

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

**DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

**FARMÁCIA BACHARELADO**

**LUANA MARILIA SANTOS OLIVEIRA**

**BUSCA POR MOLÉCULAS PROTÓTIPO COM ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE  
AO *Aedes aegypti* Linn**

**SÃO CRISTÓVÃO**

2021

LUANA MARILIA SANTOS OLIVEIRA

**BUSCA POR MOLÉCULAS PROTÓTIPO COM ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE  
AO *Aedes aegypti* Linn**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Sergipe como exigência para obtenção de título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Sócrates Cabral de Holanda Cavalcanti

**SÃO CRISTÓVÃO**

2021

LUANA MARILIA SANTOS OLIVEIRA

**BUSCA POR MOLÉCULAS PROTÓTIPO COM ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE  
AO *Aedes aegypti* Linn**

Área de concentração: Ciências da Saúde/Farmácia

Data da defesa: 06/07/2021

Resultado: \_\_\_\_\_

---

Orientador: Prof.º Dr. º Sócrates Cabral de Holanda Cavalcanti

---

(Examinador) Prof.º Dr. º Josemar Sena Batista

---

(Examinador) Prof.º Dr. º Péricles Barreto Alves

---

(Suplente) Prof.º Dr. º Charles dos Santos Estevam

## RESUMO

Fêmeas adultas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) são vetores de quatro importantes arboviroses com surtos nos últimos anos, dengue, chikungunya, Zika e febre amarela. O controle à proliferação do mosquito é um dos principais meios de contenção das doenças, no entanto, a resistência apresentada por estes vetores aos larvicidas e inseticidas utilizados atualmente tem causando danos a saúde da população e ao meio ambiente. Nesse sentido, a necessidade atual para o manejo integrado de vetores está no desenvolvimento de novas classes de larvicidas que sejam ecologicamente eficazes para utilizações prolongadas. Logo, este trabalho buscou por moléculas protótipo com atividade larvicida frente ao *Ae. aegypti*, através de abordagens convencionais de descoberta de substâncias. Foram utilizadas três séries de moléculas que participam do metabolismo do mosquito: indol, isatina e quitina. Onze compostos foram sintetizados através de reações de nitração, tosilação, acetilação e redução, testados como agentes larvicidas em potencial contra o *Ae. aegypti* em seu 3º estágio larval, seguido de avaliação da toxicidade em náuplios de *Artemia* sp. As reações foram acompanhadas por CCDA, os produtos foram purificados em CC e até o momento oito compostos foram caracterizados, por PF, IV, EM e um por RMN. Somado a isso, os produtos foram testados frente às larvas de *Ae. aegypti* e em *Artemia* sp., foram calculados os valores de CL<sub>50</sub> obtidos nos ensaios. Os testes apontaram que compostos sulfonilados do indol e da isatina sem modificações nos núcleos centrais apresentaram potências larvicidas moderadas variando de 47,5 - 278,5 ppm. Os compostos derivados da isatina foram ativos contra *Ae. aegypti*, no entanto, não foram seletivos para o vetor, sendo tóxicos ao organismo não alvo (*Artemia* sp.). Quanto aos derivados da quitina, como possíveis inibidores da síntese da quitina, são necessários maiores estudos para observar sua plena atividade. As relações entre as mudanças estruturais dos derivados sintetizados e seus resultados de CL<sub>50</sub> fornecem informações úteis para a busca de moléculas protótipo e entendimento da influência de propriedades físico-químicas na ação larvicida e tóxica em organismos não-alvo. Dessa forma, há ainda, a sugestão por novas triagens com moléculas quimicamente diversas aumentando a gama de compostos e suas modificações, bem como, o estudo do seu mecanismo de ação sobre as larvas, para alcançar o desenvolvimento de larvicidas mais seletivos ao organismo.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, indol, isatina, quitina, SAR.

## ABSTRACT

Adult females of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) are vectors of four important arboviruses with outbreaks in recent years, dengue, chikungunya, Zika and yellow fever. Controlling mosquito proliferation is one of the main ways to contain the disease, however, the resistance presented by these vectors to the larvicides and insecticides currently used has caused damage to the health of the population and the environment. In this sense, the current need for the integrated management of vectors lies in the development of new classes of larvicides that are ecologically effective for long-term use. Therefore, this work looked for prototype molecules with larvicidal activity against *Ae. aegypti*, through conventional approaches to substance discovery. Three series of molecules that participate in the mosquito's metabolism were used: indole, isatin and chitin. Eleven compounds were synthesized through nitration, tosylation, acetylation and reduction reactions, tested as potential larvicidal agents against *Ae. aegypti* in its 3rd larval stage, followed by evaluation of toxicity in *Artemia* sp. The reactions were followed by analytical plates, the products were purified in thin layer chromatography and so far eight compounds were characterized, by melting point, infrared spectroscopy, mass spectrometry and one by NMR. Added to this, the products were tested against *Ae. aegypti* and in *Artemia* sp., the LC<sub>50</sub> values obtained in the assays were calculated. The tests showed that sulfonylated compounds of indole and isatin without modifications in the central nuclei presented moderate larvicidal potencies ranging from 47.5 - 278.5 ppm. Isatin-derived compounds were active against *Ae. aegypti*, however, were not selective for the vector, being toxic to the non-target organism (*Artemia* sp.). As for chitin derivatives, as possible inhibitors of chitin synthesis, further studies are needed to observe their full activity. The relationships between the structural changes of synthesized derivatives and their LC<sub>50</sub> results provide useful information for the search for prototype molecules and understanding the influence of physicochemical properties on larvicidal and toxic action in non-target organisms. Thus, there is still a suggestion for new screenings with chemically diverse molecules, increasing the range of compounds and their modifications, as well as the study of their mechanism of action on larvae, to achieve the development of more selective larvicides for the organism.

Key words: *Aedes aegypti*, indole, isatin, chitin, SAR.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Considerações gerais sobre o mosquito <i>Ae. Aegypti</i></b> .....	<b>17</b>
2.1.1 <i>Ciclo de vida do <i>Ae. Aegypti</i></i> .....	17
2.1.1.1 <i>Ovo</i> .....	17
2.1.1.2 <i>Fase aquática (Larva e pupa)</i> .....	18
2.1.1.3 <i>Fase terrestre (Adulto)</i> .....	18
<b>2.2 Um vetor e quatro doenças</b> .....	<b>19</b>
2.2.1 <i>Dengue</i> .....	19
2.2.2 <i>Febre Amarela (FA)</i> .....	20
2.2.3 <i>Chikungunya</i> .....	21
2.2.4 <i>Zika</i> .....	21
<b>2.3 Contexto do controle de larvas do <i>Ae. aegypti</i></b> .....	<b>22</b>
<b>2.4 Mecanismos de resistência</b> .....	<b>25</b>
<b>2.5 Relação entre a fisiologia do <i>Ae. aegypti</i> e a busca por novos protótipos</b> .....	<b>28</b>
<b>2.6 Protótipos larvicidas/inseticidas frente ao <i>Ae. aegypti</i> e outros insetos</b> .....	<b>32</b>
<b>2.7 Derivados do indol, isatina e da quitina como potenciais agentes larvicidas</b> ...38	
<b>2.8 Química do indol, isatina, quitina e seus derivados sulfonilados e acetilados</b> ..42	
2.8.1 <i>Indol</i> .....	43
2.8.2 <i>Isatina</i> .....	48
2.8.3 <i>Derivados da quitina</i> .....	53
<b>2.9 Toxicidade aguda em organismos não-alvo</b> .....	<b>55</b>
<b>2.10 Cálculo de concentração letal média (<math>CL_{50}</math>)</b> .....	<b>56</b>
<b>2.11 Relação Estrutura-Atividade (REA)</b> .....	<b>57</b>
<b>2.12 Caracterizações físico-químicas</b> .....	<b>60</b>
2.12.1 <i>Espectrometria de massas (EM)</i> .....	60

2.12.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	61
2.12.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	62
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>65</b>
<b>3.1 Geral.....</b>	<b>65</b>
<b>3.2 Específicos.....</b>	<b>65</b>
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>66</b>
<b>4.1 Procedimento experimental.....</b>	<b>66</b>
4.1.1 Síntese do 2-Nitro-1H-indol: <b>1a</b> .....	66
4.1.2 Síntese do 2-Nitro-1-(Tosil)-1H-indol: <b>1b</b> .....	67
4.1.3 Síntese do 2,3 Dihidro-1H-indol: <b>1c</b> .....	68
4.1.4 Síntese de 2,3 Dihidro-1-[(4-metilfenil)sulfonyl]-1H-indol: <b>1d</b> .....	69
4.1.5 Síntese de 1-Tosil-1H-indol-2,3-diona: <b>2a</b> .....	70
4.1.6 Síntese de N-acetilisatina: <b>2b</b> .....	71
4.1.7 Síntese de diol derivados ( <b>2c – 2e</b> ).....	72
4.1.8 Síntese de derivados da N-acetilglicosamina ( <b>3a e 4a</b> ).....	73
<b>4.2 Métodos cromatográficos.....</b>	<b>74</b>
<b>4.3 Método de recristalização.....</b>	<b>75</b>
<b>4.4 Determinação da atividade larvicida.....</b>	<b>75</b>
<b>4.5 Ensaio ecotoxicológico com Artemia sp.....</b>	<b>77</b>
<b>4.6 Análise estatística.....</b>	<b>77</b>
<b>4.7 Métodos de caracterização.....</b>	<b>78</b>
<b>4.8 Modificações estruturais e Relação Estrutura-Atividade (REA).....</b>	<b>79</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>5.1 Síntese e caracterização.....</b>	<b>82</b>
<b>5.2 Atividade biológica e estudo de relação estrutura-atividade.....</b>	<b>91</b>
5.2.1 Atividade larvicida e ecotoxicologia.....	91
5.2.2 Relação estrutura atividade.....	94

**6 CONCLUSÃO.....101**

**7 REFERÊNCIAS.....102**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do indol.....	29
<b>Figura 2.</b> Estrutura química da isatina.....	30
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da quitina.....	32
<b>Figura 4.</b> Estrutura do indol- 3-acetonitrila.....	33
<b>Figura 5.</b> Derivado do indol bloqueador de canal (Kir) em <i>Ae. aegypti</i> .....	33
<b>Figura 6.</b> Estruturas de derivados do indol 6-Bromo e o 5-Cloro.....	34
<b>Figura 7.</b> Estrutura da 1-(4-nitrofenil)-3-(4-{2-oxo-2-[2-(2-oxo-1,2-dihidro-3 <i>H</i> -indol-3-ilideno)hidrazinil]etil}fenil)ureia.....	35
<b>Figura 8.</b> Estrutura da indirubina,.....	35
<b>Figura 9.</b> Estrutura regular das benzoiluréias.....	37
<b>Figura 10.</b> Estrutura no modelo bipartido das benzoiluréias.....	37
<b>Figura 11.</b> Estrutura das naftalimidias glicosiladas .....	38
<b>Figura 12.</b> Estrutura da <i>N</i> -acetil isatina.....	39
<b>Figura 13.</b> Estruturas dos derivados tosilados do indol, 2-nitro indol, indolina e isatina.....	40
<b>Figura 14.</b> Estrutura da alosamidina.....	41
<b>Figura 15.</b> Estruturas de 2-(acetilamino)-2-deoxi-,1,3,4,6-tetraacetato e 4-azido-4-deoxi-,1,2,3,6-tetraacetato.....	42
<b>Figura 16.</b> Espectro de absorção na frequência de infravermelho dos compostos: (1) 2,3-dihidro-1[(4-metilfenil)sulfonil]-1 <i>H</i> -indol(1d), (2) 1-Tosil-1 <i>H</i> -indol-2,3-diona (2a) e (3) <i>N</i> -acetilisatina (2b).....	87
<b>Figura 17:</b> Fórmula estrutural de 1-Tosil-1 <i>H</i> -indol-2,3-diona e sua fórmula química.....	89
<b>Figura 18:</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN do composto 1-Tosil-1 <i>H</i> -indol-2,3-diona (2a).....	90
<b>Figura 19.</b> Espectro de <sup>13</sup> C RMN do composto 1-Tosil-1 <i>H</i> -indol-2,3-diona (2a).....	91
<b>Figura 20.</b> Moléculas sintetizadas e atividade biológica frente <i>Ae. aegypti</i> .....	94

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Estruturas de ressonância do indol quando substituído C-3 e C-2.....	43
<b>Esquema 2:</b> Mecanismo da reação de substituição eletrofilica do indol.....	44
<b>Esquema 3:</b> Mecanismo de tosilação do 2-nitro indol.....	46
<b>Esquema 4:</b> Mecanismo de hidrogenação do indol.....	47
<b>Esquema 5:</b> Mecanismo de tosilação da indolina.....	47
<b>Esquema 6:</b> Mecanismo de tosilação da isatina.....	49
<b>Esquema 7:</b> Mecanismo de <i>N</i> -acetilação da isatina.....	50
<b>Esquema 8:</b> Mecanismo da redução da isatina <i>N</i> -substituída e abertura do ciclopentano....	51
<b>Esquema 9:</b> Mecanismo da redução da isatina <i>N</i> -substituída.....	53
<b>Esquema 10:</b> Mecanismo da tetra-acetilação da <i>N</i> -acetilglicosamina.....	54
<b>Esquema 11:</b> Mecanismo da tetra-acetilação da $\alpha$ -D-Manopirranose,.....	55
<b>Esquema 12:</b> Esquema para síntese do 2-Nitroindol (1a).....	66
<b>Esquema 13:</b> Esquema para síntese de 2-Nitro-1-(Tosil)-1 <i>H</i> -indol (1b).....	67
<b>Esquema 14:</b> Esquema para síntese de 2,3-Dihidro-1 <i>H</i> -indol (1c).....	68
<b>Esquema 15:</b> Esquema para síntese da <i>N</i> -tosilindolina (1d).....	69
<b>Esquema 16:</b> Esquema para síntese de 1-Tosil-1 <i>H</i> -Indol-2,3-diona (2a).....	70
<b>Esquema 17:</b> Esquema para síntese de <i>N</i> -acetilisatina (2b).....	71
<b>Esquema 18:</b> Esquema para síntese de diol derivados (2c - 2e).....	72
<b>Esquema 19:</b> Esquema para síntese de 2-(acetilamino)-2-deoxi-,1,3,4,6-tetraacetato e tetra-acetilação da $\alpha$ -D-Manopirranose, 4-azido-4deoxi.....	73

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Valores decrescentes de coeficiente de partição óleo-agua (Log P), CL <sub>50</sub> e IC <sub>95</sub> dos compostos sintetizados e seus compostos de partida avaliados no REA.....	97
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*Ae.* – *Aedes*

**Calcd** – Calculado

**CHIKV** – Chikungunya vírus

**DENV** – Dengue vírus, denominação atribuída aos sorotipos do vírus da dengue

**KBr** – Brometo de potássio

**LQF** – Laboratório de Química Farmacêutica

**M** – Massa

**t.a.** – Temperatura ambiente

**UV** – Ultravioleta

**ZIKV** – Zika vírus

**P.F.** – Ponto de fusão

**E.M.** – Espectro de Massa

**I.V.** – Infravermelho

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**<sup>1</sup>H RMN** – Ressonância Magnética Nuclear de próton de massa 1

**<sup>13</sup>C RMN** – Ressonância Magnética Nuclear de carbono de massa 13

**DCM** – diclorometano

**TsCl** – cloreto de tosilato

**TEBA** – cloreto de benziltriethylamônio

**TMS** – tetrametilsilano

**REA** – Relação Estrutura-Atividade

**REAQ** – Relação Estrutura-Atividade Quantitativa

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

*Bti* – *Bacillus thuringiensis israelensis*

**BPU** – benzoilfeniluréias

**AHJ** – análogos de hormônio juvenil

**RCIs** – regulador de crescimento de insetos

**ISQ** – inibidor da síntese de quitina

**3-HQ** – 3-hiroxiquinerunina

**RO** – receptores olfativos

**RG** – receptores gustativos

**rf** – ondas de radiofrequência

**Rf** – fator de retenção

**DIL** – decaimento da indução livre (DIL)

**J** – constante de acoplamento

**$\delta$**  – deslocamento químico

**ppm** – partes por milhão

**logP** – coeficiente de partição óleo-água

**CCDA** – cromatografia em camada delgada analítica

**CC** – cromatografia em coluna

**CL<sub>50</sub>** – concentração letal que mata 50% da população

**IC<sub>95</sub>** – intervalo de confiança de 95%

**CI<sub>50</sub>** – concentração que inibe 50% da população

**ppb** – partes por bilhão

**AchE** - acetilcolinesterase

## 1 INTRODUÇÃO

As enfermidades transmitidas por vetores representam 17% de todas as doenças infecciosas mundiais (WHO, 2017a). Dentre os principais causadores dessas doenças destacam-se os mosquitos hematófagos. A habilidade destes artrópodes de propagar patógenos através do repasto sanguíneo tem impacto significativo na saúde pública mundial (WHO, 2017a; WHO, 2017b). Nesse sentido, fêmeas adultas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) são vetores de quatro importantes arboviroses: dengue, chikungunya, Zika e febre amarela, doenças que afetam negativamente diversas regiões de clima temperado (TARGANSKI et al., 2021).

O *Ae. aegypti* é um mosquito holometábolo de alta capacidade de adaptação em ambientes urbanos (BRAGA; VALLE, 2007). Ao longo dos anos, modificou todo o seu ciclo biológico, de ovo a adulto para que ocorra nas proximidades de hospedeiros humanos, priorizando alimentar-se destes, mesmo na localidade de outros mamíferos (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016). Está presente em 128 países e expõe aproximadamente 3,9 bilhões de pessoas (TARGANSKI et al., 2021). A ampla distribuição desse artrópode é consequente da soma do crescimento populacional urbano desenfreado, modificação do ambiente natural do mosquito e alterações climáticas (LIMA-CAMARA, 2016).

O controle da proliferação do vetor é um dos principais meios de redução da incidência das quatro arboviroses e de sua propagação nas cidades. Este pode ser feito através de diferentes ações contando com o manejo integrado de métodos químicos, físicos e biológicos (SANTOS et al., 2018; TARGANSKI et al., 2021). Destes, o controle químico é o principal meio para conter a população de vetores, e engloba a nebulização de adulticidas e aplicação de larvicidas em ambientes de reprodução (TARGANSKI et al., 2021), esta última demonstra vantagens decorrentes da limitação do espaço onde o larvicida deve ser aplicado, em comparação com a nebulização. No entanto, apesar de serem os principais agentes para reduzir a densidade dos vetores, os inseticidas químicos atuais possuem disponibilidade e capacidade de uso ainda limitados, pois podem ser tóxicos ao meio ambiente e a organismos não alvos, e também, pelo uso desenfreado, algumas populações do artrópode passaram a apresentar resistência (MONTE et al., 2020; TARGANSKI et al., 2021).

A utilização frequente e crescente de larvicidas em concentrações não adequadas seleciona vetores com mutações vantajosas, referentes ao fenótipo de resistência, assim há maior probabilidade das gerações futuras sobreviverem a tratamentos com larvicidas de

mecanismos de ação similares, aumentando até o ponto em que a eficácia destes seja comprometida (MALLET, 1989; MARQUARDT, 1996; FFRENCH-CONSTANT, 1998; ROBERTSON, 2007). Dessa maneira, casos de resistência já foram identificados em classes de larvicidas amplamente utilizadas como os organofosforados (SARWAR; SALMAN, 2015; BELLINATO, 2016; TARGANSKI, 2020).

É importante salientar ainda que, dentre os larvicidas atualmente utilizados estão presentes o piriproxifeno (regulador de crescimento de insetos – RCIs) e o diflubenzuron (inibidor da síntese de quitina – ISQ), substâncias que causam modificações nos perfis de reprodutibilidade e mortalidade de *Artemia salina* organismo não-alvo base de cadeia alimentar do zooplâncton, sendo tóxicos a este organismo e podendo assim alterar ecossistemas (CUNNINGHAN, 1976; SANTOS; 2017).

Nesse sentido, a necessidade atual para os agentes químicos está na produção de novos tipos de larvicidas que não causem resistência e sejam ecologicamente eficazes para utilizações prolongadas (HANSCH; VERMA, 2009). Assim, através de estudos de relação estrutura-atividade (SAR, sigla de Structure-Activity Relationships) é possível delinear o planejamento racional de novos compostos ativos que já possuam atividades biológicas ou toxicológicas contra outros tipos de pragas como derivados da isatina que já foram produzidos e testados quanto às atividades antivirais, antibacterianas, repelente de importância na postura de ovos, embriotóxico característico para o *Ae. aegypti* e também derivados do indol que já apresentaram atividades anti-inflamatórias, nematicidas, fungicidas, repelentes e inseticidas (BOHBOT et al., 2011a; SELVAM et al., 2001; TARGANSKI et al., 2021; VIEIRA et al., 2012; WU et al., 2012). Supondo-se dessa maneira, a possibilidade de alterações específicas para o vetor (DEVILLERS; DOUCET-PANAYE; DOUCET, 2015).

Diante do exposto e baseando-se em estudos pregressos de QSAR com larvas do *Aedes aegypti* é possível delinear estruturas promissoras através da hidrofobicidade, como um dos parâmetros mais associados à letalidade de compostos larvicidas (HANSCH; VERMA, 2009). Logo, fundamentando-se na hipótese de que estruturas que já apresentam outras atividades biológicas possam ser otimizadas para o vetor, somadas ao fato de que alterações da lipofilicidade de moléculas possam ser fatores essenciais para aumentar a capacidade tóxica dos compostos ao organismo alvo. Há o interesse em sintetizar estruturas variadas e diferentes dos larvicidas comerciais com o intuito de encontrar novos protótipos larvicidas

que sejam menos tóxicos a organismos não alvo e entender o impacto dessas modificações sobre a atividade biológica.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Considerações gerais sobre o mosquito *Ae. aegypti*

#### 2.1.1 Ciclo de vida do *Ae. aegypti*

O *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) pertence a família *Culicidae* (ordem *Diptera*). Este artrópode é visto como eminentemente antropofílico e possui preferência para desenvolver-se em recipientes artificiais, próximos de áreas urbanas (KAHAMBA et al., 2020). É o principal transmissor de quatro importantes arboviroses: febre amarela, dengue, chikungunya e Zika, doenças de importância pública mundial (TARGANSKI et al., 2021).

Entender o ciclo de vida do vetor colabora para o desenvolvimento de práticas mais eficazes de controle. Assim, o ciclo de vida do *Ae. aegypti* divide-se em três fases: ovo, aquática (compreende a fase de larva e pupa) e terrestre (adulto). A fase aquática (larva e pupa) ocorre principalmente em ambientes artificiais com água sem impurezas, parada e com pouca evaporação (BESERRA; FERNANDES; RIBEIRO, 2009). Durante a última fase o artrópode se relaciona diretamente a atividades humanas que tornaram-no sinantrópico (LIMA-CAMARA, 2016). Em meio ao seu desenvolvimento, cada população do mosquito possui diferentes padrões de amadurecimento, resistência e fecundidade, motivados por fatores próprios da espécie e pelo ambiente em que estão inseridos. No entanto, é importante destacar que o tamanho da estrutura corporal das fêmeas está continuamente relacionado a resistência e número de ovos postos (BESERRA; FERNANDES; RIBEIRO, 2009).

Os mosquitos possuem hábitos diurnos, com maior hematofagia durante o amanhecer e ao entardecer. Nesse sentido, o metabolismo do artrópode pode ser aumentado em períodos quentes, sendo sua evolução reduzida em até oito dias, ou ampliada em até 22 dias em períodos frios (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

##### 2.1.1.1 Ovo

Os ovos tem comprimento de aproximadamente, 1mm com contorno fusiforme e alongado. A fêmea tem preferência por fazer a postura em paredes de recipientes artificiais que servem como criadouros junto a superfície da água. Logo após a postura os ovos são brancos, mas adquirem cor negra rapidamente (FORATTINI, 2002). Essa forma apresenta a maior resistência de todo o ciclo biológico do vetor e também dispõe de grande importância para seu desenvolvimento, possibilitando ao mosquito alta sobrevivência pelas alterações climáticas (SILVA, 1998).

Estudos demonstraram que o desenvolvimento do embrião do mosquito possui uma taxa de eclosão de ovos de 90% quando a média da temperatura está entre 22° e 28°C, e que pode reduzir abruptamente se as temperaturas estiverem abaixo de 22°C ou acima de 31°C (HONÓRIO et al., 2009). A eclosão leva em conta que uma fêmea poderá originar aproximadamente 1000 artrópodes durante o período adulto, dividindo-os em inúmeros criadouros, tática que permite a disseminação e continuidade da espécie (FORATTINI, 2002; HONÓRIO et al., 2009). Não obstante, os ovos podem permanecer longe da água por até 450 dias e eclodirem facilmente quando em contato com a mesma (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Esse fato representa uma grande barreira para sua erradicação visto que estes são transportados facilmente em objetos de maneira passiva (FORATTINI, 2002).

#### 2.1.1.2 Fase aquática (Larva e pupa)

O *Ae. aegypti* é um artrópode que sofre metamorfose completa, sendo a fase de larva o período de alimentação e crescimento. O estágio aquático de larva serve para que elas alimentem-se principalmente de material de origem orgânica que se acumula no fundo e nas paredes dos criadouros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Esse estágio subdivide-se ainda em quatro instares larvares (L1 - L4). A extensão dessa fase está diretamente relacionada a temperatura, quantidade de larvas no depósito e presença de alimento (FORATTINI, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

No decurso do quarto estágio (L4), no formato de pupa, não ocorre alimentação e há a metamorfose de larva para adulto. As pupas permanecem com poucos movimentos na superfície da água, facilitando a emergência do inseto adulto para a fase terrestre. Geralmente, essa fase dura de dois a três dias (FORATTINI, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

#### 2.1.1.3 Fase terrestre (Adulto)

A fase reprodutiva e de dispersão é representada pelo adulto. Os mosquitos de ambos os sexos podem acasalar após 24 horas de emergência (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Com maiores atividades durante o amanhecer e ao entardecer, os machos adultos vivem em média de 30 a 35 dias e se alimentam de seiva vegetal. As fêmeas além de seiva vegetal, também se alimentam de sangue de vertebrados, de onde retiram nutrientes e hormônios para completar o desenvolvimento e amadurecimento dos ovos (GUZMÁN, 2002; FORATTINI, 2002; TALYULI et al., 2015).

Cada fêmea ovipõe cerca de 120 ovos, para produção destes pode haver mais de um repasto sanguíneo (alimentação através do sangue de outros animais) (CONSOLI, 1994; FORATTINI, 2002). Por conseguinte, durante o repasto sanguíneo o vetor pode se infectar com a ingestão de partículas de vírus, estas passam para o epitélio do intestino médio, replicam, e atravessam esta barreira principal em direção a hemocele até finalmente alcançar o epitélio da glândula salivar. Depois da replicação viral nas glândulas salivares, o mosquito infectado pode transmitir o vírus ao hospedeiro vertebrado suscetível pelo resto da vida (BONA, 2011).

## **2.2. Um vetor e quatro doenças**

### **2.2.1 Dengue**

O vírus da dengue pertence ao gênero *Flavivirus*, família Flaviridae. No Brasil circulam cinco sorotipos antigenicamente diferentes e de resposta imune exclusiva, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e DENV-5 (MINISTÉRIOS DA SAÚDE, 2017b; MUSTAFA et al., 2015). O quinto sorotipo o DENV-5, foi descoberto durante a seleção de amostras na Malásia em 2007. Em primeiro contato acreditou-se que este seria uma variação do DENV-4, porém durante testes em macacos *Rheus* detectou-se a produção de um conjunto distinto de anticorpos dos outros tipos virais e também um maior título viral (MUSTAFA et al., 2015).

Uma característica inerente da doença ocorre, pois a infecção a um sorotipo confere imunidade permanente a esse sorotipo e imunidade cruzada temporária (seis meses a dois anos) para os outros (BRADY; HAY, 2020). Essa arbovirose é transmitida no Brasil principalmente por mosquitos do *Ae. aegypti* e se caracteriza por apresentar sintomatologia clássica de febre entre 39 e 40 °C, com começo repentino durando de 2 a 7 dias, seguido de dores de cabeça, no corpo e articulações, vômitos, manchas vermelhas na pele, atonia e dor ao redor dos olhos (BARROSO et al., 2020; BRADY; HAY, 2020; FERREIRA et al., 2019). A doença pode se manifestar de três formas: inaparente, clássica ou severa. A forma grave (severa) integra dor contínua e intensa no abdômen com vômitos ininterruptos e sangramento de mucosas (FERREIRA et al., 2019).

As infecções causadas pelo vírus da dengue aumentaram radicalmente nos últimos dez anos, passando a ser atualmente endêmica em mais de 100 países (MARCHIORI; HOCHHEGGER; ZANETTI, 2020). No entanto, é importante salientar que, o mundo tem

enfrentado a pandemia da COVID-19. Com a chegada do vírus SARS-CoV-2 no Brasil em fevereiro de 2020, os números de notificações de casos dengue que nesse período estavam ultrapassando as notificações do ano de 2015 (ano ao qual houve a maior epidemia de dengue já registrada no país) percebeu-se uma queda no número de informações, simultaneamente no período em que as ações de saúde ficaram voltadas para o controle da COVID-19, indicando uma possível subnotificação num período em que é esperado o aumento sazonal de casos de dengue no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b; MASCARENHAS *et al.*, 2020).

O mesmo ocorre para a SE (semana epidemiológica) 19 de 2021 em comparação com o ano de 2020, houve uma redução de 60,5% de casos registrados para o mesmo período analisado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Logo, apesar da redução da notificação do número de casos atuais de dengue causados pelo *status* pandêmico é importante citar que, ainda há elevação no nível pluviométrico e falhas nas ações de controle do vetor (*Ae. aegypti*) que contribuem para o aumento de casos de dengue nesse período (MARCHIORI; HOCHHEGGER; ZANETTI, 2020; MASCARENHAS *et al.*, 2020).

### 2.2.2 Febre Amarela (FA)

A febre amarela (FA) é uma arbovirose do gênero *Flavivirus*, família Flaviridae. É uma doença infecciosa aguda, de curta duração (aproximadamente 12 dias), não contagiosa e de gravidade variável (CAVALCANTE; TAUIL, 2017). Costuma ser uma doença febril, de sintomatologia inicial inespecífica, pois se assemelha a dengue, podendo ocorrer icterícia ao longo dos dias depois da infecção. Pode ser dividida em dois ciclos, um urbano e outro silvestre. Através da perspectiva clínica, não existe nenhuma diferença entre os dois ciclos, no urbano apenas homens serão seus hospedeiros e no silvestre apenas macacos. Porém, neste último, os humanos podem servir de hospedeiros acidentais. O vetor principal do ciclo urbano é o *Ae. aegypti*, que pode manter-se transmissor após infectado por toda a vida (VASCONCELOS; CARVALHO, 2015).

Não há mais registros de febre amarela urbana no Brasil desde 1942, período em que foi criada a vacina (CAVALCANTE; TAUIL, 2017). No entanto, ao longo dos anos foram confirmados números crescentes de casos de febre amarela silvestre, incluindo casos fatais (CAVALCANTE; TAUIL, 2017; VASCONCELOS; CARVALHO, 2015) VASCONCELOS; CARVALHO, 2015; CAVALCANTE, 2017). Nesse sentido, a rápida dispersão do *Ae. aegypti*

e sua extensa ocorrência podem ser fatores que facilitem a reurbanização da doença. Assim, há necessidade de controle da infestação do mosquito e manutenção da cobertura vacinal em áreas com recomendação para conter o risco de reurbanização da arbovirose (CAVALCANTI, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017c).

### 2.2.3 *Chikungunya*

Esse arbovírus pertence ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*. O nome *chikungunya* vem de uma palavra em Makonde, idioma dos Makondes que vivem em Moçambique, quer dizer “aquele que se curva”, indicando o aspecto curvado dos pacientes pela intensa artralgia. É transmitido principalmente pelos vetores antropofílicos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (FRANK HADLEY COLLINS, 2010).

Em 1952 se dá o primeiro relato de um paciente acometido pela *chikungunya*. Após cinquenta anos com casos raros de pessoas infectadas, ocorreram séries de epidemias sucedidas principalmente na Ilha da Reunião – província francesa entre 2005 e 2006, período pelo qual aproximadamente metade dos habitantes foi infectada afetando também alguns territórios do oceano pacífico como Índia, Malásia e Tailândia, respectivamente. Atualmente, pacientes acometidos pelo CHIKV são encontrados em cerca de 40 países, em muitos desses o vírus se tornou endêmico (RASHAD et al., 2018).

No ano de 2014 passou a ser incorporada no Brasil. O país manifesta apenas um sorotipo - CHIKV e, apesar da infecção com este vírus apresentar em geral sintomas similares aos da dengue, possui características únicas que permitem discriminar as doenças entre si. A sua sintomatologia exhibe principalmente um forte acometimento das articulações por um longo período de tempo, comprometendo por muitas vezes a qualidade de vida do paciente (FERREIRA et al., 2019). Essa artralgia abrange até 80% dos acometidos podendo se estender por meses e até mesmo anos. As formas de manifestação reumáticas após a doença incluem continuidade da dor até artrite reumatoide, que se desenvolve em aproximadamente 5% dos pacientes (ALMEIDA, 2013).

### 2.2.4 *Zika*

O Zika vírus (ZIKV), pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviridae* da mesma forma que o vírus da dengue (DENV), é transmitido pelo mosquito *Ae. aegypti* (VALLE, 2016; PAIXÃO, 2018). Foi inicialmente identificado em uma fêmea de macaco *Rhesus*, na floresta Zika (Uganda, África) em 1947 (DICK, GWA et al., 1952). Um ano depois, no

mesmo continente o ZIKV foi identificado em mosquitos (VASCONCELOS, 2015; WHO, 2018c; CHANG, 2016).

Até o ano de 2006 haviam casos pontuais da doença em humanos, localizados na África e Ásia. No entanto, o primeiro surto ocorreu em 2007, em Yap (Estados Federados da Micronésia), estima-se que mais da metade da população tenha sido infectada pelo ZIKV (DUFFY et al., 2009). A maior parte dos indivíduos adultos saudáveis acometidos são assintomáticos, porém alguns manifestam sintomas típicos como febre, dores musculares e nas articulações, erupção cutânea, conjuntivite, mal-estar ou dor de cabeça (VASCONCELOS, 2015; WHO, 2018c; CHANG, 2016).

