesso em: 08/ 09/ 2021.

KAMOLSUKYEUNYONG, W.; SUKHAKET, W.; PITIJA. K.; THORNGKHAM, P.; MAHATHEERANONT, S.; TOOJINDA, T.; VANAVICHIT. A. Rice Sesquiterpene Plays Important Roles in Antixenosis against Brown Planthopper in Rice. **The Plant Journal**. v. 10, n.6, p.10-49, 2021.

KHANNA, I. Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. **Drug Discovery Today**. v. 17, n. 19-20, p. 1088-1102, 2012.

KEMMISH, H.; FASNACHT, M.; YAN, L. Fully automated antibody structure prediction using BIOVIA tools: Validation study. **PLoS One**. 2017 v. 18, n. 12, 2017.

KIM, M. S.; WESSELY, V.; LAN, Q. Identification of mosquito sterol carrier protein-2 inhibitors. **Journal of Lipid Research**. 2005 v. 46, n. 4, 2005.

KIM, S.; CHEN, J.; CHENG, T.; GINDULYTE, A.; HE, J.; HE, S.; LI, Q.; SHOEMAKER, B.A.; THIESSEN, P. A.; YU, B.; ZASLAVSKY, L.; ZHANG, J.; BOLTON, E. E. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. **Nucleic Acids Research**. 2021.

KITCHEN D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual Screening for drug discovery: Methods and applications. **Nature Reviews**. v.3, p. 9- 35, 2004.

KONTOYIANNI, M.; MCCLELLAN, L. M.; SOKOL, G. S. Evaluation of Docking Performance: Comparative Data on Docking Algorithms. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 47, n. 3, p. 558-565, 2004.

KREBS, K. C.; LAN, Q. Isolation and expression of a sterol carrier protein-2 gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**. v. 12, n. 1, p. 51-60, 2003.

KUMAR, D.; MEENA, M. K.; KUMAR, V.; SINGH, P.; BAHADUR, I. Impact of Temperature on Structural Changes in nsp2 and nsp3 of CHIKV: Molecular Dynamics Simulations. **Research Square**. p. 1-9, 2022

KUMAR, R. B.; SHANMUGAPRIYA, B.; THIYAGESAN, K.; KUMAR, S. R.; SURESH, M. X. A search for mosquito larvicidal compounds by blocking the sterol carrying protein, AeSCP-2, through computational screening and docking strategies.

**Pharmacognosy Research**. v. 2, n. 4, p. 247-253, 2010.

LARSON, R. T.; WESSELY, V.; JIANG, Z.; LAN, Q. Larvicidal activity of sterol carrier protein-2 inhibitor in four species of mosquitoes. **Journal of medical entomology**. v. 45, n. 3, p. 439-44, 2008.

LEE, I. S.; PARK, S. H.; RHEE, I. J. Molecular-based sensitivity of human leukemia cell line U937 to antineoplastic activity in a traditional medicinal plants (*Selaginella tamariscina*). **Journal of Food Hygiene and Safety**. v. 11, n.1, p. 71-75, 1996.

LEWIS, N. G.; DAVIN, L. B. Lignans: biosynthesis and function. **Comprehensive natural products chemistry**, v. 1, p. 639-712, 1999.

LI, H.; SZE, K. H.; LU, G.; BALLESTER, P. J. Machine-learning scoring functions for structure-based virtual screening. **WIREs Computational Molecular Science**. v. 11, n. 1, 2021.

LIMA, A. R.; SILVA, J.; BEZERRA, L. L.; MARINHO, M.; MARINHO, E. S. Molecular docking of potential curcuminoids inhibitors of the NS1 protein of dengue virus. **International Journal of Scientific & Engineering Research**. v. 8, n. 4, 2017.

LIMA, S. Y. E. M. D.; SILVA, A. R. N. D.; LEAL, C. E. Y.; FILHO, E. B. D. A. Virtual Screening of Fargesin Analogs as Candidates as Inhibitors of *Aedes aegypti* Sterol Carrier Protein. **Pharmacological Research**. v. 14, n.1, p. 8-12, 2021.

DE JESUS, R. B. L.; QUEIROZ, J. M.; BARBOSA, T. S.; COÊLHO, F. A. S.; COÊLHO, M. D. G. Uso de solução saturada de NaCl no controle de imaturos de *Aedes aegypti*. **Revista de Ciência da Saúde**. v. 6, n. 2, p. 7-11, 2021.