Em 2013 houve outro grande surto afetando aproximadamente 11% da população da Polinésia francesa, dessa vez, a Síndrome de Guillain-Barré (doença autoimune que provoca paralisia muscular) foi associada pela primeira vez ao ZIKV (WHO, 2018c; CHANG, 2016). No Brasil, os primeiros casos de transmissão ocorreram em 2015. Meses após a ocorrência desses casos o país registrou o crescimento incomum do nascimento de bebês apresentando microcefalia (má formação congênita em que o cérebro não se desenvolve adequadamente) (CHANG et al., 2016; WHO, 2018b).

Assim, houve crescente associação das infecções pelo vírus em mulheres gestantes e o aparecimento de lesões cerebrais em seus fetos. A microcefalia causada por essa arbovirose ocorre possivelmente pela capacidade do vírus em atravessar a parede placentária acometendo o sistema nervoso do feto a qualquer período gestacional, podendo ocorrer morte fetal. No entanto, nem toda mulher que foi infectada durante a gravidez terá um bebê com microcefalia (FRANCO et al., 2016). Já a síndrome de Guillain-Barré é associada ao Zika vírus como uma complicação da infecção (BROGUEIRA; MIRANDA, 2017) sendo uma neuropatia inflamatória desmielinizante, de rápida e crescente fraqueza muscular (NÓBREGA et al., 2018).

### ***2.3 Contexto do controle de larvas do *Ae. aegypti****

As formas de controle do *Ae. aegypti* constituem um importante desafio graças a problemas de infraestrutura das cidades e resistência alcançada pela população do vetor após exposição excessiva e indiscriminada a larvicidas e inseticidas (BELLINATO et al., 2016; BRITO et al., 2013; KHAN et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; RODRIGUEZ et al., 2012).

Nesse sentido, o Plano Nacional de Controle da Dengue (PNCD) recomenda três metodologias de controle ao vetor: controle mecânico, biológico e químico. O primeiro é fundamentado em formas de cuidado e eliminação de possíveis criadouros, reduzindo a procriação e afastando o contato do artrópode com humanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Esta é a medida menos invasiva, visto que é utilizado apenas o manejo de recipientes e limpeza de prováveis criadouros.

Já o controle biológico é baseado na utilização de organismos predatórios ou patogênicos para controle populacional do vetor, como peixes (*Gambusia* sp) que se alimentam de larvas, pupas e invertebrados aquáticos (*Toxorhynchites* ou copépodos). Também se insere o uso de patógenos como o fungo *Lagenidium giganteum*, e de nemátodos (*Romanomermis culicivorax* e *R. iyengari*) (BRAGA; VALLE, 2007; MELO; SOCCOL, C.; SOCCOL, V., 2016).

O controle químico, no entanto, é o mais utilizado para conter a população de mosquitos, e engloba a aplicação de larvicidas em ambientes de reprodução e nebulização de inseticidas (TARGANSKI et al., 2021). O larvicida organofosforado (OF), temefós é biodegradável e não se acumula nos tecidos, também é neurotóxico, atuando através da inibição permanente da acetilcolinesterase (AChE), que resulta no acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas do artrópode, promovendo o processo de paralisia e morte (BRAGA; VALLE, 2007; FRANCO, 1976). Contudo, apesar de ter sido amplamente utilizado na década de 80, passou a demonstrar sinais de comprometimento da sua eficácia (FRANCO, 1976). Apesar disso, o temefós foi utilizado ainda por aproximadamente 30 anos (BRAGA et al., 2005; FONTOURA et al., 2012; MACORIS et al., 2003; SOARES et al., 2003).

Entre os anos de 1995-1999 foram feitos testes para monitorização e detecção de alterações na suscetibilidade aos organofosforados utilizados no Brasil. Esses testes revelaram a alteração de diversas enzimas relacionadas ao metabolismo de larvicidas e inseticidas em uso no país, sendo eles: temefós, malationa e fenitrothion. Partindo desses resultados, apenas em 2001 com a comprovação de larvas resistentes ao temefós em diversos estados brasileiros a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA – órgão incumbido para coordenação do controle da dengue) promove a substituição gradativa do temefós pelo biolarvicida Bti e os adulticidas por cipermetrina (classe dos piretróides) em locais críticos. A decisão por utilizar substâncias de mecanismos de ação diferentes para as fases do artrópode surgiu como forma de atrasar o aparecimento de resistência (BRAGA et al., 2004; LIMA et al., 2003).

É importante salientar que, as bactérias entomopatogênicas *Bacillus thuringiensis israelenses* (Bti) e *Bacillus sphaericus* (Bs) sintetizam diversas endotoxinas, que ao serem ingeridas pela forma larvária do artrópode são dissolvidas no intestino delgado e liberam prótoxinas por intermédio de clivagem de enzimas digestivas. Essas agem no epitélio intestinal das larvas ocasionando diminuição do peristaltismo, interrupção da alimentação e morte do organismo (BRAGA; VALLE, 2007; MELO; SOCCOL, C.; SOCCOL, V., 2016). O efeito do Bti dura apenas sete dias em condições naturais, e portanto, seriam necessárias várias aplicações para aumentar sua eficácia (GUTIERREZ et al., 2017; PAULA et al., 2019). Assim, em estudos posteriores foi detectada a resistência do *Ae. aegypti* ao Bti em um período de 2 meses em alguns estados (BELINATO; VALLE, 2015).

Como resultado disso, houveram substituições crescentes às substâncias químicas neurotóxicas dispostas até que foram implementados larvicidas que atuavam em alvos distintos dos até então utilizados. Esse grupo denominado de larvicidas alternativos é englobado pelos reguladores de crescimento do inseto (RCI), que incluem o grupo das benzoilfeniluréias (BPU), no qual o diflubenzuron e novaluron fazem parte, e o grupo dos análogos de hormônio juvenil (AHJ), que engloba o piriproxifeno (BRAGA; VALLE, 2007b).

As BPU grupo das benzoilfeniluréias atuam inibindo a síntese de quitina, que é um polímero essencial na formação da cutícula externa durante os estágios de crescimento do mosquito. Os análogos do hormônio juvenil são derivados de terpenos e atuam interferindo o eixo endócrino do inseto, que controla os processos de muda, metamorfose, desenvolvimento ovariano e aquisição da capacidade reprodutiva. Assim, os AHJ inibem a emergência do mosquito adulto (BELINATO; VALLE, 2015; BRAGA; VALLE, 2007b). O piriproxifeno retarda o desenvolvimento das larvas, porém apenas causa morte direta em raras exceções. Além disso, o uso indiscriminado pode induzir resistência a algumas pragas agrícolas como *Bemisia tabaci* e *Musca domestica* (L.). Já havendo relatos de resistência a populações do *Ae. aegypti* (GONZALEZ et al., 2016; LOBATO DA SILVA et al., 2016; MA et al., 2010; SHAH; SHAD; ABBAS, 2015).

Para manejo eficiente do vetor há necessidade da integração de medidas de controle, existindo rotação para os agentes químicos utilizados, não se restringindo a uma classe. Sendo essencial ainda que se mantenha em controle o acompanhamento quanto à eficácia do uso destes agentes, a fim de verificar a existência e o nível de resistência (MARCOS et al., 2018; OMS, 2014).

É necessário implementar ainda, que a ocorrência de resistência em algumas classes de larvicidas químicos se apresenta como consequência de condições genéticas e funcionais, entre outros. O aparecimento de vetores resistentes é um aspecto genético que se agrega a uma população devido ao uso continuado de larvicidas. A habilidade dos artrópodes de sobreviver a concentrações primariamente letais reduz mais rapidamente a eficácia das substâncias, até que não sejam mais úteis. Os fatores funcionais também atuam como importantes na instalação da resistência. Normalmente são referentes a utilização de larvicidas (classe, forma de aplicação, continuidade de tratamento, formulação e concentração, etc) e pela não ocorrência dessa forma operacional controlada e uso exacerbado dos produtos a resistência acaba aumentando (BARRETO, 2005). Não obstante, podendo se tratar de alterações que podem ser transmitidas horizontalmente por via genética, a resistência é preocupante ao levar em consideração a sua manifestação de forma cruzada, ou seja, por mais de uma classe de agentes.

Além dos problemas relacionados a resistência, a possibilidade de toxicidade ambiental é também um fator relevante. Devido a resistência da população do artrópode a alguns agentes químicos utilizados no controle, maiores concentrações do mesmo são necessárias na aplicação, perdendo a seletividade ao organismo alvo, prejudicando o ecossistema e a saúde da população. Um desses efeitos é demonstrado pelo diflubenzuron, larvicida comum, letal para náuplios de *Artemia salina* espécie base de cadeia alimentar do ecossistema aquático por inibir seu desenvolvimento em concentrações entre 0,13 e 1 ppb (partes por bilhão) (GARTENSTEIN; QUINNELL; LARKUM, 2006; WINKALER; MACHADO-NETO, 2011).

Dessa forma, o aparecimento de resistência às substâncias disponíveis e possibilidade de toxicidade a organismos não alvos tem inviabilizado essa metodologia e estimulado pesquisas em relação a alternativas no controle vetorial. Assim, partindo do pressuposto que as alternativas existentes ainda são escassas, há a necessidade por compostos de natureza química distinta dos produtos já utilizados, a fim de minimizar a pressão seletiva para a mesma classe de larvicidas e reduzir o comprometimento ao meio ambiente.

#### **2.4 Mecanismos de resistência**

A crescente resistência a inseticidas é um grave problema para a contenção de vetores. Com a redução da eficácia dessas substâncias há a necessidade de maiores doses para controle equivalente, risco de ressurgimento de doenças, aumento de custos do produto e possíveis danos ao ecossistema (AGRAMONTE; BLOOMQUIST; BERNIER, 2017).

A OMS define resistência como a capacidade de uma linhagem de insetos sobreviver a uma substância que, em uma população normal da mesma espécie seria letal (BRAGA; VALE, 2007; OMS, 1957). O aparecimento de resistência é um mecanismo natural de proteção ao inseto, mas pouco frequente. A utilização desenfreada de inseticidas para controle de mosquitos resulta mais rapidamente em mutações fortuitas na qual são selecionados organismos com características que permitem sua sobrevivência sob doses de um produto tóxico que é normalmente letal (BRAGA; VALLE, 2007; DEVILLERS; DOUCET-PANAYE; DOUCET, 2015).

A pressão seletiva de insetos com genes de resistência pode ser causada por diversas alterações dentro do vetor, sendo algumas hipóteses as causadas por: modificações comportamentais, cuticulares, metabólicas e alteração de sítio-alvo (BHARATI; SAHA, 2021). As alterações comportamentais são de difícil investigação e há poucos estudos acerca da mesma, no entanto, são relatadas quando os artrópodes evitam o contato com locais que contenham a substância tóxica. Supõe-se que os insetos resistentes possam reconhecer o perigo parando de se alimentar ou deixando a área tratada, voando para longe (PANINI et al., 2016).

As modificações cuticulares/penetração reduzida são pautadas no espessamento cuticular dos insetos, fato que interfere na penetração do inseticida/larvicida e dessa forma, na quantidade da substância que chega ao sítio-alvo (PANINI et al., 2016). Na literatura, são citados genes que codificam as proteínas da cutícula expressos em quantidade aumentada nas espécies resistentes, sendo elas: *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, bem como *Anopheles stephensi* e *Culex pipiens pallens* (BHARATI; SAHA, 2021; BRAGA; VALLE, 2007; SEIXAS et al., 2017).

Os insetos possuem naturalmente sistemas de enzimas que asseguram sua sobrevivência, estas são responsáveis por várias funções, as quais a eliminação de xenobióticos é uma delas (LIU et al., 2015). Nesse sentido, as enzimas se desenvolvem comumente para superar prováveis toxinas vegetais como alcalóides, terpenos e fenóis. Esse fato é o motivo pelo qual há casos de rápido desenvolvimento de resistência metabólica a substâncias de origem botânica direta ou indireta (PANINI et al., 2016).

Em si, a resistência metabólica é a mais descrita em estudos, e ocorre através do aumento da habilidade de metabolização de inseticidas e larvicidas, promovendo produtos

menos tóxicos, assim o aumento da expressão de classes de enzimas desintoxicantes de inseticidas, como esterases (EST's), glutationa-S-transferases (GSTs), e citocromo P450s (CYP450) ou oxidases de função mista (OFMs) estão associados a resistência a substâncias em muitas populações de *Ae aegypti* (BHARATI; SAHA, 2021; BRAGA; VALLE, 2007).

O processo de desintoxicação pode ser descrito em enzimas de Fase I (funcionalização) que consiste em hidrólise ou oxidação da substância e de Fase II (conjugação). As esterases são enzimas de Fase I que são aptas a metabolizar substratos endógenos e exógenos, agindo contra diversas classes de inseticidas como piretróides, organofosforados e carbamatos. Estas enzimas promovem a hidrólise do grupamento éster presente na estrutura dessas classes de inseticidas, aumentando a polaridade dos metabólitos e facilitando sua excreção (BHARATI; SAHA, 2021; BRAGA; VALLE, 2007; PANINI et al., 2016).

As Oxidases de função mista (OFMs), também conhecidas como monoxigenases dependentes de citocromo P450, estão presentes em grande número principalmente no intestino, no corpo gorduroso e nos túbulos de Malpighi dos insetos (BRAGA; VALLE, 2007). Também são enzimas de Fase I e são responsáveis pela desintoxicação de xenobióticos e substâncias endógenas como a biossíntese de ecdisona, hormônio juvenil e componentes de feromônios. A expressão aumentada dessas enzimas está relacionada a resistência de diversas classes de inseticidas como: piretróides, organofosforados, carbamatos, inibidores do crescimento de insetos (PANINI et al., 2016).

As glutationa-S-transferases (GST's) são enzimas multifuncionais de Fase II que também podem agir contra o efeito dos inseticidas, como de substâncias cloradas facilitando sua desidrocloração redutiva, transformando-o em um substrato menos tóxico. Não obstante a isso, podem remover espécies tóxicas de radicais livres de oxigênio produzidos pela ação de pesticidas (BRAGA; VALLE, 2007; PANINI et al., 2016).

Além dos três tipos de resistência citados anteriormente, há a resistência por alteração de sítio-alvo. Várias mutações pontuais de alteração do alvo no gene do canal de sódio dependente de voltagem ( $Na_v$ ) e da acetilcolinesterase (AChE) foram identificadas em mosquitos de *Ae. aegypti* (BHARATI; SAHA, 2021). Estes são os principais alvos dos inseticidas neurotóxicos (OC, PI, OF e CA) (BRAGA; VALLE, 2007; PANINI et al., 2016).

Os canais de sódio dependentes de voltagem ( $\text{Na}_v$ ) são os principais sítios-alvo dos piretróides. As alterações de uma valina por uma isoleucina (GTA-ATA) e de fenilalanina por cisteína (TTC-TGC) reduzem a ligação com piretróides, e são classificadas como resistência *knockdown* (kdr) devido a perda imediata de coordenação nos insetos expostos ao inseticida e sua posterior recuperação (BISSON et al., 2021). Já a acetilcolinesterase (AChE) é sítio-alvo de organofosforados e carbamatos. Em uma situação de atuação normal dos pesticidas, estas duas classes atuam inibindo a AChE e portanto, a acetilcolina (neurotransmissor) permanece na fenda sináptica promovendo a propagação do impulso nervoso, levando o inseto a morte. A resistência então está relacionada com a diminuição da afinidade da AChE pelo inseticida, conduzindo a interrupção do estímulo nervoso (BISSON et al., 2021; BRAGA; VALLE, 2007).

Não suficiente aos mecanismos de resistência anteriormente citados, ainda há a possibilidade da soma de diferentes alterações nos insetos aumentando o nível de resistência. A “Resistência cruzada” pode acontecer quando um mecanismo contra um tipo de inseticida também permite defesa contra outro tipo de pesticida, mesmo que o artrópode nunca tenha sido exposto a este último. Essa ferramenta pode ser resultado de enzimas não específicas que atacam grupos funcionais de inseticidas em vez de moléculas específicas, podendo envolver inseticidas com diferentes mecanismos de ação. A “Resistência múltipla”, no entanto, é decorrente de diferentes modos de resistência coexistindo e conferindo resistência a diferentes inseticidas aos quais a praga foi exposta (PANINI et al., 2016).

Nesse contexto, há uma necessidade crítica de encontrar substâncias novas, ambientalmente seguras, mais eficazes, e com mecanismos de ação diferentes dos meios químicos atuais que resolvam esses problemas. (BRAGA; VALLE, 2007; DEVILLERS; DOUCET-PANAYE; DOUCET, 2015).

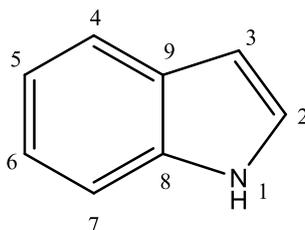
### ***2.5 Relação entre a fisiologia do *Ae. aegypti* e a busca por novos protótipos***

O controle químico seletivo é uma proposta de procedimento alternativo para o controle do *Ae. aegypti*. Este tipo de controle tem como alvo uma particularidade fisiológica do inseto, especificamente não encontrada em outros organismos. Os componentes bioquímicos ou vias bioquímicas únicos em insetos são considerados bons alvos para esse tipo de controle.

Os mosquitos possuem estruturas chamadas sensilas que estão distribuídas em alguns órgãos quimiossensoriais, como as antenas, palpos maxilares e probóscide, essas estruturas são pertencentes aos receptores gustativos (RG) e receptores odorantes (RO). Este último possui grupos de genes de receptores denominados OR<sub>2</sub> e OR<sub>9</sub> (Olfactory Receptors) presentes em *Ae. aegypti* (BOHBOT et al., 2013a; RUEL; YAKIR; BOHBOT, 2019).

Estudos anteriores indicam que ambos receptores podem ser fortemente ativados pela molécula do indol (**Figura 1**). Assim, tendo como base a sensibilidade e seletividades das interações, estes receptores são reconhecidos como “indolérgicos” e podem influenciar na determinação do local de oviposição e escolha para repasto sanguíneo de mosquitos adultos e outros papéis adicionais em larvas dos vetores (BOHBOT et al., 2013a; RUEL; YAKIR; BOHBOT, 2019).

**Figura 1.** Estrutura química do indol



O receptor olfativo OR<sub>2</sub> é expresso nas fases adulta e larval do *Ae. aegypti*, enquanto o OR<sub>9</sub> é encontrado nas antenas das larvas. A conservação desse grupo de receptores evidencia a importância ecológica do mesmo, favorecendo que intervenções por agentes com potencial atividade repelente ou tóxica ocorram de forma direta (RUEL; YAKIR; BOHBOT, 2019). Em estudos anteriores existem evidências de que o indol é tóxico para larvas do *Ae. aegypti* na concentração que mata 50% das larvas (CL<sub>50%</sub>) de 76 ppm (THANABALU; PORTER; HINDLEY, 1996).

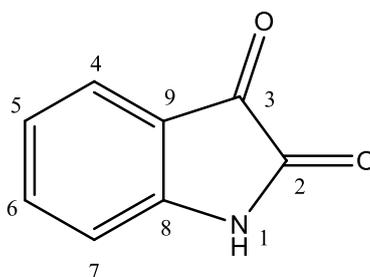
Além da ação exógena sobre esse organismo alvo, o indol é resultante de vias metabólicas responsáveis pela proteção e desenvolvimento do artrópode (LI; LI, 1997). A relação entre produtos do metabolismo do mosquito e as moléculas desenvolvidas pode indicar novos alvos para larvicidas, como a via das quinureninas. O indol, produto do metabolismo do triptofano, pertence a uma via bioquímica de grande relevância para produção de pigmentos dos olhos e metabolização de espécies reativas de oxigênio tóxicas para esse inseto. A quinurenina e a 3-hidroxiquinurenina (3-HK) são intermediários essenciais

na via de oxidação do triptofano (HAN; FANG; LI, 2002). A metabolização da quinurenina para 3-HK é uma via valiosa para o catabolismo em mosquitos, preferencialmente na fase de larvas e ovos. A 3-HK, por si só é naturalmente reativa e eventualmente tóxica (HAN; FANG; LI, 2002), assim, para garantir condições de metabolismo normal nesses seres, é imprescindível desviar-se do acúmulo desse produto (HAN; BEERNTSEN; LI, 2007).

Através da interrupção dos pontos de ajuste dessa via metabólica é possível inibir o desenvolvimento natural e disseminação do mosquito em detrimento da interferência sobre a formação de substratos essenciais e o controle de estresse oxidativo (OLIVEIRA et al., 2013). Como 30% das substâncias voláteis emitidas pelo suor da cabeça de humanos é indol, espera-se que o mosquito busque o homem como principal fonte de repasto sanguíneo. No entanto, o mosquito também pode ser atraído para outros locais que contenham indol, mesmo que esse não faça parte do nicho ecológico habitual, como fungos e plantas (BOHBOT et al., 2011; GHANINIA; IGNELL; HANSSON, 2007).

Analisando estudos antecedentes de REA estruturas que já apresentam alguma atividade biológica podem ser mais eficazes na busca por uma nova substância eficaz contra o *Ae. aegypti* (SOUSA et al., 2019; TARGANSKI et al., 2021). Logo, com o núcleo indólico, encontra-se uma grande gama de moléculas naturais e sintéticas biologicamente ativas, sendo uma delas a 1*H*-indol-2,3-diona, mais conhecida como isatina (**Figura 2**), baseada no anel aromático indólico apresenta duas carbonilas, uma cetônica e outra amidíca. Essa molécula possui alta versatilidade sintética, por seu grande potencial em ser utilizada na síntese de diversos prototipos heterocíclicos, como oriundos indólicos e quinolínicos, sendo um importante elemento em sínteses (DA SILVA et al., 2015). Os derivados de isatina possuem propriedades biológicas como antibacteriano, antifúngico e antiviral (NATH et al., 2020).

**Figura 2.** Estrutura química da isatina



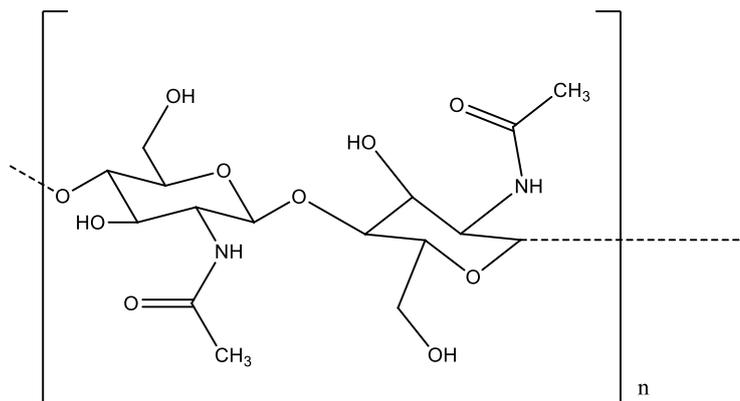
Há ainda, as pesquisas farmacológicas com a indirubina que é produzida através da oxidação e dimerização do indoxil e isatina, estas indicam que o extrato aquoso de folhas de

*Indigofera suffruticosa* como repelente de destaque na postura de ovos e embriotóxico principalmente para o *Ae. aegypti* (VIEIRA et al., 2012). Os experimentos feitos em larvas do estágio L2 com extrato aquoso de *I. suffruticosa* demonstraram após 72h de contato alterações morfológicas na região anterior do intestino médio das larvas, com rompimento da base do envelope peritrófico (PE) e por consequência descontinuação do epitélio intestinal com crescimento do lúmen. Além do mais, houve um atraso no crescimento da mesma sendo diretamente relacionado as alterações morfológicas (VIEIRA et al., 2012).

É importante salientar que, o envelope peritrófico (PE) é uma parte mucinosa constituída por proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos e quitina, sendo de ampla importância para os processos digestivos, bem como para proteção contra invasão por microorganismos e parasitas. No entanto, dadas as importantes funcionalidades biológicas desse envelope sua formação ainda é pouco conhecida (VIEIRA et al., 2012). Também foram relatados que muitos derivados da isatina possuem atividade inseticida de amplo espectro e são usados como importantes ativos para controlar pragas agrícolas (AKDAG et al., 2014).

Não obstante a isso, estudando aspectos da fisiologia e morfologia do inseto pode-se tentar prever outras substâncias seletivas que apresentem baixa persistência no ambiente, como estruturas similares a quitina (**Figura 3**) sendo possíveis alvos contra o vetor. Tendo por base a fase larval, o exoesqueleto é formado por uma cutícula, de base predominantemente de quitina, que atua como um meio de separação entre o organismo e o ambiente, protegendo a larva contra danos físicos, desidratação e infecções. A quitina também está presente em várias estruturas e matrizes extracelulares além do exoesqueleto como a matriz peritrófica sintetizada pelo tubo digestivo, traqueias, partes do sistema reprodutor e a cutícula serosa. Portanto, o desenvolvimento dos insetos é estreitamente ligado à remodelação dessas estruturas de quitina (FARNESI et al., 2012). Assim, moléculas semelhantes a quitina também podem ser alvos de interesse na interferência dos processos de muda (ecdise) das larvas.

**Figura 3.** Estrutura química do polissacarídeo quitina em forma de cadeia



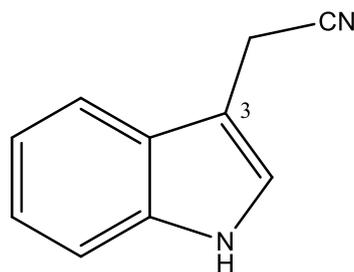
Dessa forma, modificações na estrutura do indol, da isatina e da quitina podem aperfeiçoar suas atividades biológicas. Considerando esses aspectos, alterações nas prováveis interações químico biológicas podem possibilitar certa quantidade de compostos e potencializar a toxicidade para o mosquito expondo o desenvolvimento de estratégias de controle do vetor.

## **2.6 Protótipos larvicidas/inseticidas frente ao *Ae. aegypti* e outros insetos**

Baseando-se na estreita relação comportamental, metabólica e fisiológica entre os derivados do indol, isatina e quitina com o *Ae. aegypti*, é notável o potencial de protótipos baseados em suas estruturas para síntese de novos derivados ativos sobre o mosquito, podendo atuar como larvicidas, inseticidas ou repelentes. Todavia, os estudos relacionados a possibilidade de novos agentes ativos contra este vetor a partir dessas moléculas são poucos, destacando a necessidade por novas moléculas derivadas das suas estruturas, com potencial atividade biológica frente ao artrópode.

O indol é uma molécula de sinalização que pode ser facilmente reconhecida por insetos, influenciando seu comportamento, como oviposição, reconhecimento de local de repasto sanguíneo para mosquitos, bem como repelente para larvas de *Ae. aegypti* (LEE; WOOD; LEE, 2015; SOUSA et al., 2019). Outras pragas também respondem a derivados do indol, como a borboleta *Pieris rapae*, por meio de estudos da avaliação da toxicidade foi comprovado que o indol-3-acetonitrila (**Figura 4**) impede a sua oviposição, no entanto, alterações no anel indólico reduzem esse efeito (LEE; WOOD; LEE, 2015).

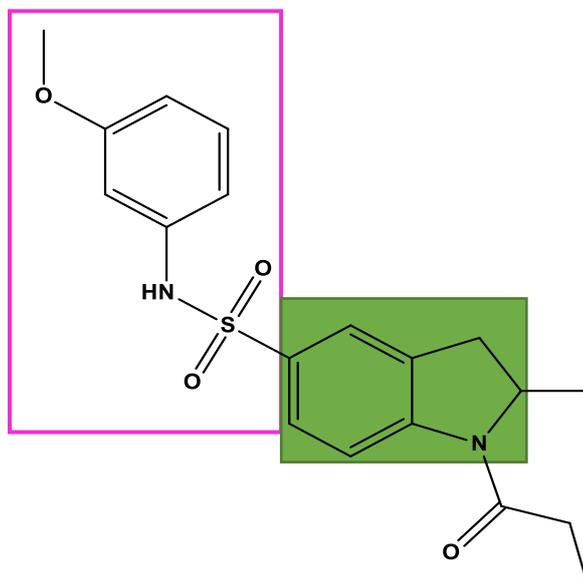
**Figura 4.** Estrutura do indol-3-acetonitrila. Derivado do indol ativo frente a larvas de *Pieris rapae*.



Fonte: (LEE; WOOD; LEE, 2015).

Como consequência, estruturas provenientes da reação da indolina (derivado reduzido do indol) com grupos sulfonamidas em regiões precisas do anel indólico podem ser relevantes para o desenvolvimento de inseticidas. O 1*H*-indol-5-sulfonamida, 2,3-dihidro-*N*-(3-metoxifenil)-2-metil-1-(1-oxopropil) (**Figura 5**) foi identificado como bloqueador de canais retificadores de potássio (Kir) em *Ae. aegypti*. Esses canais são proteínas tetraméricas que orientam íons K<sup>+</sup> através da membrana celular e geram uma corrente de íons importantíssima para diversas funções celulares do mosquito (RAPHEMOT et al., 2014).

**Figura 5.** Derivado do indol bloqueador de canal retificador de potássio (Kir) em *Ae. aegypti*. Os grupos destacados em verde (núcleo indólico central) e rosa (sulfonamida) são essenciais na otimização da atividade bloqueadora de canais AeKir1 do mosquito. A estrutura em questão apresenta uma CI<sub>50</sub> de 0,32 μM.



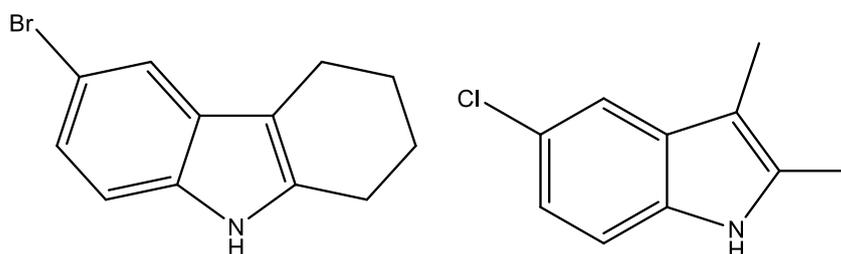
Fonte: (RAPHEMOT et al., 2014).

Em *Ae. aegypti* são configurados cinco genes de canais do tipo Kir (AeKir1, AeKir2A, AeKir2B, AeKir2B' e AeKir3) que podem ser encontrados no tórax e abdômen, cabeça, túbulos de Malpighi e intestinos desses insetos. Pesquisas *in vitro* demonstraram que

aplicações de inibidores desses canais bloqueiam seletivamente a saída de urina de fêmeas adultas causando inchaço abdominal e matando os mosquitos dentro de 24h. Modificações na estrutura representada na **figura 5** possibilitaram variações pertinentes na atividade sobre os mosquitos. Haja vista que, sem alterações na estrutura indicada esta possui concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) de 0,32 µM. Mantendo o núcleo indólico central (verde) e alterando o tamanho das sulfonamidas (rosa) foi observada uma redução de duas a três vezes na potência. Já modificando o núcleo central, pressupondo que este seria o grupo farmacofórico, houve redução em dez vezes na potência (RAPHEMOT et al., 2014).

Segundo Cheng et al. 2003, compostos promissores como larvicidas contra vetores de importantes arboviroses podem ser considerados em concentração menor que 100 µg/mL (CHENG et al., 2003; GOMES et al., 2016). Nesse sentido, pesquisas indicam que análogos do indol halogenado como o 6-bromo-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-carbazol e o 5-cloro-2,3-dimetil-1*H*-indol (**Figura 6**) exercem forte ação larvicida contra larvas dos mosquitos produzindo valores de CL<sub>50</sub> 1,5 µg/mL (5,88 µM) e 3,6 µg/mL (19,91 µM) após 2 horas de tratamento. Além disso, os compostos também não foram tóxicos para organismos não alvos como *Caenorhabditis elegans* e *Galleria mellonella*, sendo seletivos para o vetor. Este efeito não é demonstrado pelo biolarvicida comercial *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) que é letal para larvas de *G. mellonella*. Porém, essas substâncias são consideradas como de efeito imediato (neurotóxicos), ou seja, atuam de maneira semelhante aos larvicidas convencionais, como temefós (casos de resistência registrados) (SOUSA et al., 2019).

**Figura 6.** Estruturas do 6-bromo-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-carbazol e o 5-cloro-2,3-dimetil-1*H*-indol. As estruturas em questão apresentam CL<sub>50</sub> de 1,5 µg/mL (5,88 µM) e 3,6 µg/mL (19,91 µM), respectivamente.

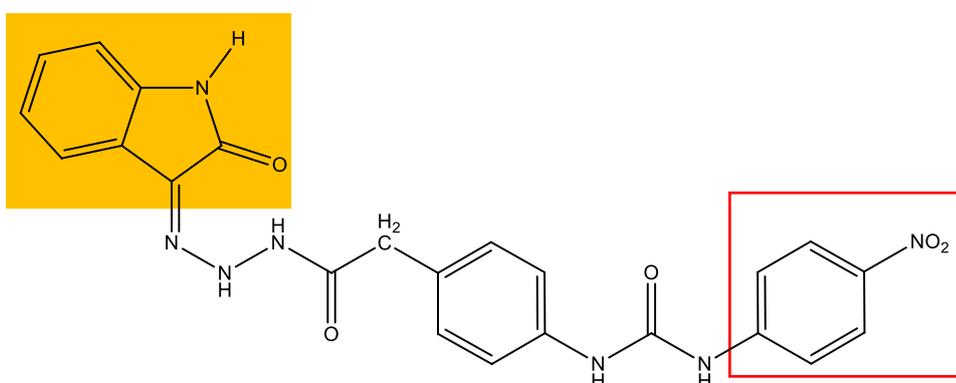


Fonte: (SOUSA et al., 2019).

A isatina (1*H*-indol-2,3-diona), tal como o indol, ocorre naturalmente em plantas, frutas, animais, e humanos. Logo, essa molécula possui diversas atividades biológicas (PAKRAVAN et al., 2013; PANTOURIS; LOUDON-GRIFFITHS; MOWAT, 2016). Nesse sentido, derivados da isatina hidrazida-hidrazona são embriotóxicos para larvas do *Ae.*

*aegypti*. Dentre estes o mais promissor para os bioensaios larvais foi o 1-(4-nitrofenil)-3-(4-{2-oxo-2-[2-(2-oxo-1,2-dihidro-3*H*-indol-3-ilideno)hidrazinil]etil}fenil)ureia (**Figura 7**). Essa molécula que apresenta um anel nitrofenil (vermelho) demonstrou CL<sub>50</sub> de 30,5 µg/mL (64,46 µM) e CL<sub>90</sub> 95,9 µg/mL (202,69 µM) (AKDAG et al., 2014). Todavia, o potencial tóxico para larvas ainda é inferior ao de toxinas da bactéria Bti (MELO; SOCCOL; SOCCOL, 2016).

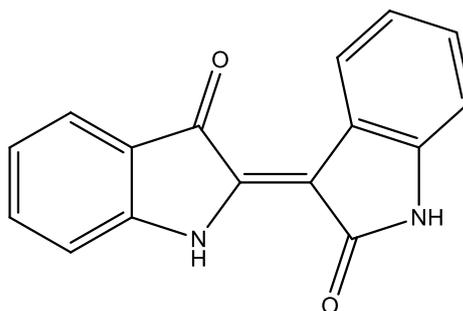
**Figura 7.** Estrutura da 1-(4-nitrofenil)-3-(4-{2-oxo-2-[2-(2-oxo-1,2-dihidro-3*H*-indol-3-ilideno)hidrazinil]etil}fenil)ureia, apresenta CL<sub>50</sub> de 30,5 µg/mL (64,46 µM) e CL<sub>90</sub> 95,9 µg/mL (202,69 µM) contra larvas de *Ae. aegypti*. Os grupos destacados em amarelo (isatina) e vermelho (anel nitrofenil).



Fonte: (AKDAG et al., 2014).

Além da estrutura que apresenta o nitrofenil (**Figura 7**) outros derivados da isatina também apresentam toxicidade frente ao *Ae. aegypti*, tanto na fase de ovo quanto no estágio de larva. Ensaios realizados com a indirubina (presente naturalmente nas folhas de *Indigofera suffruticosa Mill*) (**Figura 8**) produzida através da oxidação e dimerização do indoxil com a isatina apresentaram-se como produtos de destaque no teste embriotóxico contra larvas de *Ae. aegypti*, visto que, nos ensaios realizados nenhuma eclosão de ovos foi observada (SILVA et al., 2021; VIEIRA, 2011).

**Figura 8.** Estrutura da indirubina, produzida através da oxidação e dimerização do indoxil com a isatina



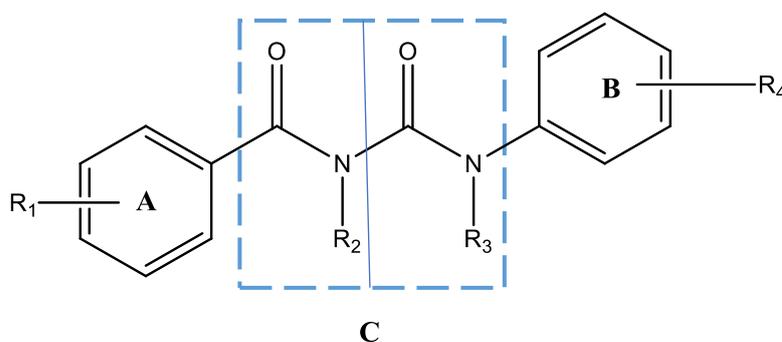
Adicionalmente, os testes demonstraram embriotoxicidade específica e redução do desenvolvimento das larvas que foram tratadas com a substância. Na concentração de 250 µg/mL não houve eclosão de ovos e algumas larvas que conseguiram se desenvolver até o estágio L2 possuíam deformações, acentuadamente no envelope peritrófico (SILVA et al., 2021; VIEIRA, 2011). A atividade de outro análogo da isatina também foi testado contra *Periplaneta americana* (barata) comparando seus resultados com a cipermetrina. Os resultados indicaram que análogos da isatina tem melhor atividade inseticida (valor de *knockdown* (kd) 3-5 min) enquanto a cipermetrina possui kd 5-7 minutos (JAIN, RENUKA; SHARMA, KANTI; KUMAR, 2013).

Em alternativa aos derivados indólicos, ainda baseando-se na relação entre a estrutura química e possíveis atividades contra insetos, derivados da quitina são substâncias de interesse. Visto que, com o aumento da resistência aos inseticidas de ação rápida (neurotóxicos) houve uma busca por inseticidas com mecanismo de ação diferente destes como os reguladores de crescimento de insetos (RCIs chamados “inseticidas alternativos”). Os inibidores da síntese de quitina (ISQs) diflubenzuron e novaluron têm sido utilizados como produtos com natureza química distinta para conter o vetor do *Ae. aegypti* (FARNESI et al., 2012).

Nesse sentido, alguns reguladores de crescimento de insetos atuam na fase específica de crescimento (fase larval) contra o artrópode alvo, promovendo anormalidades no crescimento e causando baixa sobrevivência ao inseto, sendo declarados também mais seguros para organismos não alvos que os pesticidas usuais (PANMEI et al., 2020). Assim, a biossíntese e degradação de quitina (polissacarídeo composto por resíduos de *N*-acetilglicosamina) tem papel fundamental na muda de insetos, sendo constituinte principalmente da cutícula tegumentar e matriz peritrófica de larvas e adultos e na cutícula serosa de ovos de mosquitos. Em testes de atividade inseticida, as substâncias que afetam a produção de quitina reduzem o crescimento dos artrópodes, sendo posteriormente letais. Estudos com lagartas (*Pieris brassicae*), moscas domésticas (*Musca domestica*), gafanhoto do deserto (*Schistocerca gregaria*), larvas de *Ae. aegypti* e mariposas da subfamília *Lymantriinae* (*Orgyia pseudotsugata*) demonstraram que larvas tratadas com essas substâncias possuíam falhas na membrana peritrófica que reveste o epitélio intestinal (SINGH et al., 2020; SUN et al., 2015).

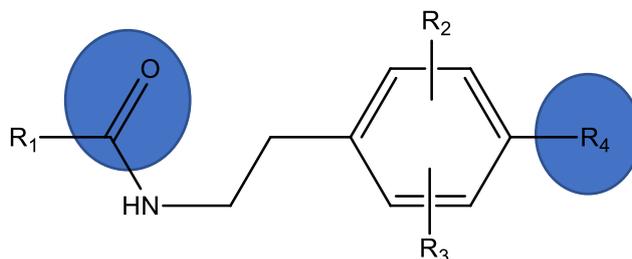
Com efeito disso, analisando detalhadamente a estrutura regular das benzoilfenilureias (BPU- classe dos inibidores da síntese de quitina mais comumente utilizados) (**Figura 9**), no modelo bipartido (**Figura 10**) e suas ligações com o sítio ativo de artrópodes, é possível observar que a estrutura regular pode ser separada em três partes: o anel benzoíla (A), anel anilina (B) e ponte de ureia (C). A parte C é imprescindível para a atividade inseticida dos BPUs, sendo considerado o grupo funcional da ligação com a proteína alvo. Por isso, Vila-Carriles *et al.* 2007 examinaram a possibilidade de bipartir essa porção (**Figura 10**) obtendo resultados de aumento na potência dos compostos em 100-1000 vezes, 50  $\mu\text{M}$  *versus* 0,5 nM (VILA-CARRILES *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2015).

**Figura 9.** Estrutura regular das benzoiluréias dividida em três partes: o anel benzoíla (A), anel anilina (B) e ponte de ureia (C). A porção C (destacada com pontilhado) é imprescindível para a atividade inseticida dos BPUs.



Fonte: (VILA-CARRILES *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2015).

**Figura 10.** Estrutura no modelo bipartido das benzoiluréias proposto por Vila-Carriles *et al.* 2007 obtendo resultados de aumento na potência dos compostos em 100-1000 vezes, 50  $\mu\text{M}$  *versus* 0,5 nM

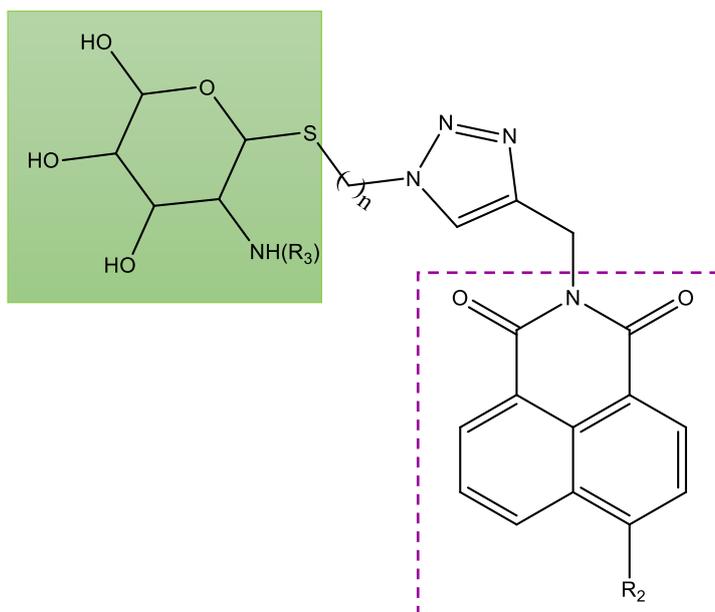


Fonte: (VILA-CARRILES *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2015).

Já Shen *et al.* 2015 propuseram a adição de grupos glicosilados (verde) na estrutura das naftalimidazóis (roxo) (**Figura 11**) como possíveis inibidores da enzima GH20  $\beta$ -N-acetilhexosaminidase OfHEX1, importante na degradação de cutículas velhas em larvas de *Ostrinia furcanalis* obtendo maior seletividade inibitória para esta enzima (SHEN, SHENGQIANG; DONG, 2019). Portanto, alterando a estrutura básica da quitina (**Figura 3**)

com a introdução de estruturas semelhantes ao modelo bipartido dos BPU é possível projetar novas estruturas favoráveis a modificação natural da síntese de quitina, que possuam estrutura química diversa das benzoilfenilureias e sejam similares a unidades da quitina investigando, dessa maneira, alternativas sustentáveis e ecológicas (SUN; LIU, 2015; SINGH, 2021).

**Figura 11.** Estrutura das naftalimidaz (roxo) glicosiladas (verde)



Fonte: (SUN; LIU, 2015)

### ***2.7 Derivados N-tosilados e acetilados do indol, isatina e da quitina como potenciais agentes larvicidas***

Considerando as restritas pesquisas e a relação fisiológica de derivados do indol, da isatina e da quitina contra larvas do *Ae. aegypti*, é de interesse o estudo por novos protótipos baseados em suas respectivas estruturas. Uma nova leva desses precursores ainda pouco explorada quanto ao potencial larvicida em *Ae. aegypti* é de derivados N-tosilados e acetilados do indol, da isatina e da quitina. Entretanto, algumas atividades biológicas já foram estudadas sobre esses compostos.

Segundo Pagliero *et al.* a associação de fragmentos de estruturas com atividades biológicas comprovadas e de presença constante em moléculas bioativas, também ditas “privilegiadas”, pode beneficiar a geração de diferentes alvos biológicos por meio da diversificação de seus grupos funcionais. Logo, utilizando dessa estratégia, derivados com o grupo farmacóforo do indol, bem como da indolina (saturação da dupla ligação entre 2-3 do anel indólico) são bases imprescindíveis de variadas atividades biológicas que incluem

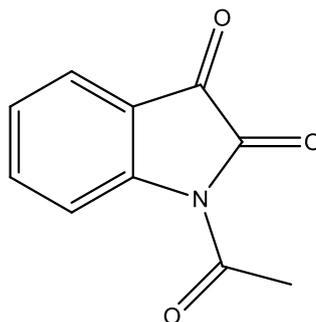
antivirais, antiparasitários, antimicrobianos e antifúngicos. Somado a isso, a utilização de fragmentos benzenossulfonil e orto (C-2) substituição de grupamentos nitro (NO<sub>2</sub>) em núcleos indólicos foi vista como benéfica para potenciais inibidores de Kir1 em *Ae. aegypti* (Ae Kir1) (ARETZ et al., 2019; J. PAGLIERO et al., 2011; PAGLIERO et al., 2017a).

Não obstante, estudos com o *N*-tosil indol corroboram que o mesmo apresenta características alvo para enzimas hidrolíticas, no desenvolvimento de pesticidas para uso em plantações (GANGE, 1995) e são potentes derivados indólicos com ação larvicida frente o *Ae. aegypti*, possuindo uma CL<sub>50</sub> de 0,244 ppm com um intervalo de confiança de 95% variando entre 0,212 a 0,280 ppm (MACEDO, 2015). Além disso, demonstram exercer seletividade ambiental entre organismo alvo e não alvo, pois são atóxicos para náuplios de *Artemia sp.*, uma espécie não alvo essencial para o ecossistema aquático (NUNES, 2019).

É importante salientar que, o diflubenzuron, larvicida usado em programas de controle do vetor, mostrou-se letal para náuplios de *Artemia sp.* por inibir seu desenvolvimento (GARTENSTEIN; QUINNELL; LARKUM, 2006).

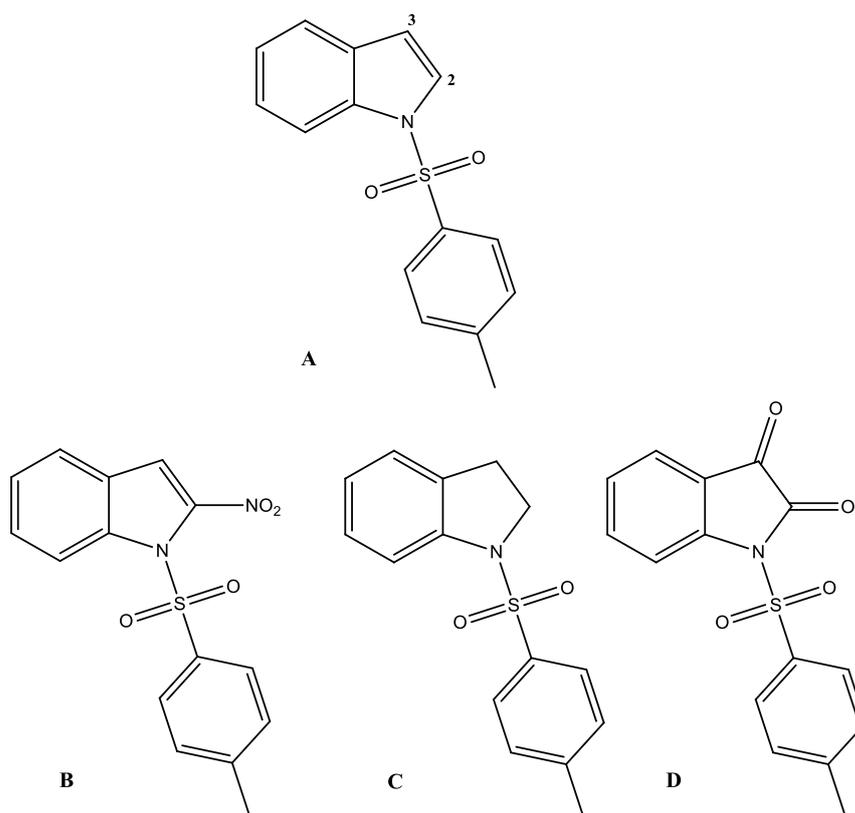
Para derivados da isatina, visto o seu valor biológico como importante fator para compostos bioativos demonstrando atividade bloqueadora de caspase, antibacteriana, antiviral (EL-FAHAM et al., 2015). Os análogos *N*-1 substituídos proporcionaram a formação de moléculas com atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) enzima corismato redutase (CM) com compostos ativos como: *N*-acil e *N*-acetil (**Figura 12**) dos quais este último foi ligeiramente mais potente do que a isatina enquanto o derivado acil volumoso teve sua a atividade reduzida (JEANKUMAR et al., 2014). Outra atividade demonstrada para derivados *N*-1 substituídos é contra Rinovirus Humano (HRV) e são eficazes inibidores da protease do tipo SARS Corona Vírus (SARS CoV 3C) protease do tipo 3C (ZHOU et al., 2006).

**Figura 12.** Estrutura da *N*-acetil isatina



Nesse contexto, além das relações levantadas entre derivados do indol e da isatina contra o *Ae. aegypti*, e incentivados pelos resultados do *N*-tosil indol (**Figura 13 – A**) em que há estudos de sua ação sobre a via de metabolismo do triptofano, a qual é considerada uma importante via de desintoxicação em mosquitos, especialmente durante as fases larvais, corroboram para a projeção destes resultados para derivados como, 2-nitro-*N*-tosil-indol (**Figura 13 – B**), *N*-tosil indolina (**Figura 13 – C**) e *N*-tosil isatina (**Figura 13 – D**) sobre a via do metabolismo do aminoácido em *Ae. aegypti*. Visto que, o principal eixo de metabolismo desse aminoácido é da via das quineruninas há ferramentas que sugerem a possibilidade da ação desses derivados, no artrópode, sobre receptores que têm análogos do triptofano como estimuladores (HUBBARD; MURRAY; PERDEW, 2015; LEE, 2015; HAN, 2007).

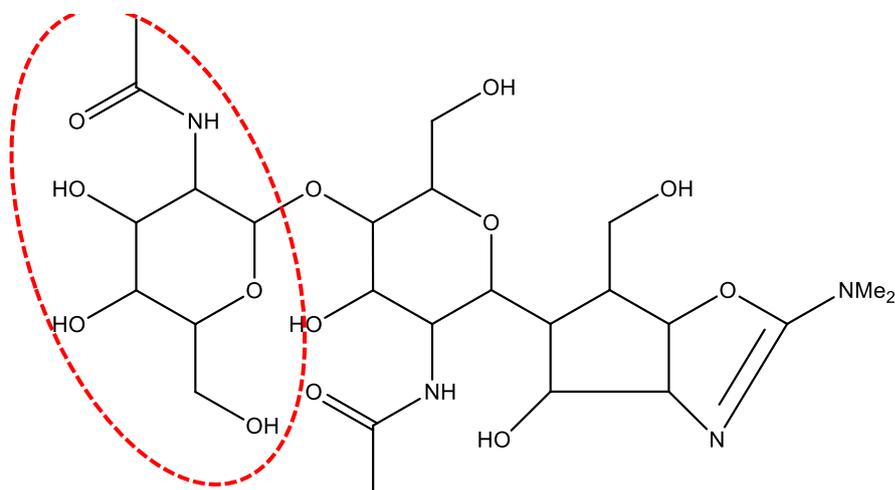
**Figura 13.** Estruturas do *N*-tosil indol (**A**) com ação larvicida frente o *Ae. aegypti*, com uma  $CL_{50}$  de 0,244 ppm e outros derivados tosilados como 2-nitro-*N*-tosil-indol (**B**), *N*-tosil indolina (**C**) e *N*-tosil isatina (**D**). Estruturas com modificações apenas nos carbonos C-2 e C-3 do anel indólico



O pseudotrissacarídeo alosamidina (**Figura 14**) é um potente inibidor da família 18 da quitinase e demonstra atividades biológicas contra insetos, fungos e o ciclo de vida do *Plasmodium falciparum* (HUANG, 2012). Fragmentando sua estrutura, encontra-se o 2-

(acetilamino)-2-deoxi-*D*-glicopiranosose, também denominado *N*-acetil-*D*-glicosamina (**Figura 14**, porção pontilhada) uma unidade do polissacarídeo quitina.

**Figura 14.** Estrutura da alosamidina e em pontilhado vermelho encontra-se o 2-(acetilamino)-2-deoxi-*D*-Glicopiranosose, também denominado *N*-acetil-*D*-glicosamina uma unidade do polissacarídeo quitina.

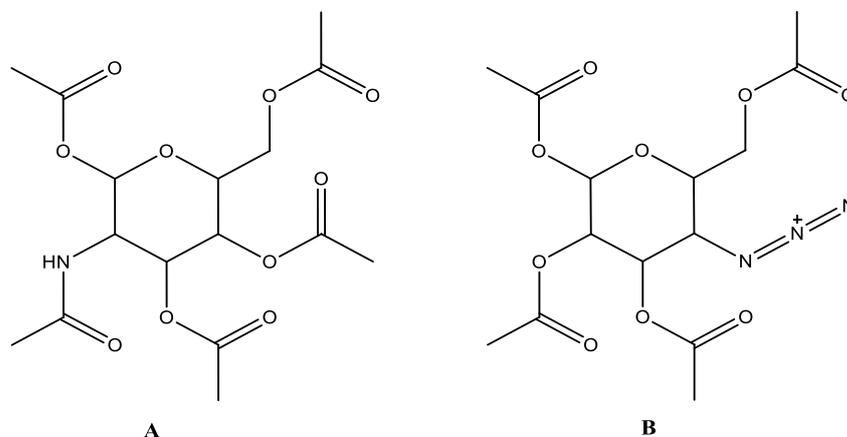


Fonte: HUANG, 2012.

As reações envolvendo O-acetilação em bactérias gram-positivas estão associadas à resistência contra lisozima e autolisinas endógenas. A resistência à hidrólise da parede celular de algumas cepas mutantes ocorre pela inibição da *N*-acetilglicosaminidase (BERNARD et al., 2011). Além disso, as estruturas apresentam maior hidrofobicidade e tem grande potencial para uso no desenvolvimento de nova terapêutica para a osteoporose pós-menopausa (WANG et al., 2020).

Outros derivados de estruturas de uma unidade da quitina acetilada, tais como 2-(acetilamino)-2-deoxi-,1,3,4,6-tetraacetato e 4-azido-4-deoxi-,1,2,3,6-tetraacetato (**Figura 15 A e B**, respectivamente), possuem fragmentos de novos análogos do modelo bipartido do grupo das benzoilfenilureias (Reguladores de crescimento utilizados contra larvas de *Ae. aegypti*). Essa propriedade pode ser explorada no desenvolvimento de novos protótipos larvicidas para *Ae. aegypti* e pode também beneficiar a geração de diferentes alvos biológicos por meio da diversificação de seus grupos funcionais (J. PAGLIERO et al., 2011; PAGLIERO et al., 2017a; SUN et al., 2015; WANG et al., 2020).

**Figura 15.** Estruturas do 2-(acetilamino)-2-deoxi-,1,3,4,6-tetraacetato (A) e 4-azido-4-deoxi-,1,2,3,6-tetraacetato (B)



### 2.8 Química do indol, isatina, quitina e seus derivados sulfonilados e acetilados

O indol é uma estrutura heterocíclica rica em elétrons devido à sua reatividade como um nucleófilo (na posição C-3) em grande parte das reações. Essa nucleofilicidade intrínseca pode ser revertida pela instalação de grupos retiradores de elétrons em C-3, N-1 ou C-2. Nestas duas últimas, no entanto, em grau inferior à posição C-3 (SANTHINI, 2017; OKAUCHI et al., 2000; OTTONI et al., 2001; SUNDBERG, 1970). Há possibilidade também da redução do anel de cinco membros obtida a partir do indol como alvo de grupos de saída em reações de proteção do nitrogênio indólico (BACHMANN, 2018).

A isatina, 1*H*-indol-2,3-diona, é um composto heterocíclico de significativa importância na química medicinal. Apresenta variados centros de reação e é apta a participar de diversos tipos de reações (PARKRAVAN, 2013). A potência dos derivados de isatina depende de suas reações especialmente em três posições (N-1, C-2 e C-3) (RAJARSHI NATH). A redução de isatinas N-substituídas com grupos retiradores de elétrons no nitrogênio também pode fornecer novos alvos promissores para estudos de relação estrutura atividade (CHUNG; KIM; KIM, 2003).

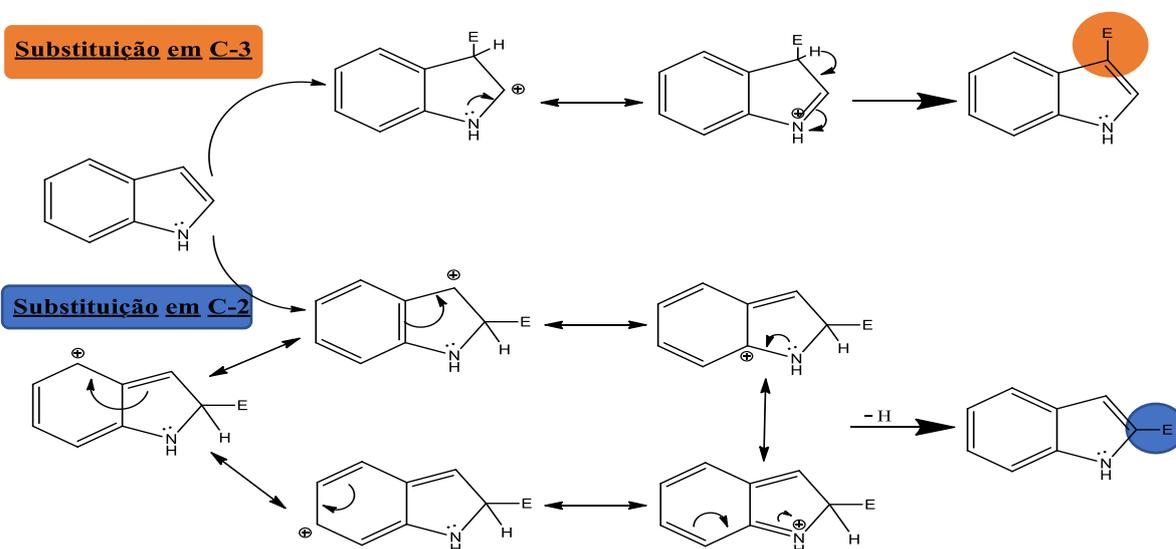
Estruturas derivadas de unidades da quitina, como a N-acetilglicosamina podem sofrer diversas modificações químicas devido a peculiaridade da sua estrutura molecular. Logo, a molécula é bastante reativa, com reações que ocorrem em condições suaves como desacetilação, acilação, O-acetilação, O- e N-ftalação, O-carboximetilação, oxidação (CAMARGO; CAMARGO, 2019; GARCIA et al., 2008; SHARP, 2013).

### 2.8.1 Indol

O indol ou benzo [b] pirrol é um composto orgânico heteroaromático planar com fórmula  $C_8H_7N$  e estrutura bicíclica resultante da fusão do anel benzeno ao anel de cinco membros do pirrol contendo nitrogênio (FERNANDES, 2017; KUMARI; SINGH, 2019). Quimicamente, o indol é uma base muito fraca. Isto ocorre devido à deslocalização do par de elétrons no nitrogênio para o sistema eletrônico  $\pi$  que contribui para a ressonância interna do anel indólico. Assim, o par de elétrons livres não está disponível para protonação como ocorre normalmente com aminas. No entanto, é observada alta densidade eletrônica em C-3, em detrimento aos elétrons  $\pi$  localizados entre C-3 e C-2 e a retenção de aromaticidade, sendo termodinamicamente mais estável (SUNDBERG, 1970; RAMESCH D. et al., 2011).

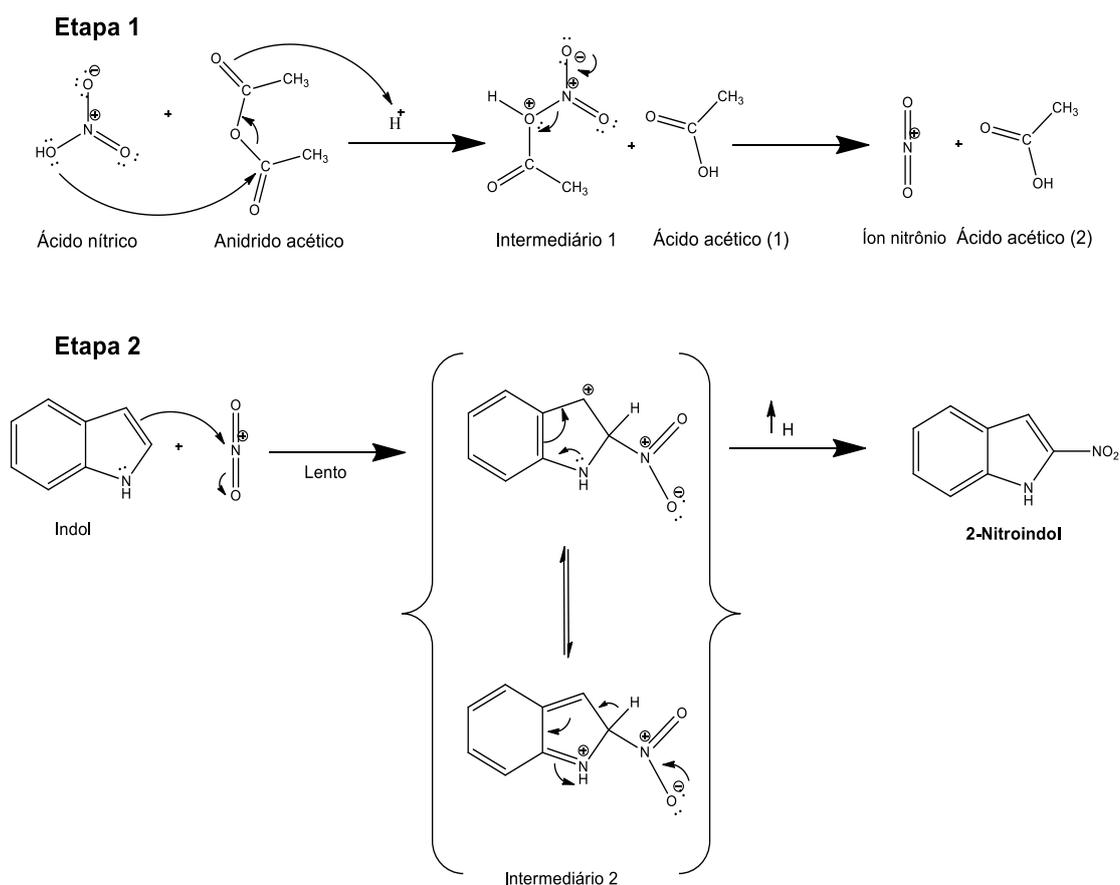
Logo, as reações envolvendo o indol são preferencialmente facilitadas na posição  $\beta$  (carbono 3) graças a estabilidade extra do cátion gerado no intermediário (**Esquema 1**), visto que na posição  $\beta$  a aromaticidade é melhor distribuída no anel de benzeno estabilizando melhor o cátion. Todavia, considerando a fácil obtenção dos 3-nitroindóis, por exemplo, através de nitração eletrofílica de indóis a síntese de 2-nitroindóis é menos direta, pois contribui menos para estruturas de ressonância, porém sendo uma reação consideravelmente mais complexa quando comparada a de C-3, ainda ocorre (ROY, 2005).

**Esquema 1:** Descrição simples das estruturas de ressonância mais prevalentes no anel do indol quando substituído em C-3 (laranja) e C-2 (azul). O principal contribuidor da ressonância é aquele em que a carga positiva é carregada pelo nitrogênio. Substituído em C-3 (laranja): é o mais estável termodinamicamente, retendo a aromaticidade total do benzeno. Substituído em C-2 (azul): possui deslocalização da carga sobre o nitrogênio e o carbono- $\alpha$  perturbando a aromaticidade



Tendo como base a primeira etapa de uma reação de substituição eletrofílica em C-2 para o indol desprotegido em *N* (**Esquema 2**), tem-se na primeira etapa da reação, a produção de uma mistura reacional de ácido nítrico – HNO<sub>3</sub> e anidrido acético - (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O a uma temperatura de -10°C pela qual inicialmente ocorre um ataque da hidroxila do ácido nítrico ao carbono polarizado do anidrido acético, conseqüente ataque ao próton fornecido pelo ácido formado no meio reacional com produção de HNO<sub>3</sub> acetilado e posterior dissociação do mesmo formando o íon nitrônio e duas moléculas de ácido acético. Na segunda etapa, o íon nitrônio (eletrófilo na nitração) reage com indol (ataque da nuvem π ao eletrófilo) para formar o íon do mesmo que é estabilizado por ressonância seguido da perda do próton no indol e restauração da eletrofilicidade da estrutura tendo por fim a formação do 2-nitroindol (KNEETEMAN et al., 2015).

**Esquema 2:** Mecanismo da reação de substituição eletrofílica do indol na posição C-2. Etapa 1: Formação do íon nitrônio. Etapa 2: Ataque eletrofílico sofrido pelo indol com posterior formação dos intermediários 2 e 2-nitroindol.



A posição *N*-1 do indol também é passível de ataque eletrofílico, porém, ainda em grau inferior à posição C-3. Nessas reações, o indol tende a comportar-se como nucleófilo fraco, passível, portanto, de sofrer ataque eletrofílico na presença de eletrólitos fortes

(OKAUCHI et al., 2000; OTTONI et al., 2001; SUNDBERG, 1970). Logo, conhecendo a atividade larvicida em *Ae. aegypti* do *N*-tosil indol anteriormente sintetizado no Laboratório de Química Farmacêutica – LQF da Universidade Federal de Sergipe que demonstrou aumento da atividade quando comparado a indol não substituído (MACEDO, 2015).

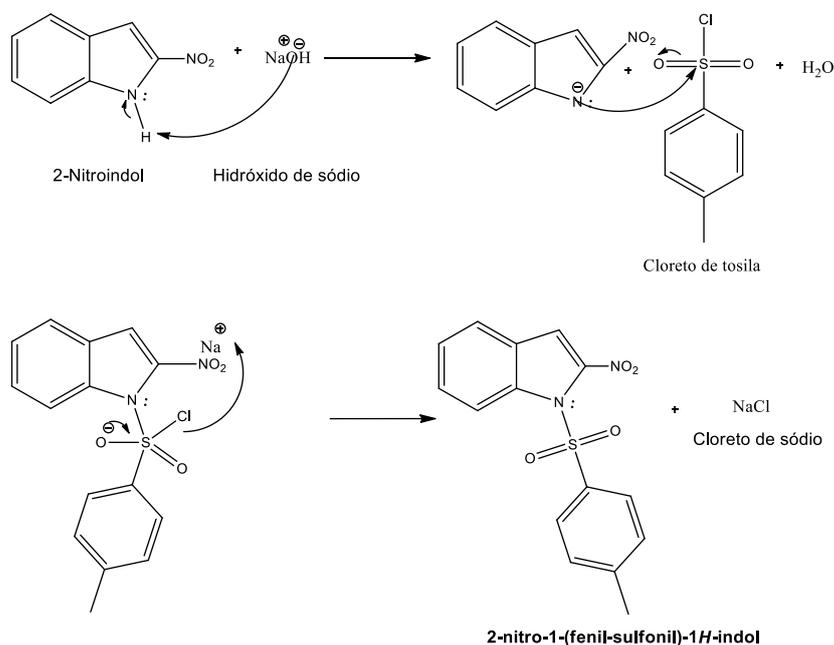
A introdução do grupamento nitro em C-2 pode alterar a atividade desempenhada pelo *N*-tosil indol visto modificações importantes no caráter eletrônico da estrutura. É importante salientar que alguns estudos cristalográficos de comparação entre 2-nitro e 3-nitro indóis *N*-sulfonilados demonstram que o grupo nitro em C-2 não é coplanar com o anel indólico e o ângulo entre os planos do anel do indol e o anel sulfonil é equivalente a 68,6°. Em comparação, esse ângulo no 3-nitro-1-(fenil-sulfonil)-1*H*-indol é 83,9° e 91,72° em 1-(fenilsulfonil)-indol. O grupo sulfonil é torcido para longe do nitrogrupo, indicando repulsão entre os dois (ROY; GRIBBLE; JASINSKI, 2007). Contudo, Pagliero e colaboradores encontraram evidências para uma série de derivados sulfonilados do indol contra *L. donovani* que grupos retiradores de elétrons (NO<sub>2</sub>) na posição *orto* demonstraram quase a mesma atividade inibitória dos análogos *para* e *meta*. Este comportamento incomum pode ser motivado devido as propriedades lipofílicas desses substituintes, sugerindo que a potência contra *L. donovani* depende de uma combinação de efeitos eletrônicos e lipofílicos (PAGLIERO et al., 2017a).