LEITE, J.P.V. **Química dos produtos naturais: Uma abordagem Biossintética**. In: Leite, J.P.V. Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

MAIA G.N. **Caatinga, árvores e arbustos e suas utilidades**. D & Z Computação Gráfica e Editora, São Paulo, 2004.

MAIA, J. M.; SOUSA, V. F. O.; LIRA, E. H. A.; LUCENA, A. M. A. Motivações socioeconômicas para a conservação e exploração sustentável do bioma Caatinga. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**. v. 41, 2017.

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**. 2020.

MEEK, P. J.; ZAUHAR, R. J.; LIU, Z. W.; TIAN, L. F.; WANG, C. Y.; WELSH, W. J. Shape Signatures: speeding up computer aided drug discovery. **Drug Discovery Today**. v. 11, n. 19-20, p. 895-904, 2006.

MENDES, C. C.; BAHIA, M. V.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. **Fitoterapia**. v.71, p. 205-207, 2000.

MIGNANI, S.; RODRIGUES, J.; TOMAS, H.; JALAL, R.; SINGH, P. P.; MAJORAL, J. P.; VISHWAKARMA, R. A. Present drug-likeness filters in medicinal chemistry during the hit and lead optimization process: how far can they be simplified?. **Drug discovery today**. v. 23, n. 3, p. 605-615, 2018.

MILDER, I.E.; ARTS, I.C.; VAN DE PUTTE, B.; VENEMA, D.P.; HOLLMAN, P.C. Lignan contents of Dutch plant foods: A database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. **British Journal of Nutrition**. v. 93, p. 393-402, 2005.

MORO, M. F.; LUGHADHA, E. N.; ARAÚJO, F. S.; MARTINS, F. R. A Phytogeographical metaanalysis of the semiarid caatinga domain in Brazil. **The Botanical Review**. v. 82, n. 2, p. 91-148, 2016.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Docking Molecular. **Human press**. p. 365-382, 2008.

MORRISON, A. C.; ZIELINSKI-GUTIERREZ, E.; SCOTT, T. W.; ROSENBERG, R. Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. **PLoS Medicine**. v. 5, n. 3, p.68, 2008.

MOURÃO, E. D. S.; CARVALHO, T. G. C.; LIMA, S. Y. E. M.; FILHO, E. B. A. Identification of molecular scaffolds from Caatinga Brazilian biome with potential against *Aedes aegypti* by molecular docking and molecular dynamics simulations.

**Journal of Molecular Structure.** 2021.

MYSINGER, M. M.; CARCHIA, M.; IRWIN, J. J.; SHOICHET B. K. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking.

**Journal of Medicinal Chemistry.** 2012.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química.** v. 33, n. 4, p. 13-24, 2008.

NIMER, E. Climatologia da Região Nordeste do Brasil: introdução à climatologia dinâmica. **Revista Brasileira de Geografia.** v. 34, p. 3-51, 1972.

NUNES, F. C.; LEITE, J. A.; OLIVEIRA, L. H. G.; SOUSA, P. A. P. S.; MENEZES, M. C.; MORAES, J. P. S.; MASCARENHAS, S. R.; BRAGA, V. A. The larvicidal activity of *Agave sisalana* against L4 larvae of *Aedes aegypti* is mediated by internal necrosis and inhibition of nitric oxide production. **Parasitology Research.** v. 114, n. 2, p. 543-549, 2015.

O'CONNOR, L.; PLICHART, C.; SANG, A. C.; BRELSFOARD, C. L.; BOSSIN, H. C.; DOBSON, S. L. Open release of male mosquitoes infected with a *Wolbachia* biopesticide: field performance and infection containment. **PLoS Neglected Tropical Diseases.** v. 6, n. 11, 2012.

OOMS, F. Molecular modeling and computer aided drug design examples of their applications in medicinal chemistry. **Current Medicinal Chemistry.** v. 7, n. 2, p. 141-158, 2000.

OLIVEIRA, R. L. Biologia e comportamento do Vetor. In: VALLE, D. **Dengue Teorias e práticas.** p. 317-338. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. 2015.