Essa última propriedade também é explorada no desenvolvimento de novos protótipos larvicidas para *Ae. aegypti* de diferentes classes, que quando modificados pela introdução de grupos lipofílicos, apresentam um aumento da atividade larvicida (GANGE, 1995; LUCIA; ZERBA; MASUH, 2013; NUNES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2014; SANTOS et al., 2011). Logo, a reação de 2-nitroindol com cloreto de tosila (Cloreto de 4-toluenossulfonila) em condições adequadas fornece 2-nitroindol tosilado, também denominado 2-nitro-1-(fenil-sulfonil)-1*H*-indol. A obtenção desse é possível através do tratamento de indol com NaOH e cloreto de benziltriethylamônio (TEBA) (CHE et al., 2013; XU; WANG, 2010b).

No **Esquema 3** é ilustrado o mecanismo de síntese de 2-nitro-1-(fenil-sulfonil)-1*H*-indol através da utilização de NaOH. É proposto que inicialmente ocorre um ataque da base de Lewis NaOH ao 2-nitroindol em *N*-1. Desse modo, o oxigênio da base doa um par de elétrons para o hidrogênio do nitroindol em *N*-1 (ácido de Lewis). Logo, é formado um complexo iônico entre Na<sup>+</sup> e indol ionizado com carga negativa localizada na posição *N*-1, que favorece ao aumento da nucleofilicidade dessa região no anel indólico. Como

consequência, é possível o ataque nucleofílico do indol ao grupo tosila do cloreto de tosila levando a formação de um complexo intermediário que é estabilizado por ressonância. A estabilização da estrutura é possivelmente garantida pela saída do cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e formação de 2-nitro-1-(fenil-sulfonyl)-1*H*-indol e cloreto de sódio (ROY; GRIBBLE; JASINSKI, 2007).

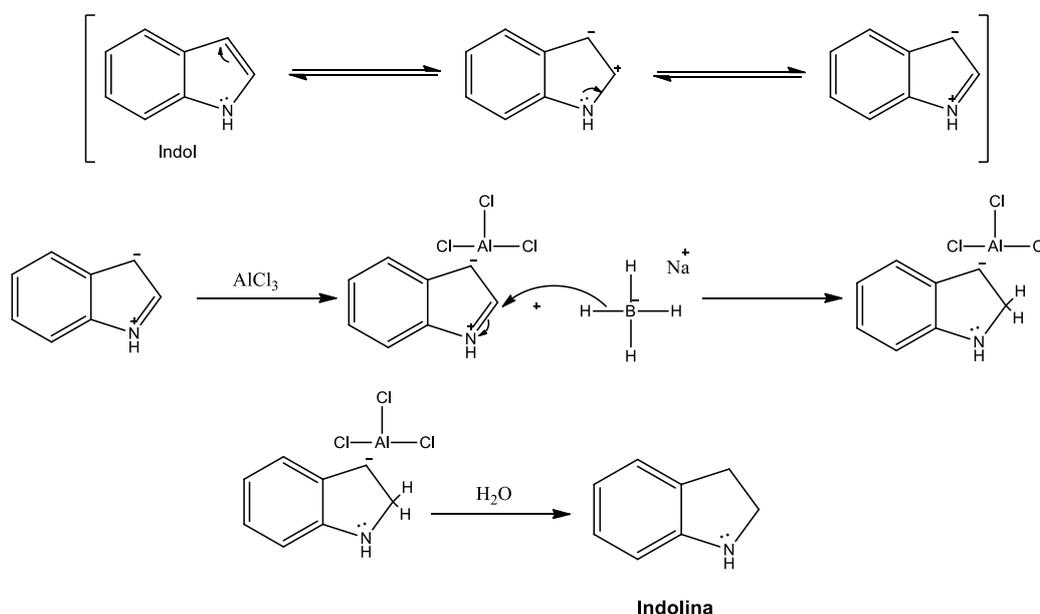
**Esquema 3:** Mecanismo de tosilção do 2-nitro indol. O NaOH participa como base de Lewis, enquanto o indol comporta-se como ácido de Lewis. Como resultado da primeira reação ácido-base, há formação de água por meio de ligação covalente coordenada entre a base e o próton. Além disso, é formado 2-nitro indol com maior potencial nucleofílico, possibilitando que o mesmo realize ataque nucleofílico ao cloreto de tosila e forme 2-nitro-1-(fenil-sulfonyl)-1*H*-indol.



Há ainda, a possibilidade de redução do indol nos carbonos 2 e 3 com síntese de 2,3 dihidro-1*H*-indol ou indolina (**Esquema 4**), assim, a ligação  $\pi$  é quebrada e duas novas ligações  $\sigma$  são formadas. Ao contrário do indol, a indolina não é uma amina aromática (ROBERT D. BEREMAN,\* DONALD HF. BAIRD, 1983)(ROBERT D. BEREMAN,\* DONALD HF. BAIRD, 1983). A redução da ligação dupla do indol com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) e cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) utilizando piridina como solvente foi estudada por Yosuo Kikugawa, 1977. A utilização desses três reagentes demonstra alta capacidade redutora específica para a ligação dupla 2-3 do anel indólico (KIKUGAWA, 1978). De forma geral, a síntese ocorre através da polarização do indol com o tricloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) (catalizador – ácido de Lewis) onde há presença de algumas estruturas de ressonância nas quais a carga negativa vai para o carbono 3 e a positiva para o carbono 2, seguido do maior contribuidor de ressonância no qual a carga positiva é carregada pelo nitrogênio (carregado positivamente tem quatro ligações, sendo um octeto completo). Logo, com a formação do

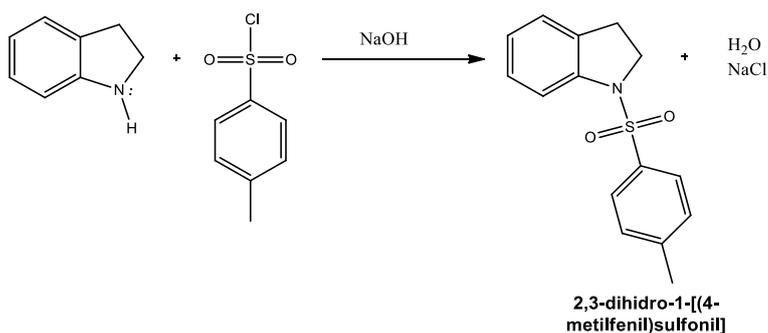
complexo entre o indol e o  $\text{AlCl}_3$  há um ataque nucleofílico pelo agente de transferência de hidreto ( $\text{NaBH}_4$ ) ao C-2. A formação primária do complexo seguido do ataque nucleofílico impede reações de autopolimerização do indol no C-3 e aumenta seletividade para formação da indolina. Por fim, há adição de água, quebra do complexo com o  $\text{AlCl}_3$  e síntese de indolina.

**Esquema 4:** Mecanismo de redução do indol estudado por Kikagawa et al. Primeiro ocorre a polimerização do indol com o tricloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), seguida da redução seletiva com o agente redutor ( $\text{NaBH}_4$ ) para a ligação dupla C-2-C-3 e síntese da indolina.



Diante disso, considerando o *N*-tosil indol como uma estrutura potente e a indolina com potencial de também ter atividade biológica, houve a intenção da introdução do grupo tosila no *N* da indolina (**Esquema 5**) sendo o mecanismo reacional similar ao citado no **Esquema 3** produzindo o 2,3-dihidro-1-[(4-metilfenil)sulfonyl].

**Esquema 5:** Esquema de tosilacão da indolina. Foi utilizado o mesmo sistema para tosilacão do 2-nitro indol. O  $\text{NaOH}$  participaria como base de Lewis. Há um ataque nucleofílico da indolina ao cloreto de tosila. Como resultado da reação é formado 2,3-dihidro-1-[(4-metilfenil)sulfonyl].



### 2.8.2 Isatina

A isatina (1-*H*-indol-2,3-diona) é uma estrutura heterocíclica provinda do núcleo indólico (FERNANDES, 2017). Consiste em um anel aromático de seis carbonos fundido a um anel pentagonal contendo nitrogênio como heteroátomo, com duas carbonilas, uma cetônica e uma amídica. O nitrogênio amídico passível de reações de *N*-alquilação e *N*-acilação, adição nucleofílica em C-3, oxidações e reduções quimiosseletivas e um anel aromático que pode passar por reações de substituição eletrofílica aromática (BACHMANN et al., 2018; SILVA, 2018).

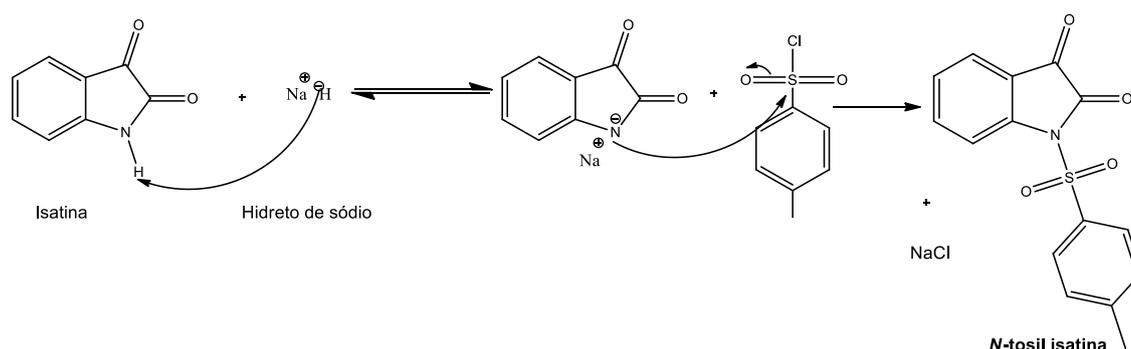
Através da análise dos comprimentos e ângulos de ligação pode-se observar que sua estrutura como um todo é planar, logo, os átomos de carbono, seus substituintes e o oxigênio são coplanares. O anel benzênico é levemente distorcido com distâncias de ligação C – C entre 1,39 Å e 1,41 Å e os ângulos de ligação entre 117,6° e 122,0° (MATOS et al., 2003). O carbono 2 ou  $\alpha$ , devido ao nitrogênio da amida aumenta a densidade de elétrons do anel aromático, fazendo com que este fique ativo para substituição eletrofílica nos pontos 5 e 7. Não obstante, o caráter básico e polar lhe confere a realização de ligações hidrogênio (SILVA et al., 2008).

Já o carbono 3, ou direcionamento  $\beta$ , posição ao qual está a carbonila cetônica da isatina indica o ponto eletrofílico com maior reatividade da molécula, pois a ligação é polarizada e deixa o C-3 com carga parcial positiva. Além disso, os pares de elétrons não compartilhados do oxigênio podem ser protonados ou atacar um ácido de Lewis. A protonação aumenta a eletrofilicidade, pois aumenta a deficiência eletrônica. O LUMO da carbonila é o orbital  $\pi$  antiligante, maior no carbono, explicando assim a eletrofilicidade. Logo, sob condições pontuais podem ser ocasionadas reações de adição e de combinação consecutivamente na existência de grupamentos nucleofílicos. Quando esses receptores de elétrons são estruturas do tipo semicarbazidas, tiossemicarbazidas, hidrazidas, seus derivados possuem alta similaridade estrutural com moléculas biológicas naturais, tornando-os compostos interessantes para síntese e busca por atividades não identificadas previamente (BACHMANN et al., 2018; SILVA, 2018).

O tratamento da isatina com cloreto de tosila em condições adequadas fornece *N*-tosil isatina, também denominado isatina tosilada ou 1-tosil-1*H*-indol-2,3-diona. A obtenção desse é possível através do tratamento da isatina com NaH e cloreto de tosila (TsCl) (CHE et al.,

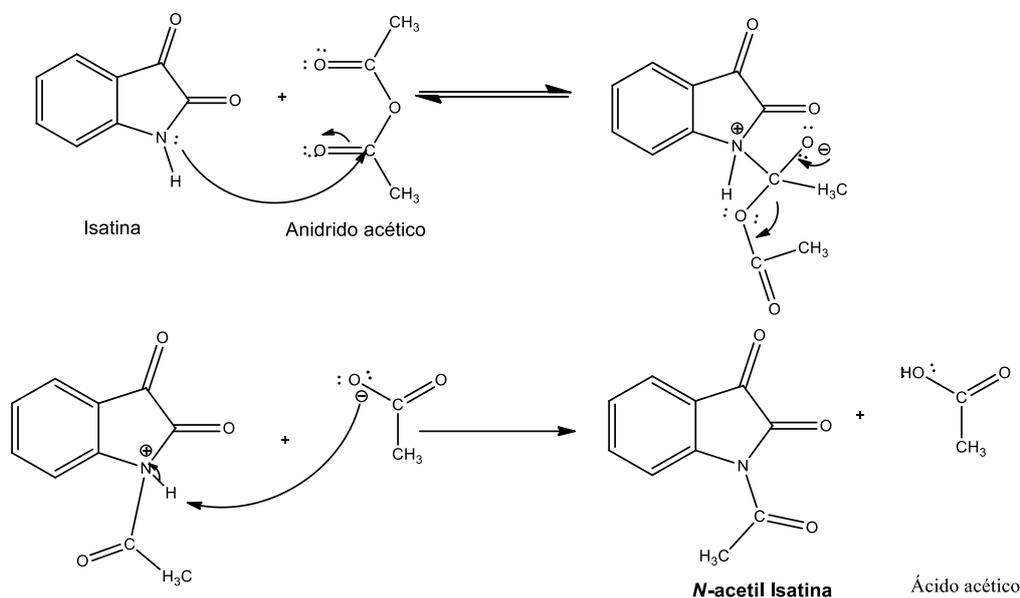
2013; XU; WANG, 2010b). No **esquema 6** é ilustrado o mecanismo de síntese da isatina tosilada através do tratamento com hidreto de sódio - NaH (base forte). É importante ressaltar que compostos inorgânicos binários como o NaH apresentam o hidrogênio como o elemento químico mais eletronegativo, sempre apresentando a carga -1 (WU et al., 2018). Assim, é proposto que inicialmente ocorre um ataque do NaH a isatina em *N*-1. Desse modo, há a formação de hidrogênio gasoso e de um complexo iônico entre  $\text{Na}^+$  e o *N*- da isatina ionizada com carga negativa localizada na posição *N*-1, que favorece o aumento da nucleofilicidade dessa região. Como consequência, é possível o ataque nucleofílico da isatina ao grupo tosil do cloreto de tosila levando a formação de um complexo intermediário que é estabilizado por ressonância. A estabilização da estrutura é supostamente garantida pela saída do cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e formação da *N*-tosilisatina e cloreto de sódio (ZHANG et al., 2017).

**Esquema 6:** Mecanismo de tosilação da isatina. A base forte (NaH) ataca *N*-1 da isatina, assim, há formação de hidrogênio gasoso por meio da ligação coordenada entre a base e o próton da isatina. Além disso, é formada isatina com maior potencial nucleofílico possibilitando que o mesmo realize ataque ao cloreto de tosila, produzindo *N*-tosil isatina.



Outras reações em *N*-1 também são bem aceitas pela estrutura da isatina, tal como *N*-acetilação, proporcionando a molécula um aumento do caráter lipofílico (**Esquema 7**). A reação descrita por Boraie e colaboradores ocorre apenas entre a isatina (Base de Lewis) e anidrido acético (Ácido de Lewis) sob refluxo. Inicialmente, ocorre um ataque nucleofílico do nitrogênio amídico da isatina sobre o carbono carbonílico do anidrido acético formando um complexo intermediário com saída do íon acetato seguido da desprotonação do *N*-1, produção de ácido acético e formação da amida denominada *N*-acetil isatina (AHMED T. A. BORAIE,\* EL SAYED H. EL TAMANY, IBRAHIM A. I. ALI, 2017).

**Esquema 7:** Mecanismo de *N*-acetilação da isatina. Inicialmente, ocorre um ataque nucleofílico do nitrogênio amídico da isatina sobre o carbono carbonílico do anidrido acético formando um complexo intermediário com saída do íon acetato seguido da desprotonação do *N*-1, produção de ácido acético e formação da amida.

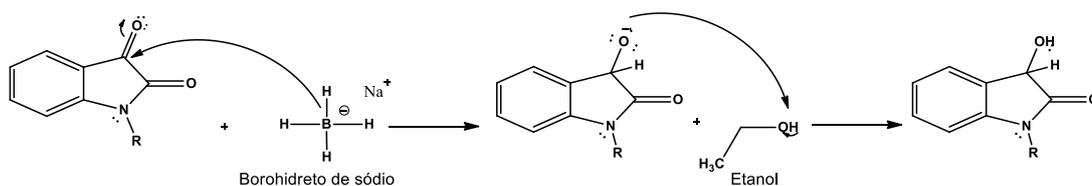


Embora o ciclopentano da isatina possa desempenhar um papel importante no processo de metabolismo da isatina e seus derivados em plantas, animais e insetos, ainda não se deu atenção suficiente ao estudo de modificações diretas na sua estrutura e suas propriedades (TISOVSKÝ et al., 2017). Portanto, a redução de isatinas *N*-substituídas (**Esquema 8**) utilizando álcool como solvente e excesso de  $\text{NaBH}_4$  são reações de interesse e podem ser facilmente concluídas (CHUNG; KIM; KIM, 2003). Porém, efeitos eletrônicos podem direcionar a reatividade, visto que amidas que participam de anéis possuem maior reatividade quando comparadas a amidas acíclicas (DE CARVALHO ALCÂNTARA; BARROSO; PILÓ-VELOSO, 2002).

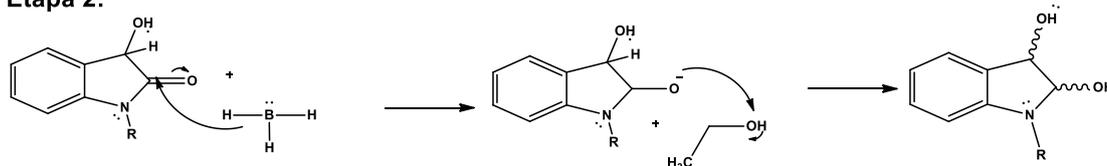
Através do estudo das reações envolvendo nucleófilos como aminas ou álcoois entre isatinas *N*-substituídas na presença de excesso de borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), pode-se conseguir ésteres ou amidas mandélicas, como compostos essenciais a temperatura ambiente. Como reação contínua, há possibilidade da redução de isatinas *N*-substituídas com grupos retiradores de hidrogênio com solventes alcoólicos e excesso do agente de transferência, obtendo assim, diálcoois e abertura do anel pentagonal da isatina (CHUNG; KIM; KIM, 2003).

**Esquema 8:** Mecanismo da redução da isatina *N*-substituída e abertura do ciclo pentano. **Etapa 1:** ataque nucleofílico ao C-3 (cetônico) pelo agente de transferência ( $\text{NaBH}_4$ ) seguida do recebimento de um próton do etanol ao ión alcoóxido formado. **Etapa 2:** redução da carbonila C-2 e formação do intermediário diol cíclico. **Etapa 3:** ataque do nucleófilo ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ) a hidroxila do C-2, posterior abertura do anel heterocíclico com formação de éster no C-2. **Etapa 4:** novo ataque nucleofílico ao C-2 (cetônico) pelo agente de transferência ( $\text{NaBH}_4$ ) seguido do recebimento de um próton do etanol ao segundo ión alcoóxido e formação de *N*-[2-(1,2-dihidroxi-etil)-fenil]-4-metil-acetamida e *N*-[2-(1,2-dihidroxi-etil)-fenil]-4-metil-benzenossulfanamida.

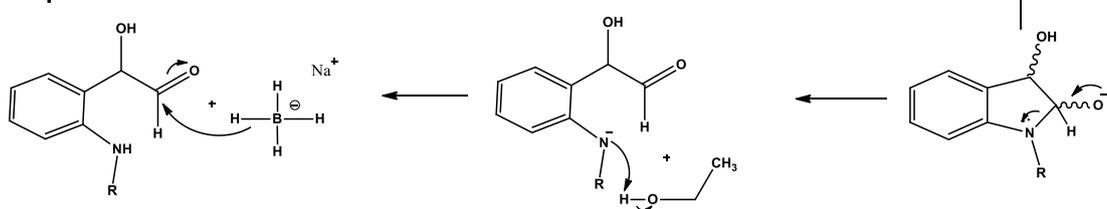
**Etapa 1:**



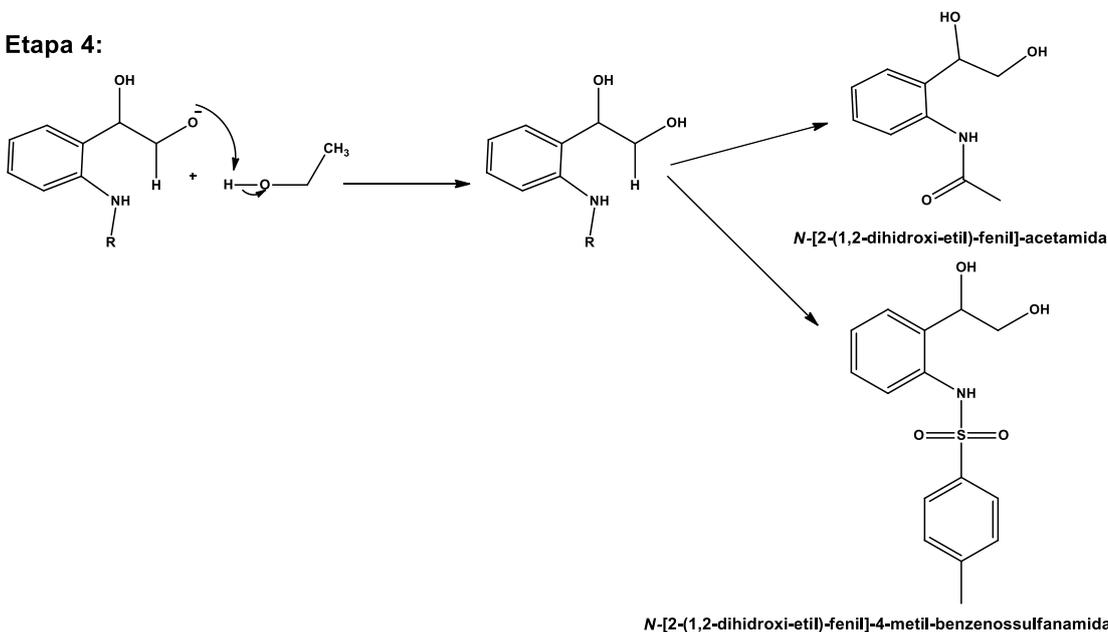
**Etapa 2:**



**Etapa 3:**



**Etapa 4:**



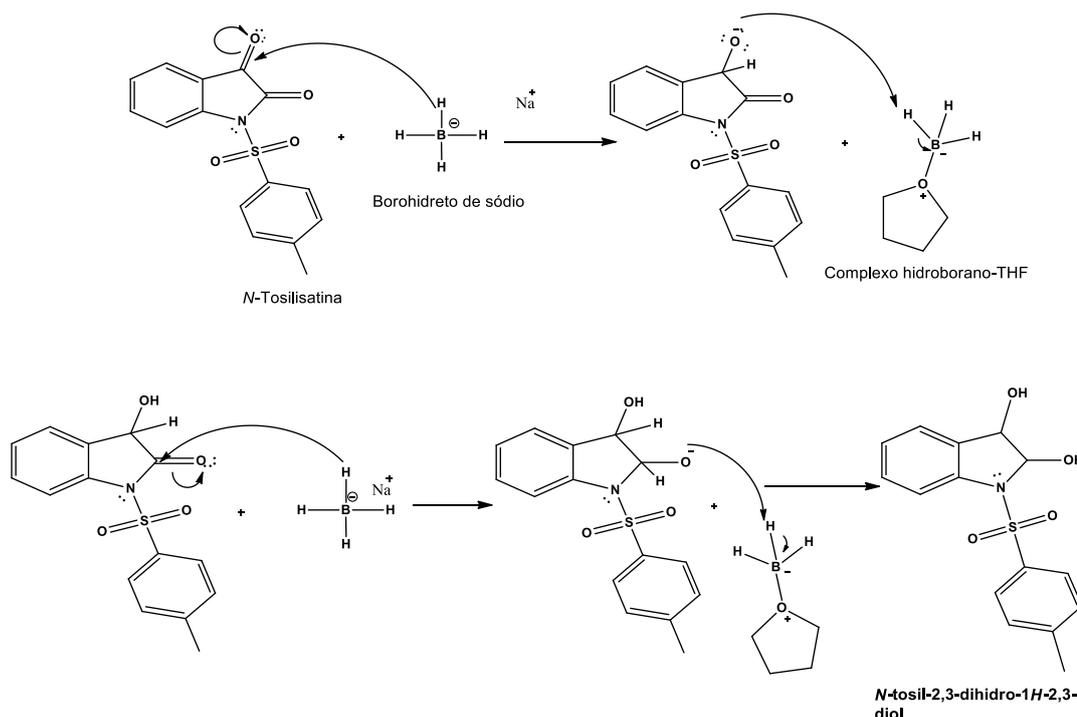
Nessa reação, inicialmente há um ataque nucleofílico através da interação entre o carbono  $\beta$  da isatina *N*-substituída com o agente redutor ( $\text{NaBH}_4$ ) e posterior retirada de um próton do etanol pelo  $\text{O}^-$  com três pares de elétrons livres. É importante salientar que reações envolvendo o borohidreto de sódio possuem diferenças quando relacionadas a outros reagentes doadores de hidreto dada a menor eletronegatividade ( $\Delta x$ ) da ligação B-H ( $\Delta x = 0,1$ ), sendo assim, um agente redutor mais seletivo (ALVES; VICTOR, 2010; DE CARVALHO ALCÂNTARA; BARROSO; PILÓ-VELOSO, 2002). Logo, seu mecanismo é controverso. Diversos autores apresentam estados de transição indicando apenas o ânion borohidreto –  $\text{BH}_4^-$  desprezando o cátion sódio -  $\text{Na}^+$ . Porém, alguns estudos demonstram a importância do cátion que quando complexado ao oxigênio carbonílico torna este carbono mais deficiente de elétrons, favorecendo a transferência do hidreto. Seguindo da formação de um alcoóxido transformando-se em mono-alcoxiboroidreto, que ainda é redutor podendo reduzir outras moléculas de carbonilado. Portanto, o mecanismo utilizado acima foi baseado nos livros de Química Orgânica mais empregados que são fundamentados no mecanismo proposto por Wigfield em que apenas o ânion borohidreto participa da etapa de redução, visto que não há consenso entre autores quanto ao poder da presença do cátion (ALVES; VICTOR, 2010).

A proximidade do nucleófilo ( $\text{NaBH}_4$ ) ao carbono eletrofílico (C-3 – carbono  $\beta$ ) da carbonila é mediado por interações dos orbitais dos reagentes envolvidos. Assim, os elétrons do nucleófilo que estão ocupados posicionados no orbital preenchido de mais alta energia (HOMO) e a relação entre o par de elétrons se dá com o orbital não ocupado de menor energia (LUMO) que está na estrutura carbonilada. Esta última é dita como um orbital antiligante  $\pi$ , o coeficiente desse orbital é maior no átomo de carbono, que indica o sítio eletrofílico. Dessa forma, o nucleófilo irá em direção ao átomo de carbono evitando a repulsão eletrônica com a região rica em elétrons, determinada pelo orbital  $\pi$  ao redor do átomo de oxigênio (ALVES; VICTOR, 2010).

Vale ressaltar ainda, que reações com a isatina *N*-substituída envolvendo diferentes solventes como tetraidrofurano (THF), podem orientar a formação de outros produtos (**Esquema 9**). Para a síntese de *N*-tosil-2,3-dihidro-1*H*-2,3-diol, é necessário a utilização de THF (éter cíclico) como solvente, visto que o etanol pode originar misturas de produtos (CHUNG; KIM; KIM, 2003). Após ataque a C-3 pode ser observado uma estabilização do

borano via pré-coordenação ao THF, favorecendo a produção seletiva do diol cíclico sem abertura do anel pentagonal (CHUNG, 2003).

**Esquema 9:** Mecanismo da redução da isatina *N*-substituída. Primeiro ocorre o ataque nucleofílico ao C-3 (cetônico) pelo agente de transferência ( $\text{NaBH}_4$ ) seguida da estabilização do borano via pré-coordenação ao THF, favorecendo a produção seletiva do diol cíclico sem abertura do anel pentagonal, com recebimento de um próton do complexo. E posterior redução da carbonila C-2 com formação do intermediário diol cíclico.



### 2.8.3 Derivados da quitina

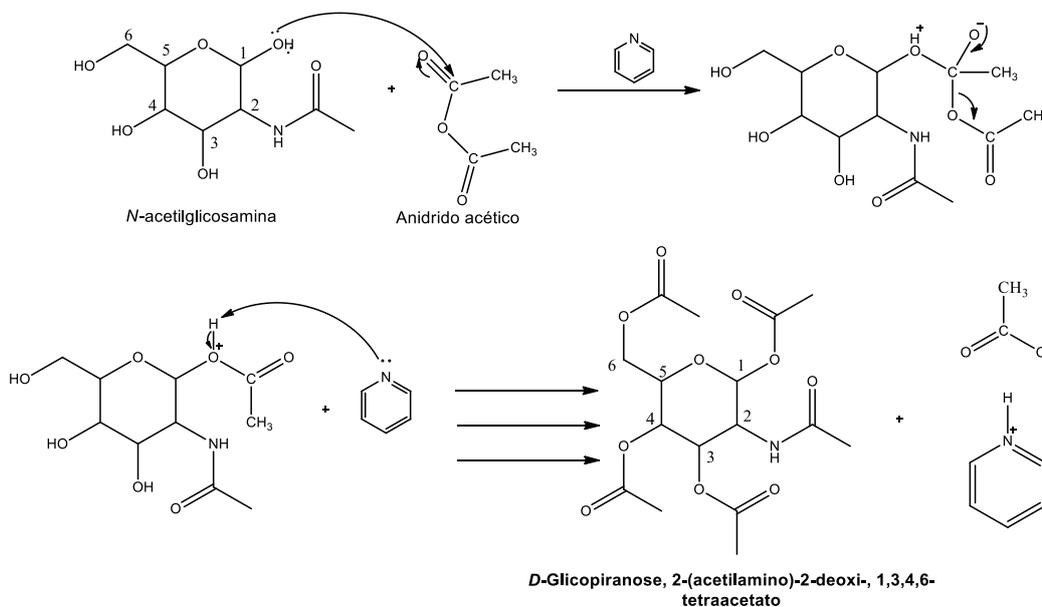
A quitina é um polímero formado por unidades de 2-acetilamino-2-desoxi-D-glicopirranose, o segundo polissacarídeo mais abundante do mundo (SHARP, 2013). Esse polímero possui excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade completa, além de baixa toxicidade para organismos não alvo (JAYAKUMAR et al., 2010). Quando completamente despolimerizado em unidades de *N*-acetilglicosamina pode sofrer diversas modificações químicas devido a peculiaridade da sua estrutura molecular que contém uma acetamida no carbono 2, quatro hidroxilas e um heteroátomo de oxigênio. Logo, a molécula é bastante reativa, com reações que ocorrem em condições suaves como desacetilação, acilação, O-acetilação, O- e N-ftalação, O-carboximetilação, oxidação (CAMARGO; CAMARGO, 2019; GARCIA et al., 2008; SHARP, 2013).

As reações envolvendo O-acetilação em bactérias gram-positivas estão associadas à resistência contra lisozima e autolisinas endógenas. A resistência à hidrólise da parede celular

de algumas cepas mutantes ocorre pela inibição da *N*-acetilglicosaminidase (BERNARD et al., 2011). Assim, uma vez que o metabolismo da quitina é crucial no desenvolvimento de insetos, a rígida regulação da degradação e síntese são objetivos importantes para o desenvolvimento de larvicidas (MERZENDORFER, 2013; MERZENDORFER; ZIMOC, 2003).

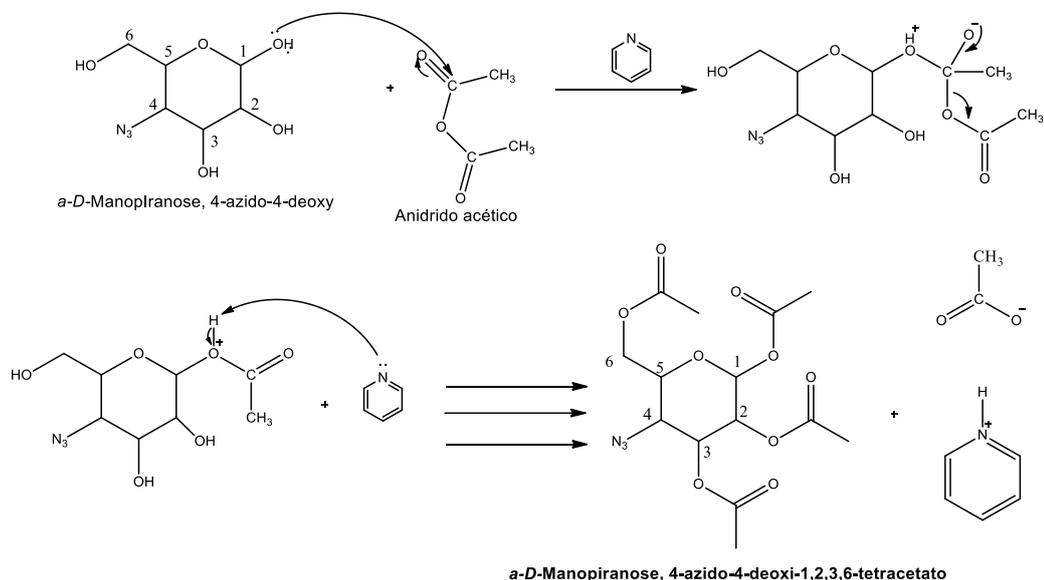
As O-acetilações (**Esquema 10**) de *N*-acetilglicosaminas proporcionam a molécula um aumento do caráter lipofílico. A reação descrita por Dang e colaboradores ocorre apenas entre a *N*-acetilglicosamina (Base de Lewis), anidrido acético (Ácido de Lewis) e piridina (aceptor de próton). Inicialmente, ocorre um ataque nucleofílico das hidroxilas da *N*-acetilglicosamina sobre o carbono carbonílico do anidrido acético formando um complexo intermediário com saída do íon acetato seguido de desprotonação ( $-^+OH$ ) pela piridina, síntese de D-glicopirranose, 2-(acetilamino)-2-deoxi-, 1,3,4,6-tetraacetato e ácido acético. Este último, sofre uma reação ácido-base com a piridina que possui fraca basicidade, e é usada na reação devido ao próton gerado eliminando o ácido no decorrer do processo (DANG et al., 2014).

**Esquema 10:** Mecanismo da tetra-acetilação da *N*-acetilglicosamina. Inicialmente ocorre um ataque nucleofílico das hidroxilas da *N*-acetilglicosamina sobre o carbono carbonílico do anidrido acético formando um complexo intermediário com saída do íon acetato seguido de desprotonação ( $-^+OH$ ) pela piridina, síntese de D-glicopirranose, 2-(acetilamino)-2-deoxi-, 1,3,4,6-tetraacetato, íon acetato e sal de piridina.



Há ainda, a tetra-acetilação do  $\alpha$ -D-Manopirranose, 4-azido-4-deoxi que ocorre da mesma forma que a reação da *N*-acetilglicosamina, no entanto, o aspecto químico do ânion azida ( $N_3^-$  – ânion poliatômico) confere a estrutura maior reatividade.

**Esquema 11:** Mecanismo da tetra-acetilação da  $\alpha$ -D-Manopirranose, 4-azido-4-deoxi. Inicialmente ocorre um ataque nucleofílico das hidroxilas da  $\alpha$ -D-Manopirranose, 4-azido-4-deoxi sobre o carbono carbonílico do anidrido acético formando um complexo intermediário com saída do íon acetato seguido de desprotonação ( $-H^+$ ) pelo íon acetato, síntese de  $\alpha$ -D-Manopirranose, 4-azido-4-deoxi-, 1,2,3,6-tetraacetato e ácido acético.



## 2.9 Toxicidade aguda em organismos não-alvo

Ensaio de toxicidade são necessários para estimar ou anteceder efeitos tóxicos sobre ecossistemas e a relativa toxicidade dos produtos para sistemas biológicos. Diversas espécies podem ser úteis como organismos testes, a exemplo de plantas, microcrustáceos *Artemia* sp. e peixes. As artemias são organismos muito utilizados em experimentos com ecologia, toxicologia, fisiologia, biologia molecular e genética por serem de fácil manipulação e distribuição abundante, permitem poucos gastos, alta reprodutibilidade ao bioensaio e apresentam boa sensibilidade a testes (CORRÊA, J. M; PENAFORT, 2011; LOBATO DA SILVA et al., 2016; NUNES et al., 2006).

Pertencem ao filo Arthropoda, família *Artemiidae* (CORRÊA, J. M; PENAFORT, 2011) são microcrustáceos de água salgada, base de cadeia alimentar de organismos marinhos. Seu amadurecimento ocorre entre uma e três semanas (LIMA et al., 2009) e divide-se em: cistos, larvas e adultos. Os cistos possuem três estruturas: o córion, que é basicamente a proteção contra choques mecânicos, a membrana cuticular externa, que desempenha papel singular na permeabilidade e a membrana cuticular embrionária que durante a incubação dos cistos é modificada para membrana de eclosão. A fase larval é subdividida em quinze estádios, o primeiro em que os náuplios não se alimentam, pois ainda não possuem trato digestivo funcional, o segundo pelo qual se alimentam de pequenas partículas e o décimo pelo

qual já há diferenciação sexual. Os adultos possuem comprimento de  $\pm 1$  cm, corpo alongado, segmentado e dividido em cabeça, tórax e abdome (CORRÊA, J. M; PENAFORT, 2011).

Os cistos, que são ovos secos, podem permanecer em estado de diapausa, ou seja, metabolicamente inativos e durante esse tempo não se desenvolvem, podendo permanecer desta forma por cinco ou mais anos. Após serem imersos em água salgada, os cistos bicôncavos hidratam, tornando-se esféricos e retomando seu metabolismo normal (CORRÊA, J. M; PENAFORT, 2011; FUJIWARA et al., 2017).

Em estudos preliminares, o composto metil cinamato expressou toxicidade similar à náuplios de *Artemia* sp. e larvas de *Ae. aegypti* (35,5 e 35,4 ppm, respectivamente) um fator que indica alta toxicidade ambiental (FUJIWARA et al., 2017). Já o piriproxifeno larvicida ainda utilizado no controle do *Ae. aegypti* em concentrações de 0,01 a 0,05 ppm, demonstrou alta toxicidade para o microcrustáceo em concentrações acima de 0,001 ppm. Enquanto o diflubenzuron causa alterações nos perfis de reprodutibilidade do microcrustáceo em concentrações entre 0,001 e 0,01 ppm e mortalidade acima de 0,01 ppm. Com concentração ativa contra larvas de *Ae. aegypti* variando entre 0,02 e 0,25 ppm (VIEIRA SANTOS et al., 2017). No entanto, o *N*-tosil indol molécula derivada do indol anteriormente produzida no Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal de Sergipe apresentou-se não tóxico frente a náuplios de *Artemia* sp. e em *Danio rerio* em concentrações de até 1500 ppm e 60 ppm, respectivamente, e alta potência larvicida (0,24 ppm) um indicativo de baixa ecotoxicidade (MACÊDO, 2018).

Dessa forma, derivados desse composto, e protótipos de novos agentes larvicidas que já apresentem atividades biológicas comprovadas, constituem uma rica fonte de compostos de interesse, pois podem ser potencialmente adequados para utilização em programas de manejo integrado apresentando alta toxicidade frente ao *Ae. aegypti*, e baixa toxicidade para organismos não alvo.

### **2.10 Cálculo de concentração letal média (CL<sub>50</sub>)**

Em estudos de toxicidade são utilizadas medidas para quantificar efeitos de substâncias químicas. A concentração letal média (CL<sub>50</sub>) refere-se à concentração de um produto químico que leva à morte de 50% dos indivíduos em um tempo pré-estabelecido (MINHO; GASPAR; DOMINGUES, 2016). Essa medida é expressa, usualmente, em miligrama por litro (mg/L) ou partes por milhão (ppm).

Em si, o bioensaio é trabalhado com grupos de organismos sob diferentes concentrações (replicatas) de um composto e após intervalo de tempo é calculada a mortalidade desses indivíduos. Depois disso, os resultados são plotados em *softwares* e a CL<sub>50</sub> é descrita em gráficos (FARIAS et al., 2012). A interpretação pode ser feita pelo método Probit (FINNET, 1971), em que os dados coletados são convertidos em um gráfico de função linear da concentração.

Assim, a concentração (x) pode ser calculada pelo logaritmo da quantidade de larvas mortas (y) que medeia a ocorrência ou não de uma resposta interpretada no gráfico (*Equação 1*):

$$x = \log y$$

### **2.11 Relação Estrutura-Atividade (REA)**

As interações de substâncias com sistemas biológicos são resultantes de uma série de fatores intimamente relacionados com a estrutura química, e como consequência das propriedades físico-químicas das moléculas que as compõe. A estrutura química como fator primordial é influenciada pelos seus grupos funcionais constituintes, visto que, condições como caráter eletrônico, estérico, ou hidrofóbico condicionam a interação do fármaco e a disposição através do possível efeito biológico. Dessa maneira, a associação de fragmentos de estruturas com atividades biológicas comprovadas e de presença constante em moléculas bioativas, também ditas “privilegiadas”, pode beneficiar a geração de diferentes alvos biológicos por meio da diversificação de seus grupos funcionais modulando assim, o efeito biológico tanto quantitativamente quanto qualitativamente (ARETZ et al., 2019; KOROKOLVAS ANDREJUS, 1974; PAGLIERO et al., 2017b; TAVARES, 2004; THOMAS, 2003).

O estudo de diferenças estruturalmente relacionadas é conhecido como Relação Estrutura-Atividade (REA). O estudo de REA de um composto protótipo e de seus análogos pode determinar partes da estrutura do protótipo responsáveis por sua atividade biológica (farmacóforo) (KOROKOLVAS; BURCKHALTER, 1982). Uma melhora que pode ser gerada a partir de uma estrutura com atividades biológicas conhecidas (protótipo) através do reconhecimento do tipo de grau de colaboração farmacofórica, qual o tipo de conformação que possui atividade e a antecipação do nível de identificação molecular pelo alvo de interesse, tendo como objetivo a ampliação da seletividade, potencia, e redução da toxicidade

(LIMA, 2007). Assim, estabelecendo um parâmetro de similaridade entre o protótipo e seus derivados é possível modular e prever o efeito biológico causado, podendo reduzir fatores negativos e adicionar fatores que condicionem uma melhora na atividade do análogo em questão (TAVARES, 2004).

Em 1964, com a aceitação da Equação de Hansch houve a inserção da ideia de que grupos substituintes através dos efeitos eletrônicos transmitidos a uma molécula podem influenciar a atividade biológica de um fármaco (TAVARES, 2004). Alterando fatores químicos e físicos de uma molécula de partida, os grupos substituintes podem ocasionar mudanças farmacocinéticas e farmacodinâmicas nos similares estruturais por meio de modificações tanto no tamanho quanto na forma e distribuição de elétrons (HANSCH; VERMA, 2009; THOMAS, 2003).

Partindo da atuação sobre a fase farmacocinética o grau de ionização de uma molécula é inversamente proporcional a lipofilicidade, Logo, estruturas não ionizadas são mais lipofílicas e transpassam com facilidade tecidos por meio de transporte passivo e moléculas ionizadas podem solvatar e reduzir a facilidade de uma absorção passiva (BARREIRO; FRAGA, 2015). Os parâmetros físico-químicos influenciam assim, na distribuição para tecidos e células podendo alterar a taxa de metabolismo e excreção. Por outro lado, na fase farmacodinâmica, o contato entre a molécula e o sítio de ação é dependente da atração ou repulsão de forças intermoleculares, podendo ser interações eletrostáticas, hidrofóbicas, interações de van der Waals, interações entre nuvens  $\pi$ , ligações de hidrogênio, que possibilitam a estabilização da energia livre do posterior complexo fármaco-receptor. Considerando a importância das propriedades físico-químicas dos grupos funcionais para a fase de reconhecimento molecular, a compatibilidade de uma molécula pelo seu sítio de ação é diretamente dependente da soma das forças de interação dos grupos farmacofóricos com locais complementares da biomacromolécula (BARREIRO; FRAGA, 2015).

As modificações estruturais que resultam em uma potência inalterada quando comparada a atividade do protótipo, o grupamento modificado não é necessário para a mesma, assim possivelmente não interage com o receptor. No entanto, quando há aumento ou redução da potência, o grupo alterado é necessário para a atividade biológica e interage com o receptor (KOROCOLVAS ANDREJUS, 1974; THOMAS, 2003).

Como exemplos práticos há pesquisas relacionadas a atividade larvicida contra *Ae. aegypti* e a estrutura de compostos ativos. Relacionando compostos naturais como os da

classe dos terpenos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, linalol e eugenol) existem importantes características estruturais de importância singular para a atividade. Como exemplo, para o  $\beta$ -pineno que possui uma dupla ligação exocíclica esta coincide com uma maior relevância com a dupla endocíclica do  $\alpha$ -pineno. Kim e colaboradores demonstraram o significativo destaque quanto a lipofilicidade para maior permeabilidade nos tecidos do tegumento do mosquito do *Ae. aegypti*, assim marcando a importância para sua atividade (KIM ET AL. 2003; SIMAS ET AL. 2004; GOMES 2016).

Em trabalhos com séries homólogas diferenciando uma das outras apenas pelo grupo metileno, como derivados do borneol frente ao *Ae. aegypti* foi identificado como já havia sido proposto por Hansch que o aumento da lipofilicidade é eficaz para o aumento da atividade larvicida até um máximo, onde antes ou depois desse valor, a potência tende a cair (HANSCH; VERMA, 2009; NUNES et al., 2018).

A alteração do parâmetro hidrofóbico por alguns substituintes pode suceder com o aumento da atividade regularmente com o aumento da cadeia até atingir um máximo produzindo uma curva de resposta de formas variadas. Os membros de maior cadeia além do ótimo são totalmente ou quase inativos (KOROCOLVAS ANDREJUS, 1974). Isso pode ser explicado por meio da maior predisposição a permeabilidade em membranas vista a concordância lipofílica entre essas substancia e alguns tecidos (THOMAS, 2003).

Por outro lado, os efeitos de outros grupamentos químicos também podem influenciar na atividade biológica como o grupo nitro, e seus efeitos físico-químicos como: aumento do peso e volume molecular, modificação do pKa, aumento do momento dipolar, redução da solubilidade em água, o efeito de ressonância produz ação quelante por polaridade, podem levar ao aumento ou não da atividade. A substituição de grupamentos nitro (NO<sub>2</sub>) em núcleos indólicos foi vista como benéfica para potenciais inibidores de Kir1 em *Ae. aegypti* (*Ae* Kir1) (ARETZ et al., 2019; J. PAGLIERO et al., 2011; PAGLIERO et al., 2017a).

Além disso, os efeitos estéricos, eletrônicos e lipofílicos variados pelos tipos de substituintes podem levar a mudanças na adaptação tridimensional da molécula ao sítio de ação e no grau de ionização e reatividade covalente do análogo, podendo também interferir no aumento ou redução da atividade larvicida. Como a influência de grupos lipofílicos sobre a atividade larvicida é evidenciada também por outros estudos, verifica-se da mesma forma, que o aumento desse caráter leva a otimização da relação estrutura atividade (LUCIA; ZERBA; MASUH, 2013; NUNES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2015; SANTOS et al., 2011). Logo, é

esperado que compostos com maior caráter lipofílico, possuam aumento da atividade larvicida em *Ae. aegypti* em relação atividade da estrutura de partida até o limiar em que não serão mais ativos.

Portanto, diante das pesquisas acima mencionadas há o interesse em sintetizar e avaliar a atividade larvicida de derivados do indol, da isatina, e de unidades da quitina racionalizando e aperfeiçoando a busca por estruturas protótipo com atividades biológicas já conhecidas introduzindo fragmentos de outras estruturas que influenciem a modificação dessa atividade. Projetado assim, a obtenção de onze compostos, sendo quatro derivados do indol, cinco derivados da isatina e dois derivados de unidades da quitina obtendo uma maior diversidade nas alterações desses derivados e sua influência sobre atividade do *Ae. aegypti*, sem prejuízos a um organismo não alvo.

## **2.12 Caracterizações físico-químicas**

Para identificação estrutural dos compostos sintetizados são necessárias análises qualitativas que em soma permitem a elucidação da estrutura das moléculas sintetizadas. Para compostos de origem orgânica especificamente três técnicas são de importância nesse processo: espectrometria de massas (EM), espectroscopia na região do infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN). Com essas técnicas, é possível identificar a fórmula molecular e a massa molecular do produto, e assim, associá-la a existência de grupos funcionais estipulados e definir também o esqueleto de carbono e hidrogênio da estrutura.

### **2.12.1 Espectrometria de massas (EM)**

A espectrometria de massas é uma técnica importante para determinação da fórmula molecular e massa molecular de substâncias. O espectrômetro de massas possui a unidade de entrada da amostra que é direcionada até a fonte de íons, pela qual as moléculas serão vaporizadas. Os íons são cátions radicais que representam o ponto de partida para a análise no espectro de massas (BRUICE, 2006; PAVIA et al., 2008)

Estes íons são acelerados por um campo magnético e posteriormente um analisador de massa os separa baseando-se na massa/carga ( $m/z$ ), por fim, são contados pelo detector e o sinal emitido é lançado em um sistema de dados que os processa e transforma em um espectro de massa. Este espectro corresponde a um gráfico da quantidade de íons detectados como função de sua razão massa ( $m$ ) sobre a carga ( $z$ ) ( $m/z$ ). Dependendo do método seguido para a

ionização das moléculas e também de propriedades da molécula, diversos íons podem ser formados, sendo produtos da quebra do íon molecular (PAVIA et al., 2008).

Os íons, de forma majoritária, apresentam carga ( $z$ ) +1, logo, a razão  $m/z$  é uma medida eficaz de massa de cada cátion. Não obstante, um gráfico (espectro de massas) é plotado e mostra a intensidade relativa de cada cátion gerado que é exibido por picos  $m/z$  definidos. Dessa forma, o pico mais alto do espectro recebe um valor relativo de 100%, sendo, portanto, denominado de pico base. Enquanto a altura dos demais picos é nomeada em relação a este pico (KLEIN, 2015; WILSON; WALKER, 2009).

### *2.12.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)*

A espectroscopia na região de infravermelho permite a identificação de diversos grupos funcionais na estrutura de compostos orgânicos (BRUICE, 2006). As ligações covalentes de compostos orgânicos exibem características de energia de vibração advinda da interação entre os átomos que constituem uma ligação, absorvem radiação na região do infravermelho, principalmente do infravermelho médio (região que fica abaixo do visível) ( $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ), em que as ligações covalentes são alteradas nos momentos de dipolo qualificando as formas vibracionais (estiramentos) e deformações dos ângulos das moléculas que compõe o composto (BARBOSA, 2007; PAVIA et al., 2008; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010). Logo, quando o momento dipolo elétrico é diferente de zero, é permitido utilizar a energia vibracional para constatar grupos funcionais participantes da molécula (PAVIA et al., 2008).

Baseando-se na relação direta entre as classes de ligações covalentes e as formas rotacionais e vibracionais de uma molécula, diversos grupos funcionais participantes da estrutura da mesma possuirão deformações e estiramentos angulares particulares que posteriormente originarão bandas diversas em um espectro de infravermelho (BARBOSA, 2007).

Quando as moléculas de uma amostra absorvem a radiação no infravermelho são excitadas para alcançar um estado de maior energia, essa absorção é quantizada da mesma forma que em outros processos de absorção. Durante a absorção, as frequências vibracionais das moléculas covalentes de estiramento e dobramento são equivalentes aos modos vibracionais originários da molécula e a energia integrada são úteis para aumentar a amplitude da cinesia vibracional das ligações presentes na molécula (PAVIA et al., 2008). No entanto,

não são todas as ligações em uma molécula que retém energia no infravermelho, somente conexões que tem momento dipolo alterado em função do tempo. Com isso, a ligação deve demonstrar um dipolo elétrico que seja alterado na mesma frequência da radiação a que é imposto (BRUICE, 2006; KLEIN, 2015; PAVIA et al., 2008).

No momento que a energia é absorvida, ocorre um aumento da amplitude dos movimentos vibracionais das ligações moleculares. Estes movimentos, por si, podem ocorrer de duas formas, na forma denominada axial ou de estiramento, equivalente ao alongamento ou encurtamento com ritmo da ligação interatômica, ou na forma de dobramento ou angular, onde as vibrações de deformação angulares são similares as variações ritmadas de um grupo de ligações (PAVIA et al., 2015). As vibrações podem ser denominadas vibrações fundamentais e são criadas a partir da excitação de um estado fundamental para um estado de energia mais baixa. Comumente, o espectro pode ser complicado pela presença de bandas fracas, chamadas de bandas harmônicas, combinações e de diferença (BRUICE, 2006; PAVIA et al., 2015).

Ligações de maior força e átomos de menor peso são bandas de absorção no infravermelho em frequências mais altas, ou seja, em faixa de maior número de onda (BRUICE, 2006; PAVIA et al., 2008). Entretanto, a avaliação do espectro eletromagnético de absorção na faixa de infravermelho não depende somente dessas duas variáveis a ressonância e efeitos eletrônicos indutivos podem afetar a faixa de números de onda para cada deformação axial, pois transformam a maneira de distribuição eletrônica, e por consequência, a distância da ligação covalente. Além disso, o efeito da ordem de ligação também pode afetar a força de ligação e conseqüentemente a posição das bandas de absorção. Logo, as ligações triplas são mais fortes que ligações duplas, e as primeiras, possuem deformações axiais em frequências mais altas ( $\sim 2.100 \text{ cm}^{-1}$ ) que ligações duplas ( $\sim 1.650 \text{ cm}^{-1}$ ) (BRUICE, 2006).

### 2.12.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica baseada na medida de absorção de núcleos atômicos expostos a radiação eletromagnética de uma frequência específica, na contribuição de um forte campo magnético (KLEIN, 2015). Obtendo dados sobre o número de átomos magneticamente distintos do isótopo da molécula estudada. Assim, a junção de informações obtidas apenas com espectroscopia de infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear podem ser determinadoras de descrições completas da estrutura de uma molécula. Os dados da técnica são fornecidos através de um

espectro em gráfico de frequência absorvida (ppm) *versus* intensidade do sinal (PAVIA et al., 2008).

Por se tratar de uma pequena revisão sobre um longo assunto, este será abordado quanto aos aspectos principais e necessários para a compreensão do espectro de RMN especificamente de prótons.

Os núcleos de átomos podem possuir uma característica denominada spin, na qual os núcleos portam-se como se estivessem fazendo movimentos giratórios. No entanto, isto é válido para átomos que possuem um número atômico ímpar ou número de massa ímpar, tem um momento angular de spin e um momento magnético, os mais comumente analisados são  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (PAVIA et. al., 2008; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE).

Quando ocorre a absorção de energia na região de radiofrequência é dito que os núcleos estão em ressonância com a radiação eletromagnética (PAVIA et. al., 2008; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010). Por conseguinte, como núcleos possuem carga, a precessão gera um campo elétrico oscilatório de frequência idêntica. Assim, se a ondas de radiofrequência forem proporcionadas ao próton que está precessando, pode haver absorção energética, causando alteração de spin (PAVIA et. al., 2008).

Seguindo a linha de pensamento do Princípio da Incerteza de Heisenberg, cada pulso emitido possuirá um limiar de frequência constituída no fundamental, assim a duração deve se ater a um limiar para que o conteúdo do pulso tenha precisão suficiente para excitar todos os prótons diferentes de uma molécula. Portanto, no momento em que o pulso for pausado, todos os núcleos que foram excitados liberam essa energia e retomam o estado originário de spin, relaxando. Partindo do pressuposto de que uma molécula integra diversos núcleos, inúmeras frequências de radiação eletromagnética são expressas concomitantemente, fator chamado de sinal de decaimento da indução livre (DIL) (PAVIA et. al., 2008; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010). Então, o conjunto de energia emitida pelos núcleos será coletado por um computador e posteriormente converterá de dados de intensidade *versus* tempo para dados de intensidade *versus* frequência por meio de uma transformada de Fourier, operação matemática na qual é produzido o espectro de RMN com transformada de Fourier (BRUICE, 2006)

Para entender o RMN são necessários alguns fatores como o deslocamento químico ( $\delta$ ). Como o deslocamento está ligado aos tipos de moléculas das quais o hidrogênio está

associado, e também define o tipo de ligação química ocorrida tornando a técnica eficaz na determinação da estrutura da molécula (DIEGUEZ et al., 2018). O espectro diferencia os tipos de prótons, porém, além disso, com a integral da área de um pico, mostra o quanto de cada próton está integrado na molécula. A área sob os picos é proporcional a quantidade de hidrogênios que deram origem a esse pico. Assim, integra eletronicamente as áreas dos picos traçando sobre cada pico uma linha perpendicular que sobe proporcionalmente a área sob o pico (BRUICE, 2006; PAVIA et. al., 2008).

Quando associada a moléculas simples sabe-se que cada tipo de próton dificilmente gerará um único pico de ressonância, podendo ser descrito pela regra  $(n + 1)$ . Então, a multiplicidade dos picos quanto aos prótons vizinhos em relação a um próton ou conjunto de prótons (que acoplam), será descrito pela regra spin-spin  $(n+1)$ . Além disso, deve-se sempre procurar padrões de picos podendo ser um simpleto, único pico, ou pode desdobrar-se em duplete, tripleto, quarteto, quinteto ou multiplete. A quantidade de picos desdobrados é determinada pela equação, em que  $n$  corresponde a quantidade de prótons vizinhos ao que se está analisando (PAVIA et. al., 2008; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010).

### **3 OBJETIVOS**

#### ***3.1 Geral***

Identificar novos protótipos derivados do indol, da isatina e de unidades da quitina visando o desenvolvimento de compostos potencialmente larvicidas frente ao *Ae. aegypti* e avaliar a toxicidade destes compostos frente a um organismo não-alvo.

#### ***3.2 Específicos***

- Sintetizar derivados do indol, isatina e quitina;
- Caracterizar os compostos sintetizados;
- Determinar a toxicidade dos compostos sintetizados contra larvas em estágio L3 do *Ae. aegypti*. e toxicidade frente a *Artemia* sp.;
- Realizar um estudo da relação estrutura atividade (REA) dos compostos sintetizados.

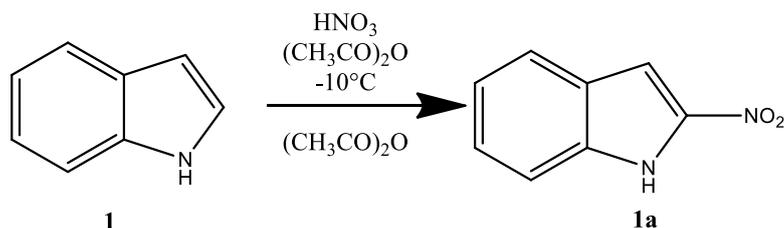
## 4 METODOLOGIA

As etapas química e biológica deste trabalho foram desenvolvidas no Laboratório de Química Farmacêutica (LQF), da Universidade Federal de Sergipe (UFS) em parceria com o Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical da UFS. As caracterizações químicas estão sendo realizadas em colaboração com o Laboratório de Multiusuários II, do Departamento de Química (DQI-UFS), a Florida Agricultural and Mechanical University (FAMU), o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e o Laboratório de Espectrometria de Massas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP).

### 4.1 Procedimento experimental

A metodologia proposta para o desenvolvimento deste trabalho foi subdividida em rotas sintéticas diferentes, de acordo com cada estrutura de partida.

#### 4.1.1 Síntese do 2-nitro-1H-indol: **1a**



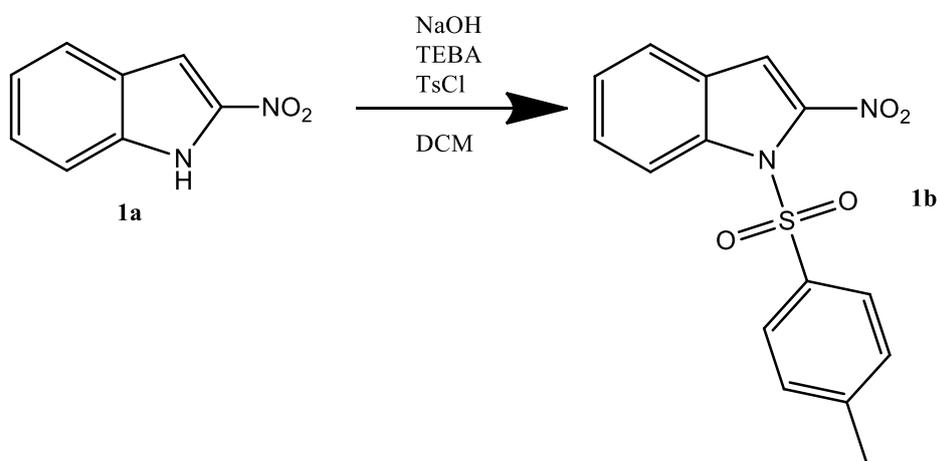
**Esquema 12:** Esquema para síntese do 2-nitroindol (**1a**). O mesmo foi sintetizado a partir do tratamento de ácido nítrico e anidrido acético a -10°C gotejado a uma mistura de indol (**1**) com anidrido acético obtendo a mistura total sob agitação por 2 horas a temperatura ambiente.

O procedimento da síntese foi baseado na metodologia utilizada por Kneeteman et al. 2015.

Inicialmente num balão de fundo redondo de 200 mL foi agitada uma mistura de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) (65%, 4,15 mL) e anidrido acético (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O (60 mL), resfriados a -10°C com nitrogênio líquido. Outra mistura contendo indol (2,29 g - 19,59 mmol) e anidrido acético (60 mL) foi adicionada gota a gota por um período de 30 minutos à mistura resfriada. A mistura total foi agitada por 2 horas à temperatura ambiente e em seguida vertida em gelo triturado. A mistura aquosa foi neutralizada com bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>). E em seguida, transferiu-se a mistura reacional para um funil de separação seguida da separação da fase orgânica, lavando a fase aquosa com três porções de 10 mL de clorofórmio. A fase

orgância foi seca com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Para acompanhar a reação e garantir que há apenas a presença do produto foram realizadas placas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). Em seguida, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida à temperatura de  $45^\circ\text{C}$ . Logo após, o composto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel 60 como fase estacionária e uma mistura de solventes adequados como fase móvel (Hexano: Acetato) de modo a obter 0,35 g, 2,15 mmol, 11% de **2-nitro-1H-indol (1a)**; Sólido avermelhado. IV ( $\text{KBr}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): em andamento. ESI-EM ( $m/z$ ) para  $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ : ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> [calcd: 163,04], [obtd:163,04]; ( $\text{M}+\text{Na}$ )<sup>+</sup> [calcd: 185,03], [obtd:185,03].

#### 4.1.2 Síntese do 2-nitro-1-(tosil)-1H-indol: **1b**



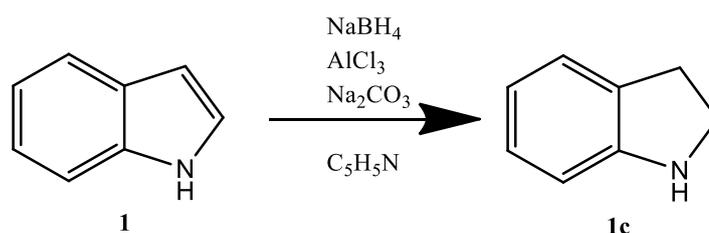
**Esquema 13:** Esquema para síntese de 2-Nitro-1-(Tosil)-1H-indol (**1b**). O mesmo foi sintetizado a partir do tratamento de 2-nitroindol (**1a**) com cloreto de tosila (TsCl), hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de benziltriethylamônio (TEBA) e diclorometano (DCM), a temperatura ambiente, sob agitação por 64 horas.

O 2-nitro-1-(tosil)-1H-indol proposto foi sintetizado modificando o procedimento descrito por Che et. al. (2013), visando aumentar o rendimento reacional e a pureza do produto. A síntese regioseletiva partiu do 2-nitroindol (**1a**) com cloreto de tosila (TsCl) na presença de cloreto de benziltrimetilamônio (TEBA), hidróxido de sódio (NaOH) e solvente diclorometano (DCM).

A um balão de fundo redondo de 50 mL adicionou-se o 2-nitroindol (0,180g – 1,1102 mmol) em seguida o diclorometano (DCM) (5 mL) e os reagentes sólidos nesta ordem: benziltrimetilamônio (TEBA) (0,0253 g - 0,11102 mmol), hidróxido de sódio (NaOH) (0,0799 g - 1,9983 mmol) e cloreto de tosila (0,3615 g - 1,3322 mmol). Agitou-se à temperatura ambiente por 2 horas e através de placas de CCDA observou-se que a reação ainda não tinha sido finalizada e já não havia presença do cloreto de tosila, portanto foi

adicionado mais 0,1807 g – 0,66310 mmol deste. Assim, ao longo de 64 horas foram adicionadas as mesmas quantidades equivalentes de cloreto de tosila e NaOH (0,0399 g – 0,9994 mmol) para basificar a reação. Terminada a reação transferiu-se a mistura reacional para um funil de separação, adicionou-se água (10 mL) e extraiu-se a fase orgânica, lavando a fase aquosa por três vezes com porções 10 mL de clorofórmio. As fases orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de sódio anidro. Em seguida, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida à temperatura de 45°C. Logo após, o produto foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel utilizando como eluente hexano:clorofórmio (1:1), seguido de recristalização com hexano:clorofórmio (1:1), de modo a obter 0,24 g, 0,75 mmol, 68% de **2-nitro-1-(Tosil)-1H-indol (1b)**. Cristais brancos; PF: 183 – 186 °C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1373 e 1149 (O=S=O). ESI-EM (m/z) para C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S: (M+H)<sup>+</sup> [calcd: 317,31], [obtd:317,05]; (M+K)<sup>+</sup> [calcd: 355,40], [obtd:355,01].

#### 4.1.3 Síntese do 2,3-dihidro-1H-indol: **1c**



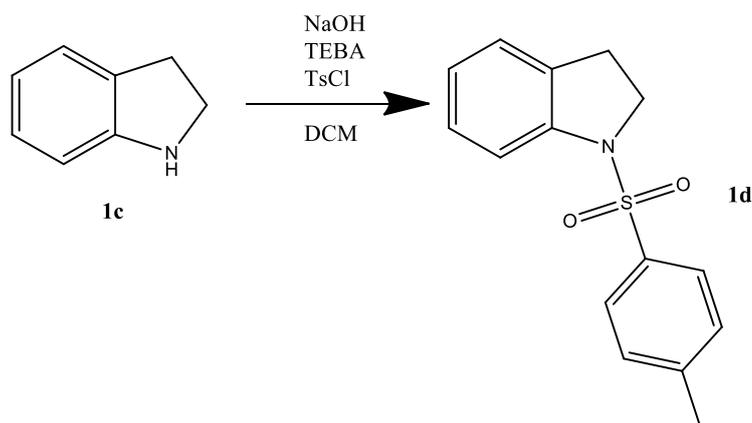
**Esquema 14:** Esquema para síntese de 2,3-dihidro-1H-indol (**1c**). O mesmo foi sintetizado a partir do tratamento do indol (**1**) com borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>), cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e piridina (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N), a temperatura ambiente, sob agitação por 7 horas.

O 2,3-dihidro-1H-indol proposto foi sintetizado seguindo o procedimento descrito por Yasuo Kikugawa (1978).