PAES DE ANDRADE, P.; ARAGÃO, F. J. L.; COLLI, W.; DELLAGOSTIN, O. A.; FINARDI-FILHO, F.; HIRATA, M. H.; LIRA-NETO, A. C.; MELO, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; NÓBREGA, F. G.; SOUSA, G. D.; VALICENTE, F. H.; ZANETTINI, M. H. B. Use of transgenic *Aedes aegypti* in Brazil: risk perception and assessment. **Bulletin of the World Health Organization.** v. 94, n. 10, p. 766-771, 1 out. 2016.

PAVELA, R.; MAGGI, F.; IANNARELLI, R.; BENELLI, G. Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. **Acta tropica**. v. 193, p. 236-271, 2019.

PERERA, H.; WIJERATHNA, T. Sterol Carrier protein inhibition-based control of mosquito vectors: current knowledge and future perspectives. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**. p. 1-6, 2019.

PINHEIRO, F. M.; NAIR, P. K. R. Silvopasture in the Caatinga biome of Brazil: A review of its ecology, management, and development opportunities. **Forest Systems**. v. 27, n. 1, p. 1-16, 2018.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S. GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**. v. 25, n.13, p. 1605-1612, 2004.

RADEK, J. T.; DYER, D. H.; LAN, Q. Effects of mutations in *Aedes aegypti* sterol carrier protein-2 on the biological function of the protein. **Biochemistry**. v. 49, n. 35, p. 7532-7541, 2010.

RAPAPORT, D. C. **The Art of Molecular Dynamics Simulation**. New York: Cambridge University, 1996.

REY, J. R.; LOUBINOS, P. Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* em América y transmisión enfermedades. **Biomédica**. v. 35, n.2, p. 177-185, 2015.

RICHARDS, L. A.; GLASSMIRE, A. E.; OCHSENIDER, K. M.; SMILANICH, A. M.; DODSON, C. D.; JEFFREY, C. S.; DYER, L. A. Phytochemical diversity and synergistic effects on herbivores. **Phytochemistry Reviews**. v. 15, n. 6, p. 1153-1166, 2016.

RINO, J. P.; STUDART, N. Um potencial de interação para o estudo de materiais e simulações por dinâmica molecular. **Química Nova**. v. 24 ,p. 838-845, 2001.

RODHAIN, F.; ROSEN, L. **Mosquito vetores and dengue virus-vector relationships**. In: GUBLER, D.J.; KUNO, G. Dengue and dengue haemorrhagic fever. New York: CAB International, 1997.

SALVI, F. I.; DA SILVEIRA, N. M.; BUSATO, M. A.; JÚNIOR, W. A. R.; LUTINSKI, J. A. Percepções de agentes de combate a endemias e da população quanto aos fatores que influenciam na proliferação do mosquito *Aedes aegypti*. **Revista Sustinere**. v. 9, n.1, p.125-144, 2021.

SANTOS, A. L. S.; SANTOS, F. P. S.; NASCIMENTO, A. S.; LIMA, L. K. F.; DIAS, L. M. F.; SILVA, G. T. O.; RAI, M.; MENDES FEITOSA, C. Chemical composition, actividad larvicide, insecticide and repellent of essential oil *Aedes aegypti*. **Research, Society and Development**. v. 11, n. 2, 2022.

SCHOLTE, E. J.; NJIRU, B. N.; SMALLEGANGE, R. C.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. J. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Malaria journal**. v. 2, p. 29, 2003.

SENTHIL-NATHAN, S. A review of resistance mechanisms of synthetic insecticides and botanicals, phytochemicals, and essential oils as alternative larvicidal agents against mosquitoes. **Frontiers in Physiology**. v. 10, 2020.

SHI, Z. Z.; MIAO, F.P.; FANG, S.T.; YIN, X.L.; JI, N.Y. Trichobisabolins A-H, eight new bisabolane derivatives from the marine-alga-epiphytic fungus *Trichoderma asperellum* Y6-2. **Phytotherapy**. v. 134,p. 372-377, 2019.

SIERRA, I.; LATORRE-ESTIVALIS, J. M.; TRAVERSO, L.; GONZALEZ, P. V.; APTEKMANN, A.; NADRA, A. D.; MASUH, H.; ONS, S. Transcriptomic analysis and molecular docking reveal genes involved in the response of *Aedes aegypti* larvae to an essential oil extracted from Eucalyptus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 15, n. 7, 2021.

SILVA, R. L.; DEMARQUE, D. P.; DUSI, R. G.; SOUSA, J. P. B.; ALBERNAZ, L. C.; ESPINDOLA, L. S. Residual larvicidal activity of quinones against *Aedes aegypti*. **Molecules**. v. 25, n. 17, 2020.