A um balão de fundo redondo de 100 ml foram adicionados indol (1,1715 g - 10 mmol), borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) (1,8915 g - 50 mmol), 25 mL de piridina (15°C) e cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) (4,002 g - 30 mmol), finamente triturado. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) a fim de avaliar o consumo de material de partida e formação de produto. Após 7 horas de agitação, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Ao resíduo foi adicionado água (50 mL) e a solução aquosa foi extraída com tolueno (0,83 g/cm<sup>3</sup>) que foi lavado com uma solução saturada de NaCl (cloreto de sódio) e seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sulfato de sódio anidro).

Após a evaporação do tolueno adicionou-se uma solução 10% de ácido clorídrico (HCl) (15 – 20 mL) ao resíduo resfriado para decompor o complexo piridina-borano. Foi adicionado carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) em pó para tornar a solução alcalina. A camada aquosa foi extraída com tolueno que foi lavado com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) e seca com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Após a evaporação do tolueno o líquido esverdeado foi mantido no balão e utilizado para a próxima etapa sintética sem purificação.

#### 4.1.4 Síntese de 2,3-Dihidro-1-[(4-metilfenil)sulfonyl]-1H-indol: **1d**



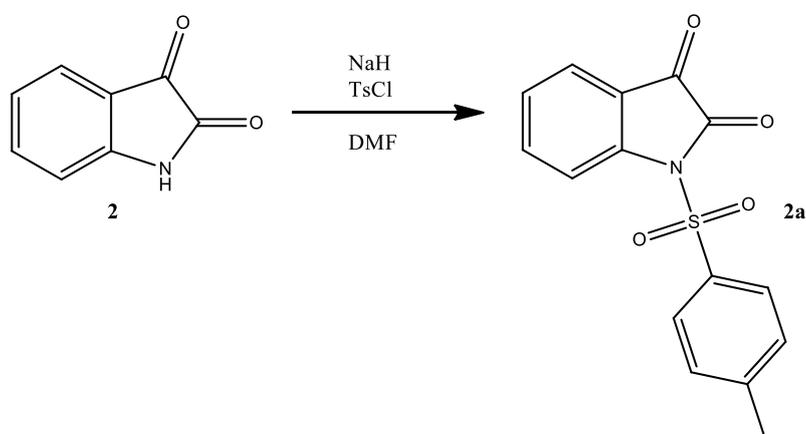
**Esquema 15:** Esquema para síntese da *N*-tosilindolina (**1d**). O mesmo foi sintetizado a partir do tratamento da indolina (**1c**) com cloreto de tosila (TsCl), hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de benziltriethylamônio (TEBA) e diclorometano (DCM), a temperatura ambiente, sob agitação por 120 horas.

A *N*-tosil indolina proposta foi sintetizada modificando o procedimento descrito no item 4.1.2 por CHE et. al. 2013, visando aumentar o rendimento reacional e a pureza do produto. Foi baseado em uma síntese regioseletiva a partir do 2,3-dihidro-1*H*-indol (**1c**) com cloreto de tosila (TsCl), na presença de cloreto de benzil trimetil amônio (TEBA), hidróxido de sódio (NaOH) e solvente (DCM).

No dia anterior, foram preparados a vidraria e material necessário para a reação. Em um balão de fundo redondo de 50 mL foi adicionado o 2,3-dihidro-1*H*-indol (**1c**) (1,1916 g - 10 mmol) em seguida o diclorometano (DCM) - (50 mL) seguido dos reagentes sólidos nesta ordem: benziltrimetilamônio (TEBA) (0,2277 g - 0,001 mmol), hidróxido de sódio (1,08g - 0,027 mmol) e cloreto de tosila (2,919 g - 0,015 mmol). Agitou-se à temperatura ambiente por 120 horas (5 dias). Ao longo da síntese foram realizadas CCDAs para acompanhar a reação e garantir que havia apenas a presença do produto na placa. Terminada a reação transferiu-se a mistura reacional para um funil de separação, adicionou-se água (23 mL) e extraiu-se a fase orgânica, lavando com três porções de 10 mL de clorofórmio a fase aquosa. As fases

orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de sódio anidro. Em seguida, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida à temperatura de 45°C. Logo após, o produto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel e utilizando como eluente hexano:acetato (1:1), seguido de recristalização com hexano:acetato (9:1), de modo a obter 2,6 g, 9,52 mmol, 95,3% do **2,3-Dihidro-1-[(4-metilfenil) sulfonil]-1H-indol (1d)**; Cristais cor de rosa; PF: 95-99°C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1350 e 1140 (O=S=O). ESI-EM (m/z) para C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>S: (M+H)<sup>+</sup> [calcd: 274,33], [obtd:274,08]; (M+K)<sup>+</sup> [calcd: 312,42], [obtd:312,04]; (M+Na)<sup>+</sup> [calcd: 296,31], [obtd:296,07].

#### 4.1.5 Síntese de 1-Tosil-1H-Indol-2,3-diona: **2a**



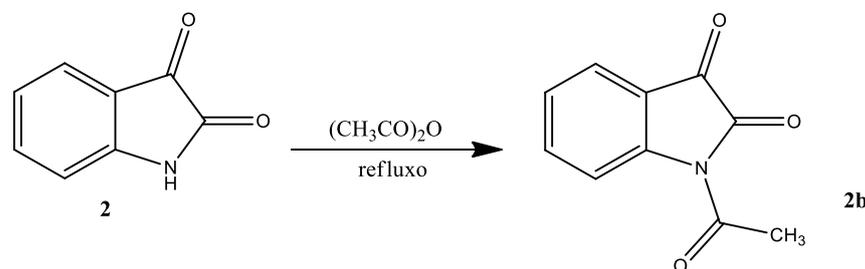
**Esquema 16.** Esquema para síntese de 1-Tosil-1H-Indol-2,3-diona (2a). O mesmo foi sintetizado a partir do tratamento de isatina (2) com hidreto de sódio (NaH), cloreto de tosila (TsCl), e dimetilformamida (DMF), com variações na temperatura, inicialmente a 0° por uma hora, seguida da agitação por oito horas em temperatura ambiente finalizando com mais quatorze horas a 70°.

A 1-tosil-1H-indol-2,3-diona foi sintetizada através do método proposto por Jiang et. al 2013. É uma síntese regioseletiva a partir da isatina com cloreto de tosila (TsCl), na presença de hidreto de sódio (NaH) e solvente (DMF).

Um balão de fundo redondo de 50 mL foi flambado em bico de Bunsen, adicionou-se o agitador magnético, em seguida foi injetado nitrogênio gasoso - N<sub>2</sub> e vedou-se o balão com rolha de látex conectada a uma bexiga também com N<sub>2</sub> para que a reação ocorresse sem a presença de ar atmosférico. Após o resfriamento do balão a rolha de latex foi retirada rapidamente para não alterar a composição dos gases dentro do balão, adicionou-se a isatina (1,47 g - 9,991 mmol) em seguida injetou-se mais N<sub>2</sub> e dimetilformamida (DMF) (10 mL) a 0 °C. Posteriormente, adicionou-se lentamente o hidreto de sódio (NaH) (0,48 g - 20 mmol). Após a mistura ter sido agitada por 1 hora, o cloreto de tosila (TsCl) (2,28 g - 11,95 mmol) foi

adicionado lentamente a reação, seguido de jatos de N<sub>2</sub> para expulsar o ar atmosférico que possa ter entrado no balão durante o procedimento e imediatamente vedou-se o balão. Agitou-se a temperatura ambiente por 8 horas. Passadas às 8 horas a reação foi aquecida por 14 horas a 70 °C. A mistura reacional foi acompanhada por placas de CCDA para garantir que há síntese do produto desejado na reação. Terminada a síntese, a reação foi resfriada e água destilada (7 mL) foi adicionada a mistura transferindo-se o precipitado para posterior filtração sob pressão reduzida. O precipitado foi lavado com álcool (EtOH) e éter (Et<sub>2</sub>O). O produto foi recristalizado com sistema 7:3 (Hexano : Clorofórmio) de modo a obter 2,65 g, 8,8 mmol, 88% de **1-tosil-1H-indol-2,3-diona (2a)**. Cristais amarelos; PF: 205 - 209 °C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1372 e 1140 (O=S=O). ESI/EM (m/z) para C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>S (M+H<sup>+</sup>): Em andamento. <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.09 (d, *J*=8.07 Hz, 1 H) 8.02 (d, *J*=8.07 Hz, 2 H) 7.75 (pt, *J*<sub>1</sub>=7.89, *J*<sub>2</sub>=8.07 Hz, 1 H) 7.71 (d, *J*=7.70 Hz, 1 H) 7.38 (d, *J*=7.70 Hz, 2 H) 7.31 (pt, *J*<sub>1</sub>=7.34, *J*<sub>2</sub>=7.70 Hz, 1 H) 2.45 (s, 3 H). <sup>13</sup>C RMN (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 179.06, 155.67, 147.63, 146.60, 139.29, 134.64, 130.15, 128.05, 125.99, 125.84, 118.92, 115.27, 21.75.

#### 4.1.6 Síntese de *N*-acetilisatina: **2b**



**Esquema 17.** Esquema para síntese de *N*-acetilisatina (**2b**). O mesmo foi sintetizado a partir do tratamento de isatina (**2**) com anidrido acético (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O sob refluxo e agitação por seis horas.

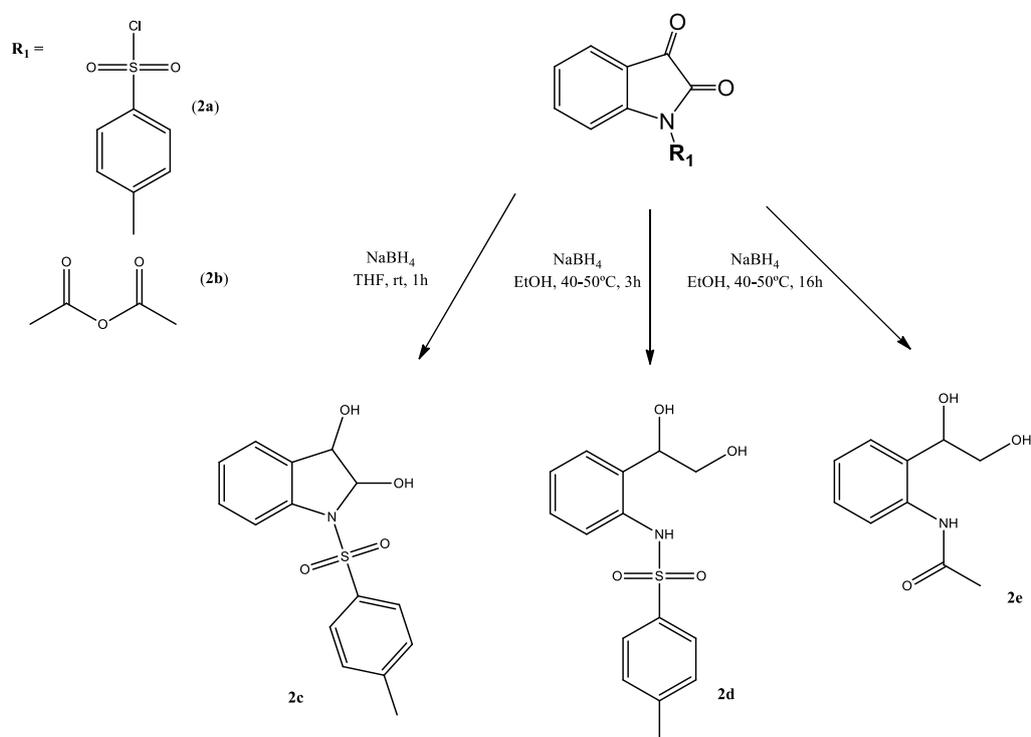
A síntese de *N*-acetilisatina procedeu conforme método proposto por Boraei et. al 2017.

Um balão de fundo redondo de 50 mL foi flambado em bico de Bunsen, adicionou-se o agitador magnético (peixinho/bailarina), injetou-se em seguida N<sub>2</sub> e vedou-se com rolha de látex acoplado uma bexiga também com N<sub>2</sub> para que a reação ocorresse sem a presença de ar atmosférico. Após o resfriamento do balão a rolha de latex foi retirada rapidamente para não alterar a composição dos gases dentro do balão, adicionou-se a isatina (1,47 g – 9,991 mmol) em seguida injetou-se mais N<sub>2</sub> e anidrido acético (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O (5 mL) a reação foi colocada sob refluxo por 6 horas, resfriada, despejada sobre gelo picado e filtrada a vácuo. A reação foi

acompanhada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) a fim de avaliar o consumo de material de partida e formação de produto. O precipitado foi recristalizado com o sistema (hexano: acetato) (7:3) de modo a obter 1 g, 5,28 mmol, 53% de *N*-acetilisatina (**2b**). Cristais amarelos. PF: 142 - 144 °C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1735 e 1716 (C=O); 1630 (N-C=O). ESI/EM (m/z) para C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub> (M+H<sup>+</sup>): em andamento.

#### 4.1.7 Síntese de diol derivados (**2c** - **2e**)

- *N*-Tosil-2,3-dihidro-1*H*-indol-2,3-diol: **2c**
- *N*-[2-(1,2-dihidroxi-etil)-fenil]-4-metil-benzenossulfonamida: **2d**
- *N*-[2-(1,2-dihidroxi-etil)-fenil]-acetamida: **2e**



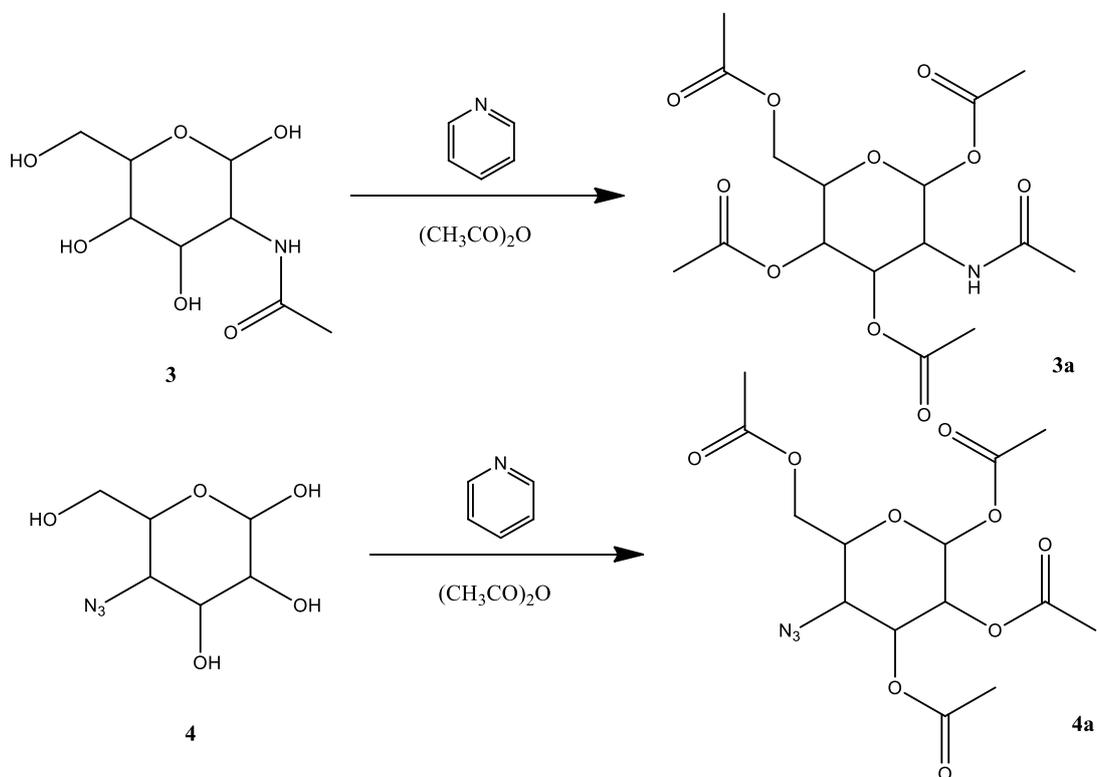
**Esquema 18.** Esquema para síntese de diol derivados (**2c** - **2e**) a partir da redução de 1-tosil-1*H*-indol-2,3-diona (**2a**) ou *N*-acetilisatina (**2b**) com borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>).

Os produtos foram sintetizados a partir do procedimento proposto por Chung et al. 2003, são reações de redução com o borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>).

Sob meio anidro, uma mistura de **2a** (1-tosil-1*H*-indol-2,3-diona) ou **2b** (*N*-acetilisatina) (2 mmol), borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) (0,305 mg, 8 mmol) e 5,0 mL de etanol para os compostos **2d** e **2e**, e para o **2c** 5 mL de tetraidrofurano (THF). Manteve-se sob agitação por 3 horas de 40 – 50 °C para **2d**; o **2c** foi agitado por 1 hora a temperatura

ambiente e o **2e** por 16 horas de 40 – 50 °C. As reações foram acompanhadas por CCDA. Terminada a reação, os compostos foram filtrados através de celite e lavados com éter. Os produtos foram purificados em coluna cromatográfica de sílica gel 60 como fase estacionária e uma mistura de solventes adequados como fase móvel (Hexano : Clorofórmio) de modo a obter 0,20 g, 0,66 mmol, 33% de **1-tosil-2,3-dihidro-1H-indol-2,3-diol (2c)**. Sólido cinza; PF: 135 - 138 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3490, 3336 (OH); 1323 e 1153 (O=S=O); ESI-EM (m/z) para  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$  (M+Na+) [calcd: 329], [obtd:330,07]. Obtendo 0,1 g, 0,33 mmol, 16,43% de **N-[2-(1,2-dihidroxi-etil)-fenil]-4-metil-benzenossulfonamida (2d)**. Cristais brancos; PF: 140 - 142 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1323 e 1153 (O=S=O). ESI-MS (m/z) para  $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{S}$  (M+K)+ [calcd: 346,43], [obtd: 346,05]; (M+Na)+ [calcd: 330,32], [obtd:330,07]. E obtendo 0,36 g, 1,84 mmol, 38,6% de **N-[2-(1,2-dihidroxi-etil)-fenil]-acetamida (2e)**. Sólido cinza; PF: 70 – 72°C; IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3294 (OH) 1679 (N-C=O). ESI-EM (m/z) para  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ : (M+K)+ [calcd: 234,18], [obtd:234,05]; (M+Na)+ [calcd: 218,07], [obtd:218,07].

**4.1.8 Síntese de D-glicopirranose, 2-(acetilamino)-2-deoxi-, 1,3,4,6-tetraacetato: 3a e de  $\alpha$ -D-manopirranose, 4-azido-4-deoxi-, 1,2,3,6-tetraacetato: 4a**



**Esquema 19.** Esquema para síntese de 2-(acetilamino)-2-deoxi-, 1,3,4,6-tetraacetato (**3a**) a partir da acetilação de N-acetilglicosamina com anidrido acético e de  $\alpha$ -D-Manopirranose, 4-azido-4-deoxi-, 1,2,3,6-tetraacetato (**4a**)

Procedimento geral para síntese a partir do procedimento proposto por Dang et al. 2014.

Um balão de fundo redondo de 50 mL foi flambado em bico de Bunsen, adicionou-se o agitador magnético (peixinho/bailarina), injetou-se em seguida N<sub>2</sub> e vedou-se com rolha de látex acoplado uma bexiga também com N<sub>2</sub> para que a reação ocorresse sem a presença de ar atmosférico. Após o resfriamento do balão a rolha de latex foi retirada rapidamente para não alterar a composição dos gases dentro do balão, adicionou-se *N*-acetilglicosamina (**3**) (1 g – 4,52 mmol); D-Manopiranoose, 4-azido-4deoxi (**4**) (0,1 g – 0,452 mmol) em seguida injetou-se mais N<sub>2</sub>, anidrido acético (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O (2,56 mL) e piridina (10 mL) para o composto **3a** e anidrido acético (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O (0,3 mL) e piridina (1 mL) para o composto **4a**. As misturas foram agitadas a temperatura ambiente por 10 horas, e acompanhadas por CCDA a fim de avaliar o consumo de material de partida e formação de produto. Finalizada a reação, água gelada foi adicionada as soluções resultantes e em seguida foram feitas extrações com acetato de etila. As camadas orgânicas foram lavadas com salmoura (NaHCO<sub>3</sub>), secas com sulfato de magnésio e concentradas a vácuo de modo a obter 0,9964 g, 2,57 mmol, 56,85% de **2-(acetilamino)-2-deoxi-,1,3,4,6-tetraacetato (3a)**. Cristal incolor. PF: em andamento. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1741 (C=O); 1659 (N-C=O). ESI/EM (m/z) para C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>10</sub> (M+H<sup>+</sup>): em andamento. E obtendo 85% de **a-D-Manopiranoose, 4-azido-4-deoxi-,1,2,3,6-tetraacetato (4a)**. Sólido branco. PF: em andamento. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): em andamento. ESI/EM (m/z) para C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub> (M+Na<sup>+</sup>): [calcd: 396,11], [obtd:396,10].

#### 4.2 Métodos cromatográficos

Finalizadas as sínteses de cada substância estas foram purificadas e/ou separadas através da técnica de cromatografia em coluna (CC). Esse método é aplicado utilizando uma fase estacionária (sílica gel 60 Sigma Aldrich) de partículas com dimensões entre 0,063 - 0,200 mm sendo depositadas dentro de colunas cilíndricas de vidro com dimensões variando de acordo com a quantidade de composto a ser purificado. Na fase móvel foram dispostas a mistura de solventes hexano e acetato ou hexano e clorofórmio em misturas binárias, variando a concentração de cada solvente de acordo com a polaridade adequada para cada substância. Durante a abertura da coluna e gotejamento do solvente em volumes de aproximadamente 40 mL foram retirados regularmente e analisados por CCDA, até a avaliação de que o produto desejado foi isolado. Ao final da coluna, os erlenmeyers que continham o composto puro

foram unidos e concentrados sob pressão reduzida a uma temperatura aproximada de 30°C os sólidos obtidos foram armazenados em frascos limpos e identificados.

A cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foi realizada utilizando cromatofolhas de sílica gel (MACHEREY- NAGEL) eluídas em solução de Hexano : Acetato de Etila ou Hexano : Clorofórmio para o acompanhamento da síntese e para verificação e preparo da CC. Cada cromatofolha possui dimensão de 1,5 cm de comprimento por 1,5 de largura, nessas bases são adicionados alíquotas de amostra a ser analisada com apoio de um capilar de vidro conjuntamente com os compostos que se quer comparar. As amostras foram preparadas pela solubilização de 0,1 mg do analito em quantidade suficiente de acetato de etila ou clorofórmio. Logo após adicionadas as alíquotas a uma altura de 0,3 cm, a cromatofolha foi imersa em uma mistura de solventes de proporção variável para cada composto, até 0,2 cm de altura, a fim de eluir as frações a serem observadas.

Por fim, para visualizar as frações eluídas as placas foram expostas a luz ultravioleta em câmara escura e posterior imersão da cromatofolha em soluções de anisaldeído, vanilina ou ácido sulfúrico 5% seguida de aquecimento por alguns segundos a temperaturas altas.

#### ***4.3 Método de recristalização***

As recristalizações foram realizadas adicionando-se aproximadamente 1g de cada composto, separadamente, em um béquer de 20 ml, seguida da adição a frio de 4 mL do sistema Hexano/Acetato de etila na proporção 1:1 ou clorofórmio puro. Depois, as misturas foram submetidas a aquecimento a fim de solubilizar todo composto adicionado. Após a completa solubilização, o sistema foi retirado do aquecimento, deixando resfriar a temperatura ambiente até o início da recristalização da substância. Aguardou-se recristalizar o máximo possível e posteriormente filtrou-se os sólidos em funil de vidro, lavando o filtrado com hexano à temperatura ambiente. O sólido purificado foi guardado em recipiente limpo, com tampa e identificado.

#### ***4.4 Determinação da atividade larvicida***

Os ensaios larvicidas foram realizados conforme metodologia descrita por Santos et al, 2011. Com o objetivo de alcançar uma maior taxa de uniformidade do estágio das larvas e melhor uniformidade do estágio de desenvolvimento, os ensaios foram realizados com larvas de *Ae. Aegypti* no 3º estágio (L3) da linhagem *Rockefeller* (sensível ao temefós).

Os ovos de *Ae. aegypti* foram produzidos no insetário do departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe, cedidos pela Professora Roseli La Corte dos Santos e mantidos secos, aderidos em tiras de papel até o uso. Para preparação dos ensaios, tiras de papel contendo os ovos foram colocadas em um recipiente retangular com água desclorada. Nas primeiras 24 horas os ovos foram eclodidos com levedura de cerveja. Nos dias seguintes as larvas foram mantidas com aproximadamente 200 mg de ração de peixe. O recipiente foi mantido no insetário, com temperatura controlada (26 - 28°C) de modo a permitir a eclosão e o desenvolvimento das larvas, por aproximadamente quatro dias, quando as larvas de terceiro estágio foram identificadas de acordo com o tamanho e características morfológicas.

Para avaliação da toxicidade, inicialmente foram determinadas as concentrações a serem aplicadas por meio uma curva concentração-resposta. As concentrações utilizadas foram preestabelecidas no laboratório 1, 5, 10, 50, 100, 500 e 1000 ppm. Assim, pesou-se 20 mg de cada substância, para cada 1mL de solução teste, seguindo da dispersão do composto pesado em Tween 80 (1 mL – 2 gotas v/v), DMSO (30% v/v) e água destilada (70% v/v), respectivamente.

Utilizando uma pipeta automática, adicionou-se o volume da concentração desejada em um copo descartável, seguida da adição de volume final correspondente a 20 mL de água desclorada com 20 larvas de *Ae. aegypti* no estágio L3 (somando-se os volumes da solução em cada copo e a água adicionada posteriormente, obtendo assim 20 mL). Copos descartáveis foram utilizados com o objetivo de evitar contaminação cruzada, conseqüentemente reduzindo a possibilidade de erro nos testes.

As larvas foram expostas às soluções e ao final a mortalidade foi registrada após 24 horas. A partir do resultado destes dados, estabeleceram-se os pontos de concentração a serem utilizados para o ensaio larvicida em triplicata. Este foi delineado utilizando-se o mesmo procedimento descrito para o preparo da solução teste e seleção das larvas na realização da curva concentração-resposta.

Concomitantemente aos testes, foram preparados também controle negativo, controle positivo e branco. Para o preparo do controle negativo preparou-se uma dispersão homogênea de Tween-80 (1 mL – 2 gotas v/v), DMSO (30% v/v) e água desclorada (70% v/v), aplicado-a na maior concentração utilizada no ensaio, também em triplicata. O controle positivo foi realizado utilizando o organofosforado temefós larvicida que foi amplamente utilizado para o

controle de larvas. O branco, por sua vez, correspondia apenas a 20 mL de água desclorada com 20 larvas de *Ae. aegypti* no estágio L3.

Depois das 24 horas de exposição, foram contabilizados o número de larvas mortas em cada copo descartável. Por fim, os dados de mortalidade foram submetido a análise estatística.

#### **4.5 Ensaio ecotoxicológico com *Artemia* sp.**

Os ensaios de toxicidade com *Artemia* sp. foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Artemia Reference Center (ARC). Os ovos secos desse microcrustáceo foram obtidos no comércio, mantidos em sua própria embalagem no Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal de Sergipe.

Inicialmente, aproximadamente 100 mg de cistos foram incubados em 100 mL de água salina artificial padrão ( $35 \pm 1\%$ ) num recipiente cilindro cônico, a temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 1\%$ , sob iluminação constante e lateral e aeração. Após 18 a 24 horas de incubação, os náuplios foram transferidos para um recipiente cilíndrico contendo 200 mL de água salina, com iluminação por 24 h. Assim, náuplios do segundo ao terceiro estágio foram coletados.

Uma solução padrão de 10.000 ppm foi preparada com Tween-80 (1 mL – 2 gotas v/v), DMSO (30% v/v), e água destilada (70% v/v). Da mesma forma que para o teste larvicida foi realizada uma curva concentração-resposta nas concentrações 1, 5, 10, 50, 100, 500 e 1000 ppm em 10 mL de água. Obtendo o resultado dessa, o teste foi realizado em triplicata.

Os náuplios ficaram expostos à solução por 24 h, registrando-se o total de mortalidade. Foram feitos testes paralelos, o controle negativo utilizando Tween-80, DMSO e água, na maior concentração aplicada em cada teste, o controle positivo foi realizado utilizando o organofosforado temefós e o branco, correspondendo a apenas 10 mL de água desclorada com 10 náuplios de *Artemia* sp.

#### **4.6 Análise estatística**

Partindo dos dados de mortalidade como resultado dos bioensaios, foram realizados cálculos da concentração letal que mata 50% da população ( $CL_{50}$ ) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%), utilizando o método de análise *Probit* com auxílio do software Minitab 16<sup>TM</sup>. Em todos os testes onde ocorreu morte no ensaio controle entre 5 a 20% foi realizada a correção utilizando a formula de Abbott (ABBOTT, 1987):

$$\% \text{ CA} = \frac{\% \text{ MT} - \% \text{ MC}}{100 - \% \text{ MC}} \times 100$$

Na qual % CA é equivalente ao percentual corrigido de mortalidade, % MT é o percentual de mortalidade no teste e % MC é o percentual de mortalidade no controle (ABBOTT, 1987).

#### **4.7 Métodos de caracterização**

Para a caracterização dos compostos sintetizados em cada reação foram realizadas técnicas de definição de faixa de fusão, espectrometria de massa, espectrofotometria de absorção na região do infravermelho e espectrofotometria de ressonância magnética nuclear - RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ . É importante salientar, que para alguns compostos não foi possível a determinação através de RMN devido a interferências que ocorreram ao longo da produção do presente projeto e por isso, alguns dados ainda estão sendo processados.

As faixas de fusão foram determinadas por meio da utilização do equipamento Longen Scientific do Laboratório de Química Farmacêutica - LQF, da UFS. Na qual, para cada composto foi feita uma pesquisa prévia para avaliar se a faixa de fusão já estava presente na literatura e comparar com a posterior encontrada no LQF. No laboratório, a faixa de fusão foi determinada através da introdução de uma pequena quantidade do composto a que se quer avaliar em um capilar de vidro com uma das pontas fechadas e observação do início da fusão do primeiro cristal até total transição para a forma líquida. Primeiro com a observação de uma faixa de fusão lenta e posterior visualização de uma faixa de forma rápida.

Os espectros de Infravermelho foram realizados no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe por meio da utilização do equipamento Perkin Elmer FT-IR modelo BX. As amostras de aproximadamente 10 mg foram submetidas a uma mistura com Brometo de Potássio (KBr) e prensadas para a obtenção de uma pastilha. Posteriormente, as pastilhas de cada composto foram analisadas na faixa espectral de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

A análise espectroscópica de massas foi realizada no modo de íons positivos em um espectrômetro de massa micrOTOFII da marca Bruker (Bruker Daltonics, Billerica, EUA), equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI). A amostra diluída em acetona foi adicionada por infusão a uma taxa de fluxo de 300  $\mu\text{l}/\text{min}$  através de uma bomba de seringa. Os íons foram separados pelo método TOF (tempo de voo). Condições: temperatura

de secagem do gás, 180°C; fluxo de secagem do gás, 4 L/min; pressão de nebulização do gás, 0,4 Bar (N<sub>2</sub>); tensão capilar +3500 V; com espectros adquiridos sobre uma faixa de massa de 0 a 800 m/z. Os dados espectroscópicos foram processados pelo próprio aparelho, identificando as amostras por completo.

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) (600 MHz) e de carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C) (150 MHz) foi obtido em espectrofotômetro Varian Modelo Plus na Florida Agricultural and Mechanical University (FAMU) através da parceria com o até então estudante de doutorado sanduiche Rafael dos Reis Barreto de Oliveira. As amostras foram preparadas dissolvendo-se uma pequena quantidade da mesma em clorofórmio deuterado CDCl<sub>3</sub>. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno nos experimentos.

Os deslocamentos químicos foram referenciados para RMN <sup>1</sup>H pelos picos característicos dos Hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas deste solvente: clorofórmio (δH 7,24 ppm). Para os espectros de RMN <sup>13</sup>C foram utilizados os mesmos parâmetros de solubilização da amostra para o clorofórmio (δC 77,0 ppm). As multiplicidades das bandas de RMN <sup>1</sup>H foram indicadas segundo as convenções: s (singleto), d (dubleto), dd (duplo dubleto), ddd (triplo dubleto), t (tripleto), ps (pseudo tripleto) e m (multiplete). A constante de acoplamento (J) foi expressa em Hertz (Hz) e o número de átomos de hidrogênio foi deduzido por pico da integral relativa. Quanto aos picos de <sup>13</sup>C RMN foram relatados os deslocamentos químicos em ppm para cada pico.

#### **4.8 Modificações estruturais e Relação Estrutura-Atividade (REA)**

De forma qualitativa foi elaborado um estudo sobre a importância das modificações propostas e a Relação Estrutura-Atividade (REA) analisando o domínio das alterações estruturais sobre a atividade larvicida avaliada em CL<sub>50</sub> das moléculas sintetizadas.

Logo, para cada derivado das estruturas mães (**1**: indol; **2**: isatina; **3** e **4**: unidade da quitina) sintetizados (**1a** – **1d**, **2a** – **2e**, **3a** – **4a**) foram comparadas os dados de mortalidade baseando-se nas CL<sub>50</sub> obtidas a partir da análise estatística pelo método Probit com as características estruturais correspondentes à molécula. As observações levaram em conta quais modificações estruturais resultaram em aumento, diminuição ou anulação da atividade larvicida. Visto que as mudanças estruturais existentes entre os protótipos do indol (**1**) e os análogos (**1a** - **1d**) foram a introdução de grupo nitro, tosila e retirada de dupla ligação.

Quanto aos protótipos da isatina (**2**), as alterações analisadas entre esta e os análogos (**2a - 2e**) foram a introdução de grupos tosila, acetila e abertura do anel isatiníco. Já para os derivados de unidades da quitina (**3 e 4**) houveram tetraacetilações em ambas as estruturas (**3a - 4a**), avaliando-se assim, a influência destas modificações frente a atividade.

Buscando distinguir possíveis questionamentos acerca do padrão obtido no REA, a diferença estrutural de cada composto foi avaliada além de outros parâmetros, com base no logaritmo do coeficiente de partição (LogP) à fim de encontrar possível relação do coeficiente de partição com as atividades biológicas elucidadas. Este foi obtido pelo software ChemDraw Ultra, versão 12.0.2.1076 que disponibiliza os valores de logP a partir de dados da literatura incluídos no arquivo de relatório, e não através de cálculo.

Dessa forma, considerou-se diferentes as  $CL_{50}$  que apresentavam não sobreposição do  $IC_{95\%}$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A elaboração desse estudo pretendeu abranger a obtenção de moléculas protótipo com atividade larvicida frente ao *Ae. aegypti* Linn. sendo estas derivadas do indol, da isatina e da quitina. Assim, partiu-se de estudos antecedentes sobre a adaptação e resistência do artrópode a alguns larvicidas utilizados, seu modo de transmissão e os possíveis mecanismos de ação das moléculas desenvolvidas. Dessa forma, para as moléculas sintetizadas buscou-se semelhanças entre os derivados sintetizados com moléculas endógenas e exógenas do mosquito como a via do triptofano, o sistema quimiossensorial e a estrutura da cutícula do artrópode. Foram sintetizadas três séries de derivados, uma série de quatro compostos derivados do indol (**1a** – **1d**), uma série de cinco derivados da isatina (**2a** – **2e**) e duas estruturas derivadas da quitina (**3a** – **4a**) avaliando a atividade larvicida em potencial visto que algumas dessas moléculas já possuem outras atividades biológicas comprovadas.

Dos onze compostos, somente dez foram sintetizados e purificados por cromatografia em coluna (CC). Apenas sete destes foram recristalizados, caracterizados pelas técnicas de P.F., I.V., E.M, visto que o 2,3-dihidro-1*H*-indol (**1c**) é líquido e foi utilizado como intermediário de síntese para produção de *N*-tosilindolina (**1d**), além disso, também ocorreram problemas relacionados a síntese do 2-nitroindol (**1a**) com a produção de diversos subprodutos e necessidade de nitrogênio líquido para alcançar baixas temperaturas (-10°C) para o evento da reação. Ao longo do projeto o gerador de nitrogênio líquido do Departamento de Química da UFS utilizado para obtenção das baixas temperaturas foi danificado havendo assim a impossibilidade de repetir tal reação. Portanto, o rendimento mais baixo (o maior rendimento ocorreria para o 3-nitroindol segundo o mecanismo reacional) da primeira reação do 2-nitroindol (**1a**) foi totalmente utilizado para produção de 2-nitro-1-(tosil)-1*H*-indol (**1b**). Apenas o composto 1-tosil-1*H*-indol-2,3-diona (**2a**) possui espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e de carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C) finalizado, visto que foi sintetizado e enviado durante o período de parceria do LQF com a Florida Agricultural and Mechanical University (FAMU). Os outros dez derivados restantes estão com os espectros de RMN em produção e alguns espectros de massas.

Todos os nove compostos restantes foram submetidos ao teste biológico com larvas em estágio L3 de *Ae. aegypti* da linhagem Rockefeller e ensaio ecotoxicológico com *Artemia* sp. Os resultados referentes a estas etapas estão dispostos abaixo.

## 5.1 Síntese e caracterização

Os compostos foram obtidos através das metodologias propostas por Kneeteman et al. (2015), Che et al. (2013), Yasuo Kikugawa (1978), Jiang et al. (2013), Boraie et al. (2017), Chung et al. (2003) e Dang et al. (2014). Estes podem ser visualizados nas subseções 4.1.1 a 4.1.8 respectivamente.

Para as sínteses dos derivados do indol: Inicialmente, foi feita uma reação de nitração na posição 2 do indol para fornecer o 2-nitroindol (**1a**), seguido na subseção 4.1.2 (metodologia) da introdução do grupo tosila na posição *N*-1 do nitroindol para fornecer o 2-nitro-1-(tosil)-1*H*-indol (**1b**). Posteriormente, na subseção 4.1.3 há a síntese do 2,3-dihidro-1*H*-indol (**1c**) através da redução da dupla ligação do anel indólico com borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>). Na subseção 4.1.4 houve a introdução do grupo tosila na posição *N*-1 do indol fornecendo *N*-tosilindolina (**1d**).

As sínteses dos derivados da isatina encontram-se descritas na subseções 4.1.5 a 4.1.7. Para produção de 1-tosil-1*H*-indol-2,3-diona (**2a**), na subseção 4.1.5 houve uma síntese regioseletiva a partir da isatina com cloreto de tosila (TsCl), na presença de hidreto de sódio (NaH) e solvente (DMF) em atmosfera livre de oxigênio. A produção de *N*-acetilisatina (**2b**), na subseção 4.1.6 foi utilizado apenas anidrido acético sob refluxo por algumas horas e na subseção 4.1.7 para produção de diol derivados (**2c – 2e**) encontram-se as sínteses de 1-tosil-2,3-dihidro-1*H*-indol-2,3-diol (**2c**), *N*-[2-(1,2-dihidroxi-etil)-fenil]-4-metil-benzenossulfonamida (**2d**) e *N*-[2-(1,2-dihidroxi-etil)-fenil]-acetamida (**2e**) a partir da síntese em duas etapas utilizando produtos de partida sintetizados no presente trabalho conforme metodologia proposta por Chung et al. 2003.

Quanto as sínteses referentes aos compostos derivados da quitina encontram-se descritas na subseção 4.1.8. Para a produção de 2-(acetilamino)-2-deoxi-,1,3,4,6-tetraacetato (**3a**) e 4-azido-4-deoxi-1,2,3,6-tetraacetato (**4a**) foram feitas *O*-acetilações visando aumento do caráter lipofílico das estruturas e similaridade com fragmentos dos novos modelos bipartidos das BPU's (DANG et al., 2014; SUN et al., 2015).

Através das metodologias utilizadas foi possível sintetizar todos os compostos objetivados.

Como citado, de todas as reações as que obtiveram maiores rendimentos foram as sínteses dos compostos **1d** de 95,6 % e **2a** de 88%. Os altos rendimentos atribuídos foram

possíveis graças aos sistemas propostos para as sínteses. O mesmo é próximo ao obtido por Che et al. (2013), para a síntese de *N*-tosilindol (estrutura análoga a *N*-tosilindolina (**1d**)) esses autores alcançaram rendimento de 96%. O bom resultado obtido é fruto da proporção estabelecida entre os reagentes, que está relacionada a fatores da natureza da reação (XU; WANG, 2010). Quanto ao composto **2a** o mesmo é próximo ao obtido por Zhang et al. (2017), os pesquisadores alcançaram rendimento de 90% utilizando o produto como um intermediário de síntese obtendo-o em forma de precipitado amarelo (ZHANG et al., 2017).

São observados alguns fatores contribuintes para estes rendimentos. Os sistemas utilizados são similares. Tanto para **1d** quanto para **2a** o aumento do potencial nucleofílico em *N*-1 promovido pela adição de base (NaOH e NaH, respectivamente), pois na ausência de base tanto a indolina quanto a isatina apresentam baixo potencial nucleofílico em *N*-1. O ataque do NaH a isatina (**2**) em *N*-1 com a formação de hidrogênio gasoso e de um complexo iônico entre Na<sup>+</sup> e o *N*- da isatina ionizada com carga negativa localizada na posição *N*-1, favorece o aumento da nucleofilicidade dessa região, conforme pode ser visualizado no esquema 6 da subseção 2.8.2. Enquanto o NaOH participa da reação como base de Lewis a indolina que comporta-se como ácido de Lewis promove uma primeira reação ácido-base, com formação de água por meio da ligação covalente coordenada entre a base e o próton, proporcionando a indolina maior potencial nucleofílico conforme pode ser visualizado no esquema 5 subseção 2.8.1 (CHE, ZHIPING; ZHANG, SHAOYONG; SHAO, 2013; KIKUGAWA, 1978; ZHANG et al., 2017).

Além disso, o excesso das bases reduz a probabilidade de reações competitivas em outras posições, reduzindo a formação de subprodutos. Como também para a produção de *N*-tosilindolina, o processo termodinâmico é favorecido pela presença do catalizador de fases, o cloreto de benziltriethylamônio (TEBA), visto que este promove a solubilização parcial da base insolúvel em solvente orgânico (BOHBOT et al., 2011b; CHE, ZHIPING; ZHANG, SHAOYONG; SHAO, 2013; KIKUGAWA, 1978; ZHANG et al., 2017).

Ainda sobre a síntese de **2a** outras metodologias foram testadas inicialmente utilizando trietanolamina e diclorometano, no entanto, a síntese proporcionava diversos subprodutos e foi substituída pela de Zhang e colaboradores em que o produto final foi um precipitado amarelo (ZHANG et al., 2017).

Quanto a síntese dos derivados do indol **1a** (11%) e **1b** (68,13%), na subseção 2.8.1 esquema 1 foi relatado a maior reatividade na posição 3 do que na posição 2. Este padrão de

reatividade é sugerido tanto pela distribuição de elétrons quanto pelas energias relativas dos intermediários para substituição eletrofílica, representada pelas estruturas protonadas. Assim, os ataques na posição 3 são mais favoráveis do que na posição 2 pela retenção do caráter benzenoide do anel carbocíclico. Este padrão de reatividade não é muito afetado pela presença de um substituinte na posição 1 ou 2, embora substituintes que atraem elétrons possam diminuir a reatividade em C-3 (SUNDBERG, 2000). Por isso, a síntese do 2-nitroindol partiu do composto não substituído. Como a nitração frequentemente gera óxidos de nitrogênio que podem participar das transformações oxidativas, a nitração do indol em si é uma reação complexa. Em meios fortemente ácidos, a nitração de C-2 pode ocorrer (PELKEY; GRIBBLE, 1997; SUNDBERG, 2000). Dessa forma, a síntese foi feita com ácido nítrico em baixas temperaturas (-10°C) na tentativa de satisfazer algumas dessas condições, proporcionando energia mínima necessária, para produção do 2-nitroindol. Portanto, da reação foram obtidos três produtos, os quais foram separados e posteriormente identificados, justificando o baixo rendimento reacional de **1a** (KNEETEMAN et al., 2015).

Para o composto **1b** (68,13%) subseção 2.8.1 esquema 3, a *N* substituição é favorecida quando o anel indol está desprotonado e o meio de reação promove o nucleofilicidade do ânion indol. Logo, o ataque nucleofílico da base de Lewis NaOH ao 2-nitroindol em *N*-1. Desse modo, o oxigênio da base doa um par de elétrons para o hidrogênio do indol em *N*-1 (ácido de Lewis). Formando um complexo iônico entre Na<sup>+</sup> e 2-nitroindol ionizado com carga negativa localizada na posição *N*-1, que favorece ao aumento da nucleofilicidade dessa região no anel indólico. Como consequência, é possível o ataque nucleofílico do 2-nitroindol ao grupo tosila do cloreto de tosila levando a formação de um complexo intermediário que é estabilizado por ressonância. A estabilização da estrutura é possivelmente garantida pela saída do cloreto (Cl<sup>-</sup>) e formação de 2-nitro-1-(fenil-sulfonil)-1*H*-indol e cloreto de sódio (PELKEY; GRIBBLE, 1997; ROY, 2005; SUNDBERG, 2000).

A síntese do composto **2b** (53%), possui metodologia bastante simples em que é adicionada apenas isatina e anidrido acético em meio anidro sob refluxo obtendo ao final da reação um precipitado amarelo (AHMED T. A. BORAEI,\* EL SAYED H. EL TAMANY, IBRAHIM A. I. ALI, 2017). No entanto, as sínteses subsequentes com derivados da isatina foram as reações de menor rendimento quando comparados aos resultados obtidos por Chung e colaboradores. Para **2c** o rendimento obtido foi de 33%, **2d** 16,4% e **2e** 38,6%, enquanto os resultados encontrados por Chung e colaboradores vão de 49%, 99% e 68% respectivamente. Na síntese de **2d** ocorreram erros de procedimento como a troca da ordem de adição dos

reagentes, que pode ter levado a falta de correspondência à sequência necessária do mecanismo de reação da redução de isatinas *N*-substituídas, reduzindo o rendimento. Além disso, na subseção 2.8.2, esquema 8 pode-se observar o mecanismo sintético para o produto **2c** este foi encontrado um sólido branco, enquanto na pesquisa referencia seria encontrado um óleo. Dessa forma, as identificações subsequentes foram baseadas e comparadas aos resultados encontrados por Chung, os quais foram congruentes com a estrutura da molécula. O motivo da diferença do estado físico encontrado pode ter sido relacionado ao equilíbrio entre a forma de cadeira e forma de anel que ocorre no processo de redução das cetonas da *N*-tosilisatina (CHUNG; KIM; KIM, 2003).

Quanto aos compostos **3a** e **4a**, encontrados na sessão 2.8.3, esquema 9 e 10, respectivamente, ambos derivados da *N*-acetilglicosamina (unidade da quitina), as *O*-acetilações proporcionam a molécula um aumento do caráter lipofílico e também semelhanças estruturais com o modelo bipartite de análogos de BPU, os quais indicam que a substituição de grupos lipofílicos aromáticos ou heterocíclicos elevam a potência de compostos de acordo com sua afinidades para receptores em mosquitos. Assim, análogos de BPU com um modelo bipartido poderiam ser projetados e sintetizados levando a novos inseticidas por meio de bioensaios de triagem (DANG et al., 2014; SUN et al., 2015).

Quanto a caracterização, os derivados sintetizados das três séries apresentam faixas de fusão com valores entre 95 e 186°C para derivados do indol, 70 e 210°C para análogos da isatina, e para os derivados da quitina as faixas de fusão estão em andamento, mas na literatura é possível encontrar a faixa de fusão do composto **3a** variando de 230-232 °C e o composto **4a** não foi encontrado. As altas variações nas faixas de fusão entre os compostos da mesma série são decorrentes das modificações diretas nos anéis, como a abertura do ciclopentano da isatina, redução das cetonas e introdução do grupamento nitro no indol. As variações individuais nas faixas de fusão foram de no mínimo 2° C e no máximo 4°C.

Os resultados correspondentes ao espectro de massas dos 7 compostos analisados (**1a**, **1b**, **1d**, **2c**, **2d**, **2e** e **3b**) estão de acordo com o esperado e com o relatado na literatura. Assim, as massas encontradas para cada composto foram equivalentes as massas moleculares somadas as massas do próton e do cátion de sódio ou potássio.

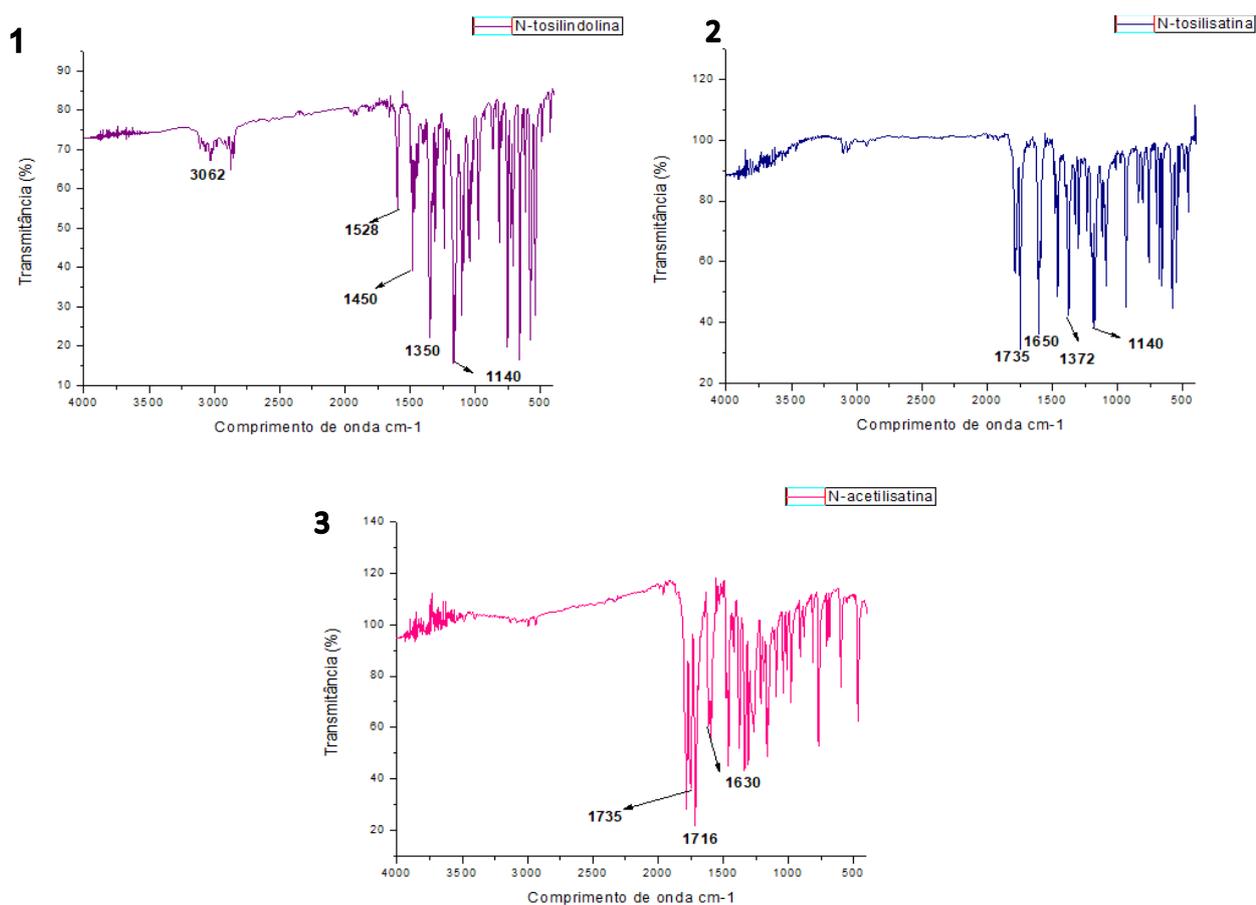
Ao considerar o método de ionização utilizado (*eletrospray*) e as características químicas individuais das moléculas, as ionizações foram previstas. As estruturas derivadas do indol e da isatina são passíveis de protonação em meio ácido devido a presença do grupo

funcional amina e amida, respectivamente. Não obstante a isso, a presença de elétrons livres, são passíveis de coordenação com metais, especialmente os da família 1A e 2A (CROTTI et al., 2006).

Em relação ao espectro de infravermelho, as bandas encontradas para todos os compostos condizem com os resultados relatados na literatura para os mesmos. Na análise dos espectros para os análogos tosilados do 2-nitroindol e da indolina (**1b** e **1d**), os derivados da isatina tosilados (**2a**, **2c** e **2d**) e derivados acetilados da isatina (**2b** e **2e**) e da quitina (**3a**), as bandas fundamentais são referentes aos grupos funcionais O=S=O e N-C=O da acetilamida, e C=O do acetil presentes nos compostos (BELWAL; FAHMI; SINGH, 2008; GAUDIO, 1996; POPP, 1975; TISOVSKÝ et al., 2017).

Todavia, aqui compararemos os espectros obtidos para o derivado do indol tosilado (**1d**) e os derivados da isatina tosilada e acetilada (**2a** e **2b**), ilustrados a seguir na **figura 16**, percebe-se a presença de bandas características destes grupos funcionais.

**Figura 16.** Espectro de absorção na frequência de infravermelho dos compostos: (1) 2,3-dihidro-1[(4-metilfenil)sulfonyl]-1*H*-indol(1d), (2) 1-tosil-1*H*-indol-2,3-diona (2a) e (3) N-acetilisatina (2b). Com número de onda expresso em cm<sup>-1</sup> em destaque.



No espectro de **1d**, ilustrado na parte **1** da figura **16**, há duas bandas intensas com números de onda de 1350 e 1140 cm<sup>-1</sup>, correspondentes a deformação axial assimétrica e simétrica de SO<sub>2</sub>, respectivamente, como podem ser visualizadas na parte **2** figura **16** (1372 – 1140 cm<sup>-1</sup>). Os derivados **1b**, **2c** e **2d** também podem ser caracterizados por bandas, referentes a esse mesmo grupo, em número de onda semelhantes. Para eles, essas duas bandas estão em uma faixa de 1350 a 1323 cm<sup>-1</sup> e 1153 e 1149 cm<sup>-1</sup>.

Zhang, Lu e Qiang Xu (2017) demonstraram a presença do grupo SO<sub>2</sub> na sulfonamida de indóis, isatinas e indolinas através de bandas com absorção em 1381 cm<sup>-1</sup> e 1177 cm<sup>-1</sup>. Para o 2-nitroindol tosilado (**1b**) ainda houveram a presença de bandas (N=O) com comprimentos de onda entre 1550 e 1373 (KNEETEMAN et al., 2015; ZHANG et al., 2017).

Conforme observado no espectro 1, para **1d** na figura **16**, uma banda média com número de onda de 3062 cm<sup>-1</sup>, corresponde a absorção de estiramento da ligação C-H do anel aromático da indolina. Essa banda não é tão aparente para os derivados da isatina, no entanto

são encontrados frequência superior ou igual ao número de onda de  $3000\text{ cm}^{-1}$  (COULADOUROS; MAGOS, 2005).

Além dessas bandas, a indolina tosilada pode ser caracterizada também por bandas de absorção entre  $1528\text{ cm}^{-1}$ , e  $1450\text{ cm}^{-1}$ . Estes comprimentos de onda correspondem respectivamente a região de número de onda que ligações C=C e CH<sub>3</sub> (dobramento) absorvem energia.

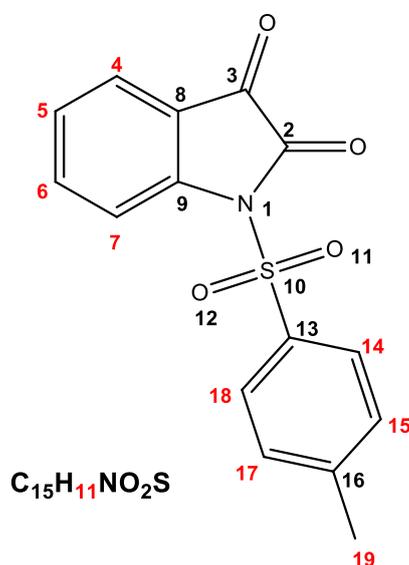
Já para os compostos derivados da isatina que apresentam duas carbonilas, uma cetônica e uma amídica, como o composto **2a**, na parte 2 figura 16, é possível identificar a presença da carbonila da cetona em aproximadamente  $1735\text{ cm}^{-1}$  e a carbonila amídica em  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Enquanto para o composto **2b** é possível ver uma sequência nos comprimentos de onda que vão desde 1735, 1716 e 1630, representando respectivamente a carbonila cetônica e amídica sobrepostas ( $1735$  e  $1716\text{ cm}^{-1}$ ) e a amida ( $1630\text{ cm}^{-1}$ ). As diferenças de absorção das cetonas amidicas se devem ao fato dos substituintes em N-1, o p-toluenossulfonila e o acetil. O aumento da absorção da ligação C=O de cetonas cíclicas com a redução do anel ocorre, pois estas necessitam do uso de maior caráter *p* para forçar as ligações C-C e formar os ângulos menores necessários, com o aumento da constante de força *k* e consequente frequência de absorção (PAVIA et al., 2015). Não obstante, para as amidas cíclicas a frequência de absorção da carbonila é aumentada devido ao efeito de tensão do anel combinado com o efeito de conjugação com o anel aromático. A falta de estiramento da ligação N-H nos comprimentos 3475 a  $3150\text{ cm}^{-1}$  confirma a presença de amida terciária. Entretanto, há menor força de ligação e maior comprimento de ligação, reduzindo a frequência absorvida da cetona amidica de **2a** como esperado pela lei de Hooke (PAVIA et al., 2015; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010).

Os derivados da isatina que foram reduzidos a diol, **2c**, **2d** e **2e** apresentam faixas de absorção entre 3294 a  $3490\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes com a literatura sobre as bandas de absorção de álcoois (CHUNG; KIM; KIM, 2003; PAVIA et al., 2008). Ao tomar como exemplo os derivados que possuem amidas **2e** e **3a**, a confirmação do grupo carbonila é conferida através da banda intensa com número de onda de  $1679\text{ cm}^{-1}$  para **2e** e  $1659\text{ cm}^{-1}$  para **3a** correspondentes as deformações axiais da ligação C=O, como pode ser visualizado no espectro ilustrado na figura 23 parte 3 do derivado **2b**. O composto **3a** apresenta ainda quatro carbonilas de ésteres que se apresentam na faixa de  $1741\text{ cm}^{-1}$ .

Os resultados obtidos são corroborados por Chung, Kneeteman e Boraiei que encontraram para os derivados **1b**, **1d**, **2a**, **2b**, **2c**, **2d**, **2e**, e **3a** bandas de absorção com os mesmos padrões descritos (AHMED T. A. BORAEI,\* EL SAYED H. EL TAMANY, IBRAHIM A. I. ALI, 2017; CHUNG; KIM; KIM, 2003; KNEETEMAN et al., 2015).

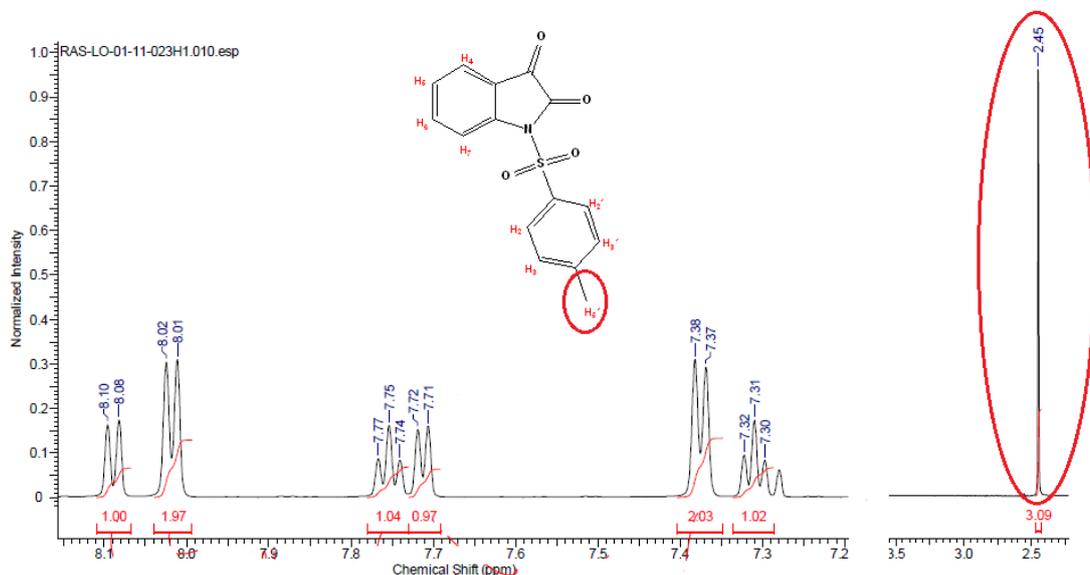
Quanto ao espectro de RMN, há apenas os resultados do composto **2a** de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  RMN, este possui 11 (onze) prótons, sendo 8 (oito) aromáticos, e 3 (três) do metil ligado ao grupo tosil, conforme pode ser visualizado na **figura 17**.

**Figura 17:** Fórmula estrutural de 1-Tosil-1*H*-indol-2,3-diona (**2a**) e sua fórmula química. Os prótons em comum estão ligados aos carbonos enumerados em destaque vermelho.



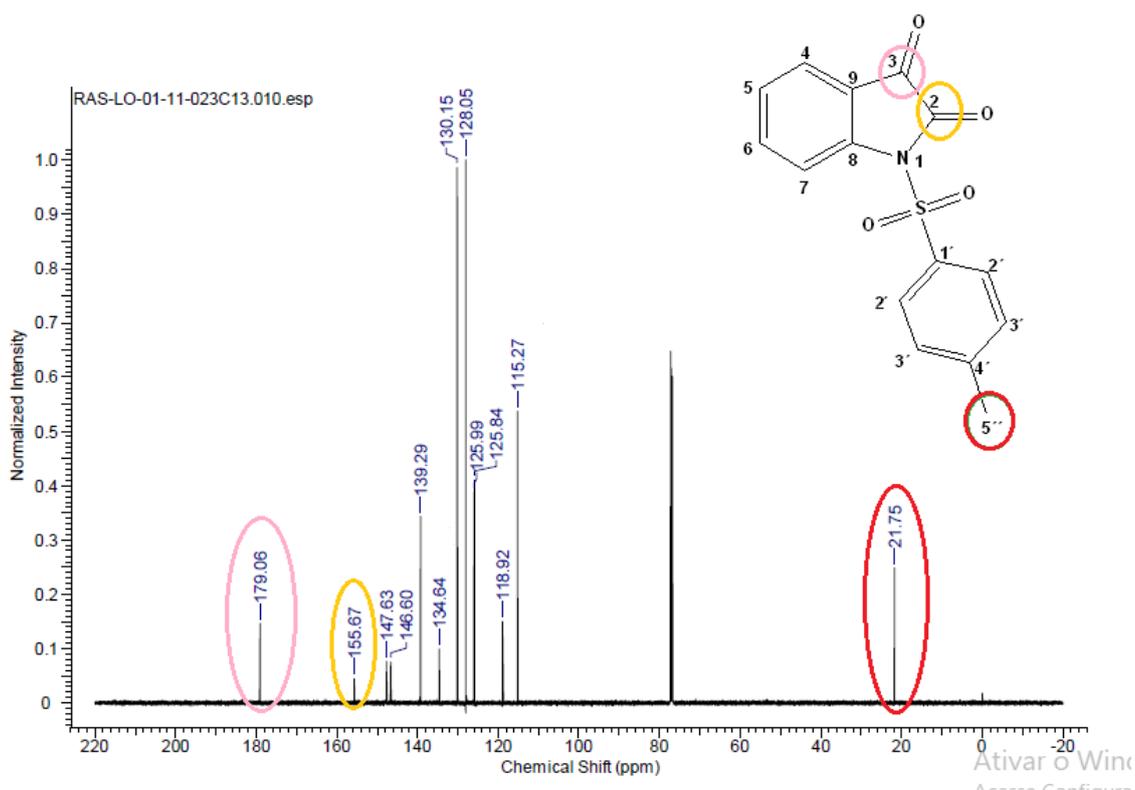
Na **figura 18** para o espectro de  $^1\text{H}$  são observados os quatro sinais de hidrogênio ligados aos carbonos do anel aromático. Dois dupletos com  $J = 8.07$  Hz e  $J = 7.70$  Hz em 8,09 e 7,71 ppm referentes a  $\text{H}_4$  e  $\text{H}_7$  respectivamente. Os sinais de  $\text{H}_5$  (7,31 ppm) e  $\text{H}_6$  (7,75 ppm) desdobram-se em pseudo tripletos com valores de  $J_1 = 7,34$ ,  $J_2 = 7.70$  e  $J_1 = 7.89$ ,  $J_2 = 8.07$  Hz. Dos prótons aromáticos do grupo benzenossulfonila  $\text{H}_2$  e  $\text{H}_2'$  duplete com  $J = 8.07$  Hz em 8.02 ppm (2 H) e  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_3'$  em 7.38 ppm com  $J = 7.70$  Hz (2 H). Há ainda um simpleto com deslocamento químico de  $\delta$  2,45 ppm referente aos prótons do metil ligado ao carbono do radical sulfonila.

**Figura 18:** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 1-tosil-1*H*-indol-2,3-diona (**2a**). Na fórmula estrutural está em destaque o carbono no qual o próton correspondente ao sinal está ligado e o sinal do espectro gerado pelo próton responsável.



O espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN é desacoplado ao próton, no qual os picos são vistos apenas nas formas de singletos. As principais características do composto **2a** (Figura 19) são os sinais com deslocamentos químicos referentes aos carbonos das carbonilas ( $\text{C}=\text{O}$ ) cetônica e amídica. Estas possuem maiores deslocamentos químicos entre 179,06 ppm e 155,67 ppm, pois a hibridização  $\text{sp}^2$  e a ligação ao átomo eletronegativo (Oxigênio) desblindando-as mais, com grande deslocamento para baixo (esquerda) no espectro. Não obstante, para a carbonila amídica (155,67 ppm), a rotação da ligação  $\text{C}-\text{N}$  é limitada, por causa da interação de ressonância entre o par de elétrons isolado do nitrogênio e a ligação  $\pi$  da carbonila. Os demais sinais estão compreendidos em uma faixa de  $\delta$  146,60 a 21,75 ppm, onde o com menor deslocamento químico ( $\delta$  21,75 ppm) equivale ao carbono do metila, enquanto os demais são equivalentes aos carbonos localizados no anel aromático central da isatina e do grupo tosila. Dessa forma, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da isatina mostra trezes sinais, correspondentes a quinze carbonos. Seis correspondentes ao anel aromático da isatina (147,63,139,29,125,99,125,84,118,92,115,27 ppm), dois às carbonilas de cetona (179,06 ppm) e amida (155,67 ppm), um correspondente ao carbono do metil do grupamento tosila ( $\delta$  21,75 ppm) e os quatro restantes ao anel do grupo tosila (146,60, 134,64, 130,15, 128,05 ppm). É importante salientar que, os dois carbonos identificados com 2' e 3' são equivalentes por simetria (química e magneticamente idênticos) e correspondem aos picos mais altos encontrados no espectro.

**Figura 19:** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 1-tosil-1H-indol-2,3-diona (**2a**). Na fórmula estrutural estão em destaque os carbonos correspondentes aos sinais em que estão ligados e o sinais do espectro gerado.



## 5.2 Atividade biológica e estudo de relação estrutura-atividade

### 5.2.1 Atividade larvicida e ecotoxicologia

Os compostos sintetizados foram avaliados quanto à atividade biológica como agentes larvicidas contra *Ae. aegypti* da linhagem *Rockefeller* no estágio larval L3. Foram adicionados grupos nitro, tosila e a retirada da dupla ligação (C2-C3) no anel indólico; Com reduções e introdução do grupo tosila e acetil na isatina e por fim tetraacetilações nos derivados da quitina a fim de avaliar modificações da atividade larvicida desses derivados.

A adição do grupamento tosila em *N*-1 no anel indólico já havia sido anteriormente estudada no Laboratório de Química Farmacêutica da UFS proporcionando a formação de *N*-tosilindol, um potente derivado indólico com ação larvicida contra *Ae. aegypti* ( $\text{CL}_{50}$  0,244 ppm) (MACEDO, 2015). No entanto, das três séries sintetizadas (11 compostos) apenas o derivado do indol 2,3-dihidro-1-[(4-metilfenil)sulfonil]-1H-indol (**1d**) ( $\text{CL}_{50}$  47,56 ppm) e os derivados da isatina, 1-Tosil-1H-indol-2,3-diona (**2a**) ( $\text{CL}_{50}$  278,51 ppm) e *N*-acetilisatina

(**2b**) (CL<sub>50</sub> 816,58) tiveram atividade. Todos os outros compostos foram atóxicos, até 1000 ppm, para as larvas de *Ae. aegypti*, impossibilitando o cálculo da CL<sub>50</sub> desses.