SOUZA, M. J. M.; THOMAZ, D. V.; KLOPPEL, L. L.; CARNEIRO, L. A.; ROCHA, M. C.; AGUIAR, D. V. A.; VAZ, B. G.; SOUSA, C. M.; SANTOS, P. A. Influence of organo-mineral supplementation on the production of secondary metabolites in in vitro-germinated *Bromelia balansae* Mez. **Research, Society and Development**. v. 10, n. 11, 2021.

SODERO, A. C. R. **Modelagem Molecular de Aspartil Proteases de *Schistosoma mansoni* (SmAPs) para o Desenvolvimento de Potenciais Moléculas**

**Esquistossomicidas**. 2011. 144f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)

- Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2011.

SRINIVASAN, R.; NATARAJAN, D.; SHIVAKUMAR, M. S.;

VINUCHAKKARAVARTHY, T.; VELMURUGAN, D. Bioassay guided isolation of mosquito larvicidal compound from acetone leaf extract of *Elaeagnus indica* Servett Bull and its in-silico study. **Industrial Crops and Products**. v.76, p. 394-401, 2015.

SUZART, L. R.; DANIEL, J. F. S.; CARVALHO, M. G.; KAPLAN, M. A. C.

Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 984-987, 2007

SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Dengue vaccine development: global and Indian scenarios. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 84, p. 80-86, 2019.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia da dengue. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 17, p. 99-102, 2001.

TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. *Aedes aegypti* e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**. v. 9, n. 3, p. 267-276, 2017.

TEPONNO, R.B.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. Recent advances in research on lignans and neolignans. **Natural Product Reports**. v. 33, p. 1044-1092, 2016.

TORRES, S. B.; SANTOS, A. N. A.; BARBOSA, M. V. C.; CABRAL, A. G. S.

Potencial terapêutico das ervas medicinais da caatinga região do nordeste brasileiro. **Archives of Health**. v.2, n.4, p.1301-1304, 2021.

UDAYANGA, L.; RANATHUNGE, T.; MOHAMED, C. M.; ABEYEWICKREME, W.

Predatory efficacy of five locally available copepods on *Aedes* larvae under laboratory settings: An approach towards bio-control of dengue in Sri Lanka. **PLOS ONE**. v. 14, n. 5, 2019.

VALSTA, L.M.; KILKKINEN, A.; MAZUR, W.; NURMI, T.; LAMPI, A.M.;

OVASKAINEN, M.L.; KORHONEN, T.; ADLERCREUTZ, H.; PIETINEN, P. Phyto-oestrogen database of foods and average intake in Finland. **British Journal of Nutrition**.v. 89, p. 31-38, 2003.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**. v. 52, n. 4, p. 609-623, 2003.

VIITANEN, L.; NYLUND, M.; EKLUND, D. M.; ALM, C.; ERIKSSON, A. K.; TUUF, J.; EDQVIST, J. Characterization of SCP-2 from *Euphorbia lagascae* reveals that a single Leu/Met exchange enhances sterol transfer activity. **The FEBS Journal**. v. 273, n. 24, p. 5641-5655. 2006

WALKER, T.; JOHNSON, P. H.; MOREIRA, L. A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; FRENTIU, F. D.; MCMENIMAN, C. J.; LEONG, Y. S.; DONG, Y.; AXFORD, J., KRIESNER, P.; LLOYD, A. L.; RITCHIE, S. A.; O'NEIL, S. L.; HOFFMANN, A. A. The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature**. v. 476, n. 7361, p. 450-453, 2011.

WILDER-SMITH, A.; ENG-EONG, O.; VASUDEVAN, S. G. V.; GUBLER, D. J. Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. **Current Infectious Disease Reports**. v. 12, n. 3, p. 157-164, 2010.

ZARA, A. L. S. A.; SANTOS, S. S.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.

ZHANG, Y.; DENG, T.; SUN, L.; LANDIS, J. B.; MOORE, M. J.; WANG, H.; WANG, Y.; HAO, X.; CHEN, J.; LI, S.; XU, M., PUNO, P. T.; RAVEN, P. H.; SUN, H. Phylogenetic patterns suggest frequent multiple origins of secondary metabolites across the seed-plant 'tree of life'. **National Science Review**. v. 8, n. 4, 2021.