Assim, para a série de compostos derivados do indol em ordem decrescente de lipofilicidade levando em consideração os resultados obtidos anteriormente para o *N*-tosilindol temos *N*-tosilindol > 2-nitro-1-(tosil)-1*H*-indol (**1b**) > 2,3-Dihidro-1-[(4-metilfenil)sulfonil]-1*H*-indol (**1d**). Com alterações de lipofilicidade diminutas entre o *N*-tosilindol e o composto **1b**. Logo, os dados obtidos referentes a atividade biológica podem ratificar a hipótese de que o caráter lipofílico até certo ponto pode aumentar ou reduzir a atividade larvicida em *Ae. aegypti* (DA SILVA et al., 2015; DEVILLERS; DOUCET-PANAYE; DOUCET, 2015; HANSCH; VERMA, 2009; TAVARES, 2004). No entanto, mesmo sendo uma estrutura de lipofilicidade similar ao *N*-tosilindol, o composto **1b** o qual possui um grupamento nitro em C-2 foi inativo contra larvas de *Ae. aegypti*.

Para os compostos derivados da isatina, apenas o 1-tosil-1*H*-indol-2,3-diona (**2a**) e *N*-acetilisatina (**2b**), foram ativos em altas concentrações, quando não foram feitas modificações nas carbonilas cetônica e amídica da isatina. Os derivados 1-tosil-2,3-dihidro-1*H*-indol-2,3-diol (**2c**), *N*-[2-(1,2-dihidroxi-etil)-fenil]-4-metil-benzenossulfonamida (**2d**), *N*-[2-(1,2-dihidroxi-etil)-fenil]-acetamida (**2e**) foram atóxicos contra as larvas. Isso pode ser explicado pela correlação entre as variáveis da lipofilicidade dessas estruturas, mas também possíveis alterações nos sítios alvo de ligação dos receptores das larvas, visto que, entre o composto **2a** e o composto **2c** as modificações estruturais realizadas foram de redução das carbonilas. Dessa forma, corroborando para o esforço em compreender os grupos funcionais necessários para manter e/ou aumentar a atividade, e possivelmente levar a agentes de controle de insetos mais eficazes (BOHBOT et al., 2011a; CANTRELL et al., 2010).

Já os compostos derivados de unidades da quitina 2-(acetilamino)-2-deoxi-,1,3,4,6-tetraacetato (**3a**) e  $\alpha$ -*D*-manopiranosose, 4-azido-4-deoxi-,1,2,3,6-tetraacetato (**4a**), como a construção da estrutura desses derivados foi baseada em inibidores da síntese de quitina e há necessidade de um maior período para avaliação da atividade destes compostos, ambos foram avaliados diariamente por um período de 7 (sete) dias. Todavia, passados 6 (seis) dias havia precipitação dos compostos e posteriormente morte das larvas, não possibilitando a correlação entre a troca de cutícula, crescimento das larvas e ação desses compostos (SUN et al., 2015).

É importante citar ainda, que, apesar de serem poucos derivados de cada série de compostos e haverem poucos dados na literatura relacionados a atividade larvicida contra o

*Ae. aegypti*, os compostos escolhidos foram análogos de substâncias endógenas do próprio mosquito. Somado a isso, a resistência as substâncias comumente utilizadas resulta na busca por substâncias de caráter estrutural e mecanismo de ação diverso dos já utilizados atrelada a necessidade urgente para o desenvolvimento de alternativas para controlar esses importantes vetores de doenças (CANTRELL et al., 2010).

É natural que uma relação coerente entre os esqueletos estruturais, seus grupos substituintes, interações seletivas com os alvos e atividade larvicida no organismo em questão, tornem-se impossibilitadas. No entanto, sabendo que a atividade é resultado da molécula como um todo, não sendo dependente exclusivamente da presença ou ausência de um grupo em específico é possível fazer correlações com as séries propostas (THOMAS, 2003).

Dessa forma, avaliando resultados do controle positivo, o temefós, que apresenta CL<sub>50</sub> de 0,002 ppm com IC<sub>95%</sub> variando entre 0,002 a 0,003 ppm. Independentemente das CL<sub>50</sub> dos compostos desenvolvidos que foram ativos serem milhares de vezes menos potentes, os resultados expressam um avanço nos estudos de derivados indólicos e isatinicos com potencial atividade larvicida frente ao *Ae. aegypti*. Outroassim, não houveram mortes no controle negativo, levando a não utilização da fórmula de Abott.

Outros pontos importantes são os relacionados as atividades larvicidas dos compostos 2,3-dihidro-1-[(4-metilfenil)sulfonil]-1*H*-indol (**1d**), 1-tosil-1*H*-indol-2,3-diona (**2a**) e *N*-acetilisatina (**2b**). O primeiro é o mais ativo (CL<sub>50</sub> 47,56 ppm) em larvas de *Ae. aegypti* da linhagem *Rockefeller*, e demonstra também exercer seletividade ambiental entre organismo alvo e não alvo. Estudos ecotoxicológicos, demonstraram que 2,3-dihidro-1-[(4-metilfenil)sulfonil]-1*H*-indol (**1d**) é atóxico para náuplios de *Artemia* sp., uma espécie não alvo essencial para o ecossistema aquático, pois é base da cadeia alimentar desse. Porém, os outros compostos **2a** (CL<sub>50</sub> 278,51 ppm) e **2b** (CL<sub>50</sub> 816,58 ppm) apresentaram pouca seletividade entre os organismos com CL<sub>50</sub> 315,31 ppm e CL<sub>50</sub> 128,97 ppm, respectivamente para artemias.

Diante disso, para o Centro de Referência em *Artemia*, são considerados não tóxico para *Artemia* sp. substâncias que não causem mortes até 1000 ppm. Logo, o 2,3-dihidro-1-[(4-metilfenil)sulfonil]-1*H*-indol (**1d**), com CL<sub>50</sub> de 47,56 ppm para larvas de *Ae. aegypti*, apresenta seletividade entre estes dois organismos. Enquanto o diflubenzuron, mostrou-se

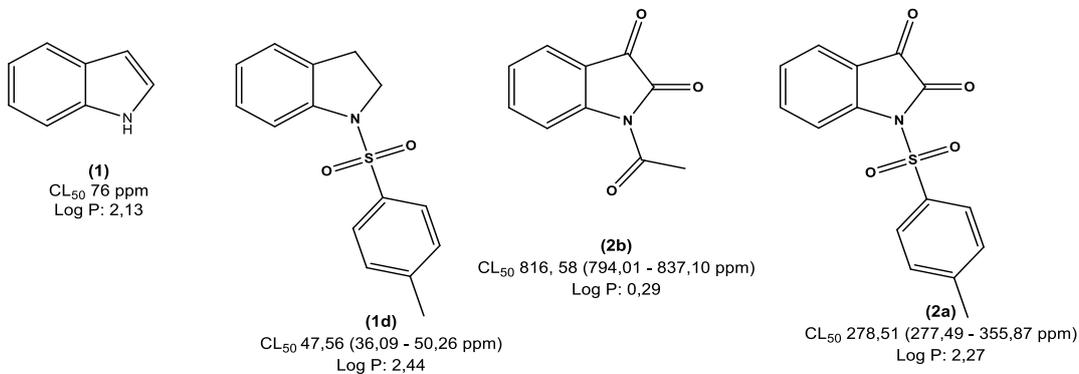
letal para náuplios de *Artemia salina* por coibir seu crescimento em concentrações entre 0,13 e 1 ppb (partes por bilhão) (GARTENSTEIN; QUINNELL; LARKUM, 2006).

### 5.2.2 *Relação estrutura atividade*

A diferença estrutural entre as três séries de derivados e sua análise qualitativa em comparação com a atividade biológica dos mesmos sobre o organismo alvo, expressa por meio da CL<sub>50</sub>, demonstra que a modificação do caráter eletrônico da molécula, e alteração do ciclopentano com redução ou não das cetonas da isatina leva a inativação dos seus análogos. Para os derivados da quitina, são necessários outros estudos específicos para estruturas que se assemelham aos inibidores da síntese de quitina. As estruturas desses compostos e suas respectivas CL<sub>50</sub> estão evidenciadas na **figura 20**.

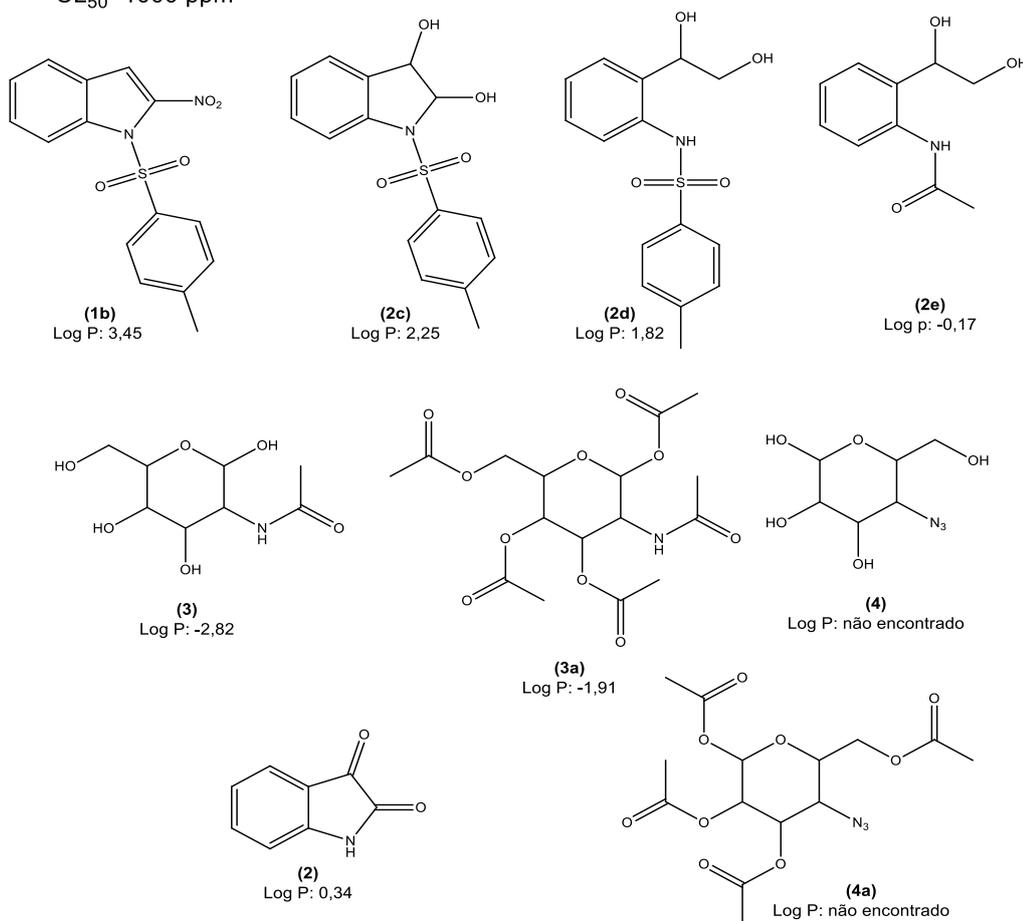
**Figura 20:** Moléculas sintetizadas e atividade biológica das mesmas frente a larvas de *Ae. aegypti* no estágio L3 expressas em  $CL_{50}$  (ppm). Os derivados do indol (1) (**1a** e **1b**), os diol derivados da isatina (2) (**2c**, **2d** e **2e**) e os derivados da quitina (3 e 4) (**3a** e **4a**) apresentam  $CL_{50} > 1000$  ppm

**Estruturas ativas**



**Estruturas não ativas**

$CL_{50} > 1000$  ppm



Apesar da obtenção de pouca diversidade de resultados quanto à atividade biológica dos compostos sintetizados, a relação entre a atividade larvicida do *N*-tosilindol (MACEDO, 2015), a redução da atividade com **1d**, e a atoxidade dos derivados 2-nitro (**1a**), 2-

nitrosilado (**1b**), revela a posição C-2 – C-3 do indol como um grupo farmacóforo para a atividade larvicida em *Ae. aegypti*. Pois, a remoção da dupla ligação (C-2 – C-3) e a introdução de grupos nitro em C-2 resultou em análogos menos potentes e inativos, enquanto que o protótipo *N*-tosilindol apresenta uma CL<sub>50</sub> de 0,244 ppm. Ou seja, a modificação em C-2-C-3 reduz sua ação, indicando que esta posição possa ser crucial na interação fármaco-receptor e não deve ser modificada. O mesmo se dá para os derivados da isatina, visto que, a diferença desta para o indol é a remoção da dupla ligação C-2-C-3 do indol e introdução de dionas nestes carbonos. O indol sem substituintes é ativo contra larvas de *Ae. aegypti* (CL<sub>50</sub>=76 ppm) enquanto a isatina é atóxica para estes artrópodes. No entanto, a *N*-substituição com o tosil e acetilação da isatina, apresentaram aumento da toxicidade mesmo esta sendo em altas concentrações. Fato que corrobora para a importância de fragmentos já ativos contra outras espécies e importância da lipofilicidade da molécula (HAN; FANG; LI, 2002; LUCIA; ZERBA; MASUH, 2013; MELIS et al., 2017).

As características hidrofóbicas em uma molécula são dessa forma, fundamentais para desencadear atividade larvicida. A existência de grupamentos apolares em uma estrutura molecular pode facilitar a passagem da substância através da cutícula das larvas, atingindo o alvo de maneira rápida (DIAS; MORAES, 2014; LIMA et al., 2014; LUCIA; ZERBA; MASUH, 2013; SANTOS et al., 2010, 2011). Segundo Hansch, a atividade contra larvas do *Ae. aegypti* aumenta com o aumento na hidrofobicidade de seus substituintes até um valor ótimo e após esse valor, é reduzido. Outras propriedades físico-químicas também são relevantes para atividade biológica como o desenvolvimento de ligações hidrogênio e tipo de conformação estrutural (HANSCH; VERMA, 2009; SOUSA et al., 2019). Estruturas químicas heterocíclicas e aromáticas também atuam como produtos promissores ao estudo do comportamento ecológico desses artrópodes (BOHBOT et al., 2013b).

As evidências que sugerem as posições C-2-C-3 como sítios farmacóforos são confirmadas ao considerar a validade e invalidade de proposições para a relação da modificação dessas regiões e as diferentes fases que as substâncias devem passar para desempenhar a atividade larvicida. Essas hipóteses ressoam as etapas de relação entre a substância e o organismo, sua passagem através da cutícula do vetor e ligação com sítios receptores.

Levando em consideração o momento em que a substância e o organismo terão contato, a introdução de grupo nitro pode ter dificultado a absorção cuticular por difusão

devido dependência do grau de ionização da molécula e com isso área da superfície de absorção. Como a membrana cuticular das larvas é lipóide, as substâncias solúveis em lipídios difundem-se de modo mais fácil (FARNESI et al., 2012, 2015; FURLANETTO; TAVARES, 2003). Logo, a atividade biológica de substâncias resulta, basicamente, de sua interação com a biofase. Esta interação é diretamente dependente de propriedades físico-químicas que modulam o estabelecimento das interações fármaco-receptor. Assim, as propriedades físico-químicas que mais influenciam essas interações são a distribuição eletrônica, a conformação estrutural e a hidrofobicidade (FURLANETTO; TAVARES, 2003). Ademais, os valores de coeficiente de partição óleo-agua (Log P) dos derivados foram reduzindo, sinalizando redução da afinidade lipofílica para eles. O Log P obtido conforme descrito na metodologia está relatado no **quadro 1**, para cada composto, inclusive para o indol, isatina e *N*-acetilglicosamina.

**Quadro 1:** Valores decrescentes de coeficiente de partição óleo-agua (logP) de cada composto sintetizado e seu composto de partida avaliado no REA.

<b>Compostos</b>	<b>CL<sub>50</sub> ppm</b>	<b>IC<sub>95</sub> ppm</b>	<b>Log P</b>
2-Nitro-1-(tosil)-1H-indol: <b>1b</b>	>1000	-	3,35
2,3-Dihidro-1-[(4-metilfenil)sulfonil]-1H-indol: <b>1d</b>	47,56	36,08 - 50,26	2,44
1-Tosil-1H-indol-2,3-diona: <b>2a</b>	278,51	235,68 - 325,07	2,27
1-Tosil-2,3-dihidro-1H-indol-2,3-diol: <b>2c</b>	>1000	-	2,25
2-Nitro-1H-indol: <b>1a</b>	>1000	-	2,25
<b>Indol: 1</b>	76	-	2,13
<i>N</i> -[2-(1,2-dihidroxi-etil)-fenil]-4-metil-benzenossulfonamida: <b>2d</b>	>1000	-	1,82
2,3-Dihidro-1H-indol: <b>1c</b>	>1000	-	1,51
<b>Isatina: 2</b>	>1000	-	0,34
<i>N</i> -acetilisatina: <b>2b</b>	816,58	794,01 - 837,10	0,29
<i>N</i> -[2-(1,2-dihidroxi-etil)-fenil]-acetamida: <b>2e</b>	>1000	-	-0,17
2-(acetilamino)-2-deoxi-,1,3,4,6-tetraacetato: <b>3a</b>	>1000	>1000	-1,91
<b><i>N</i>-acetilglicosamina (3 – 4)</b>	>1000	-	-2,32
$\alpha$ -D-Manopirranose,4-azido-4-deoxi-,1,2,3,6-	>1000	-	Não

Fonte: Banco de dados do programa ChemDraw Ultra

A lipofilicidade destes derivados não foi fator diretamente determinante sobre a atividade. Tendo o *N*-tosilindol (MACEDO, 2015) como estrutura promissora, este apresenta LogP 3,51 enquanto o derivado atóxico 2-Nitro-1-(tosil)-1*H*-indol (**1b**) sintetizado no presente trabalho possui LogP 3,35 muito similar ao do *N*-tosilindol. Assim, a introdução do grupo nitro em C-2 não foi bem tolerada, anulando a atividade referente ao seu análogo. Outro ponto é a diferença entre a isatina e *N*-acetilisatina com LogP entre 0,34 e 0,29, respectivamente. A isatina tem coeficiente de partição maior que o do seu derivado, mas não apresentou atividade contra larvas de *Ae. aegypti*, ao passo que seu derivado acetilado e com menor coeficiente mostrou-se ativo.

Além dessa observação sobre a redução dos valores de logP, a dispersão homogênea dos compostos na mistura de Tween-80 (10% v/v), DMSO (30% v/v) e água desclorada (70% v/v) para cada 20 mg de composto em 1 mL de dispersão, diminui os riscos de precipitação e indisponibilidade do ativo para o desempenho da atividade larvicida. No entanto, para os compostos **3a** e **4a** essa metodologia precisa ser revista devido ao grau de solubilidade dessas moléculas e o período necessário para avaliar possíveis ações sobre o organismo alvo.

De acordo com a etapa de interação entre a substância e os receptores, a participação de C-2-C-3 do derivado indólico pode ser esperada considerando as características eletroquímicas do composto de partida, que podem ser passadas para o derivado tosilado da indolina. Porém, para o núcleo da isatina que não possui atividade sem substituintes, a interação intermolecular poderia se dar através de substituintes em N-1. Analisando as estruturas da isatina (**2**), *N*-acetilisatina (**2b**) e 1-tosil-1*H*-indol-2,3-diona (**2a**) a introdução de fragmentos participantes de outras atividades biológicas proporcionou a molécula acréscimo em sua atividade larvicida, porém quando foram feitas reduções nas carbonilas essa ação foi anulada.

Diante desse cenário, questiona-se o poder do grupo tosila e acetila à otimização da atividade larvicida de **1d**, **2a** e **2b** em relação ao indol e a isatina. Derivados do indol *N*-1 substituídos por grupos passíveis de hidrólise enzimática foram citados como ativos contra pragas de plantações. Ainda que o tosil não tenha sido diretamente citado como um desses substituintes, a participação de derivados sulfônicos foi destacada (GANGE, 1995). Já para o grupo acetil, a acetilação de hidroxilas em geral aumentou a atividade adulticida e larvicida

contra *Ae. aegypti* em comparação aos compostos hidroxilados (PANDEY et al., 2013). Logo, esperou-se uma ação similar para os derivados amídicos. Além disso, estudos de SAR centrados no fragmento sulfona, observaram a atividade destes derivados como inibidores seletivos de canal *Ae Kir1* (canais de potássio de retificador interno seletivos para *Aedes*). Inclusive, o inibidor mais potente descrito até o momento possui um derivado sulfona e grupos substituintes acila (RAPHEMOT et al., 2014).

Quanto as estruturas derivadas de unidades da quitina com fragmentos dos modelos das BZU bipartidas, estes devem ser melhor estudados devido a sua baixa lipofilicidade e tempo necessário para observar sua plena atividade, pois os inibidores da síntese de quitina (BZU) possuem o mecanismo de ação não neurotóxico. Não obstante, a disponibilidade de um sitio de ação diferente dos inseticidas utilizados normalmente também permite que essas moléculas sejam usadas como ferramentas importantes no manejo da resistência a programas de inseticidas. Haja vista disso, o início da ação das benzoilfenilureias é lento, com vários dias sendo necessários antes de qualquer redução ser observada no número de larvas, embora a parada de alimentação das larvas geralmente ocorra muito antes (SUN et al., 2015).

Dessa forma, observando as estruturas ativas em três porções é possível depositar uma maior confiança na ação sendo decorrente de contribuições em conjunto do grupo tosil e acetil, aliado a modificações discretas ou nenhuma alteração nos carbonos C2-C3 e ao núcleo central do indol e da isatina. Para tanto, é sugerido que a região do ciclopentano do indol faça parte do grupo farmacóforo desse, pois modificações demonstraram a existência de um padrão na atividade larvicida (MACEDO, 2015; OLIVEIRA, 2018; THANABALU; POTER; HINDLEY, 1996). Apesar da limitação das moléculas quimicamente diversas propostas em expor evidências mais concretas e interligadas sobre a relação estrutura-atividade entre derivados do indol, isatina e quitina ao efeito larvicida em *Ae. aegypti*, os resultados contribuem para ratificação de estruturas promissoras e seu desenvolvimento usando abordagens convencionais de descoberta de novas substâncias.

O número de moléculas ativas foi pequeno e a relação entre estes também é reduzida. Novas triagens com estruturas quimicamente diversas podem ser obtidas na busca de novos protótipos promissores, como também estudos morfológicos das larvas quanto ao tipo de modificação que estes compostos realizam sobre estes organismos. Estudos de relação estrutura atividade quantitativo (REAQ), podem ser realizados com um número maior de estruturas quimicamente semelhantes a fim de verificar a influência de outros parâmetros

sobre a atividade esperada. Assim, ensaios moleculares podem aproveitar os resultados já dispostos, a fim de viabilizar a busca por estruturas que atuem em um sítio de ação específico.

## 6 CONCLUSÃO

Em suma, foram sintetizadas três séries de compostos quimicamente diversos, utilizando abordagens convencionais de descoberta de novas substâncias ativas contra o vetor. Sendo derivados do indol (4 compostos), isatina (5 compostos) e quitina (2 compostos), obtidos através de reações de acetilação, sulfonação e nitração. Dos onze compostos sintetizados apenas nove foram caracterizados e avaliados contra larvas L3 do *Ae. aegypti* e náuplios de *Artemia sp.*

Logo, obtendo alguns pontos de interesse. A tosilação em N-1 da indolina otimiza a atividade larvicida desse sobre o *Ae. aegypti* em estágio L3 quando em comparação com o indol (CL<sub>50</sub> 76 ppm), ao formar N-tosilindolina, que apresenta CL<sub>50</sub> 47,56 ppm, no entanto, ainda inferior ao seu análogo N-tosilindol com CL<sub>50</sub> 0,244 ppm, anteriormente produzido no laboratório. Segundo, que introduções de grupos acetil e tosil em N-1 da isatina (CL<sub>50</sub> 816,58 e 278,51 ppm, respectivamente) proporcionam aumento da potencia a esta estrutura que sem substituintes é atóxica para o vetor. Porém, modificações na região central do anel indólico e isatinico por meio de introdução de grupamentos C-2 ou redução das cetonas (C2-C3) da isatina e abertura do ciclopentano levam a formação de moléculas inativas frente a esse organismo alvo. Por último, sugere-se a identificação de um centro farmacóforo nas estruturas ativas, correspondentes ao núcleo central da isatina e do indol, especificamente os carbonos C-2-C-3.

Os análogos da isatina, 1-tosil-1*H*-indol-2,3-diona e N-acetilisatina exibiram baixo potencial larvicida, mas apresentaram toxicidade em *Artemia sp.* (CL<sub>50</sub> 315,31 e 128,97 ppm) sendo pouco seletivos ao organismo alvo (*Ae. aegypti*). A molécula mais ativa foi a da série do indol, com CL<sub>50</sub> 47,56 ppm obtida através de hidrogenação (C2-C3) do indol e introdução do grupo tosil em N-1, com alta seletividade para o organismo alvo e consequente baixa toxicidade em *Artemia sp.* (CL<sub>50</sub> acima de 1000 ppm).

Dessa forma, é possível identificar a isatina e o indol N-substituídos como moléculas protótipo diretamente relacionadas à atividade biológica contra o *Ae. aegypti*. Todavia, esse trabalho sugere que novas triagens com substituições em outras porções dessas estruturas possam ser realizadas sobre esses derivados ativos avaliando aumento ou redução da potencia das mesmas, como também, avaliação de efeitos tóxicos sobre organismos não alvo. Quanto aos derivados da quitina, há necessidade de estudos específicos sobre o tempo necessário para observar sua plena atividade.

## 7 REFERÊNCIAS

AGRAMONTE, N. M.; BLOOMQUIST, J. R.; BERNIER, U. R. Pyrethroid resistance alters the blood-feeding behavior in Puerto Rican *Aedes aegypti* mosquitoes exposed to treated fabric. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, 2017.

AHMED T. A. BORAEI, EL SAYED H. EL TAMANY, IBRAHIM A. I. ALI, AND S. M. G. Antimicrobial Evaluation of New Quinoxaline Derivatives Synthesized by Selective Coupling with Alkyl Halides and Amino Acids Esters. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 54, n. 2881, p. 1259–1265, 2017.

AKDAG, K. et al. Bazı hidrazit-hidrazon türevlerinin sentezi ve larvasidal etkileri. **Marmara Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 3, p. 120–125, 2014.

ALMEIDA, et al. Estudo epidemiológico dos casos de chikungunya no estado do Ceará. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

ALVES, P. B.; VICTOR, M. M. Reação da cânfora com boroidreto de sódio: Uma estratégia para o estudo da estereoquímica da reação de redução. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2274–2278, 2010.

ARETZ, C. D. et al. Discovery and Characterization of 2-Nitro-5-(4-(phenylsulfonyl)piperazin-1-yl)-N-(pyridin-4-ylmethyl)anilines as Novel Inhibitors of the *Aedes aegypti* Kir1 (AeKir1) Channel. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 917–931, 2019.

ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 694–699, 2010.

BACHMANN, P. et al. Dehydrogenation of the Liquid Organic Hydrogen Carrier System Indole/Indoline/Octahydroindole on Pt. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 122, n. 8, p. 4470–4479, 2018.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1. Ed. Viçosa: Editora: UFV, 2007.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Aspectos gerais da ação dos fármacos. **Química Medicinal - As Bases Moleculares Da Ação Dos Fármacos**, p. 1–60, 2015.

BARRETO, C. F. *Aedes aegypti* - Resistência Aos Inseticidas Químicos E As Novas Alternativas De Controle *Aedes Aegypti* - Resistance to the chemical insecticides and the new alternatives of *Aedes aegypti* control. **Revista eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 1, n. 2, p. 62–73, 2005.

BARROSO, I. L. D. et al. Um Estudo Sobre a Prevalência Da Dengue No Brasil: Análise Da Literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 61878–61883, 2020.

BEAUTY BJ, MARQUARDT WC. The biology of disease vectors. **Colorado: University Press of Colorado**, 632p, 1996.

BELLINATO, D. F., Viana-Medeiros, P. F., Araújo, S. C., Martins, A. J., Lima, J. B. P., & Valle, D. Resistance Status to the Insecticides Temephos, Deltamethrin, and Diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations, **Biomed Res Int**. 2016.

BELINATO, T. A.; VALLE, D. The impact of selection with Diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor, on the fitness of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–19, 2015.

BELWAL, S.; FAHMI, N.; SINGH, R. V. Behavioural dynamics in the biological control of pests: Role of silicon complexes. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 615–619, 2008.

BERNARD, E. et al. Characterization of O-acetylation of N-acetylglucosamine: A novel structural variation of bacterial peptidoglycan. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 27, p. 23950–23958, 2011.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; RIBEIRO, P. S. Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 847–852, 2009.

BHARATI, M.; SAHA, D. Insecticide resistance status and biochemical mechanisms involved in *Aedes* mosquitoes: A scoping review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 14, n. 2, p. 52–63, 2021.

BISSON, T. et al. Genetic study in *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) from Londrina (Paraná State, Brazil): an approach to population structure and pyrethroid resistance. **Rev. Bras. entomol**, v. 65, n. 1, 2021.

BOHBOT, J. D. et al. Multiple activities of insect repellents on odorant receptors in

- mosquitoes. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, n. 4, p. 436–444, 2011a.
- BOHBOT, J. D. et al. Conservation of indole responsive odorant receptors in mosquitoes reveals an ancient olfactory trait. **Chemical Senses**, v. 36, n. 2, p. 149–160, 2011b.
- BOHBOT, J. D. et al. Functional development of the octenol response in *Aedes aegypti*. **Frontiers in Physiology**, v. 4, MAR, n. March, p. 1–8, 2013a.
- BOHBOT, J. D. et al. Functional development of the octenol response in *Aedes aegypti*. **Frontiers in Physiology**, v. 4 MAR, n. March, p. 1–9, 2013b.
- BONA, Ana Caroline Dalla, Twerdochlib, Adriana Lacerda, & Navarro-Silva, Mário Antônio. Detecção do vírus da dengue em populações naturais de mosquitos. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v. 51, n. 2, p. 107-116, 2011.
- BRADY, O. J.; HAY, S. I. The global expansion of dengue: How *aedes aegypti* mosquitoes enabled the first pandemic arbovirus. **Annual Review of Entomology**, v. 65, p. 191–208, 2020.
- BRAGA, I. A.; MELLO, C. B.; PEIXOTO, A. A.; VALLE, D. Evaluation of methoprene effect on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) development in laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, 2005
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007b.
- BRAGA, I. A., LIMA, J. B. P., SOARES, S. da S., & Valle, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99(2), 199–203. 2004
- BRITO, L. P.; LINSS, J. G. B.; CAMARA, T. N.; BELINATO, T. A.; PEIXOTO, A. A.; LIMA, J. B. P.; VALLE, D.; MARTINS, A. J. Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and Its fitness cost. **Plos One**, v. 8, n. 4, 2013.
- BROGUEIRA, P.; MIRANDA, A. C. Vírus Zika : Emergência de um Velho Conhecido Zika Virus : Emergence of an Old Known Resumo Abstract. **Revista de Sociedade Portuguesa de Medicina Interna**, p. 146–153, 2017.
- BRUICE, Paula Yurkanis. **Química orgânica**. 4.ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, v.2. p. 641, 2011.

CAMARGO, L. T. F. M.; CAMARGO, A. J. Theoretical studies on the glucosamine: A systematic review. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 6, p. 1835–1852, 2019.

CANTRELL, L. et al. Structure – Activity Relationship Studies on Derivatives of Eudesmanolides from *Inula helenium* as Toxicants against *Aedes aegypti* Larvae and Adults Although there is a safe and effective vaccine for the yellow fever virus , epidemic transmission still occ. **Chemistry and biodiversity**, v. 7, p. 1681–1697, 2010.

CAVALCANTE, K. R. L. J.; TAUIL, P. L. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 26, n. 3, p. 617–620, 2017.

CHANG, C.; ORTIZ, K.; ANSARI, A.; GERSHWIN, M. E. The Zika outbreak of the 21st century. **Journal of Autoimmunity**, v. 68, 2016.

CHE, Z.; FAN, L.; ZHANG, S.; SHAO, Y.; XU, H.; YU, H.; ZHI, X.; YAO, X.; ZHANG, R. Synthesis and Quantitative Structure-Activity Relationship ( QSAR ) Study of Novel N-Arylsulfonyl-3-Acylindole Arylcarbonyl Hydrazone Derivatives as Nematicidal Agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, 5696–5705, 2013.

CHE, Z.; FAN, L. Synthesis and Quantitative Structure-Activity Relationship ( QSAR ) Study of Novel N-Arylsulfonyl-3-Acylindole Arylcarbonyl Hydrazone Derivatives as Nematicidal Agents Synthesis and Quantitative Structure-Activity Relationship ( QSAR ) Study N - Arylsulfon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013.

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

CHUNG, Y. M.; KIM, J. M.; KIM, J. N. Facile synthesis of 1-aryl-1,2-ethanediols via the reduction of N-substituted isatins. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 24, n. 1, p. 141–143, 2003.

CONSOLI RAGB, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. 1994.

COULADOUROS, E.A.; MAGOS, A.D. Total asymmetric synthesis of (-)-Phenylhistine, (-)-Aurantiamine and related compounds. Part I. **Molecular Diversity**, v. 9, n. 1–3, p. 99–109, 2005.

CORRÊA, J. M; PENAFORT, J. M. Considerações sobre biologia e utilização de *Artemia* sp.

(Crustacea: Branchiopoda: Anostraca) – Considerations about biology and use of *Artemia* sp. (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca). **Redvet**, v. 12, n. 12, 2011.

CROTTI, A. E. M. et al. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Chemical Processes Involved In The Ion Formation From Low Molecular Weight Organic Compounds. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

CUNNINGHAM, P. A. Effects of dimilin (Th 6040) on reproduction in the brine shrimp, *Artemia salina*. **Environmental Entomology**, v. 5, n. 4, 1976

D'AMATO, C., Torres, J. P. M., & Malm, O.. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental, uma revisão. **Química Nova**, 25(6a), 995–1002, 2002.

DA SILVA, J. B. P. et al. Thiosemicarbazones as *Aedes aegypti* larvicidal. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 100, p. 162–175, 2015a.

DA SILVA, J. B. P. et al. Thiosemicarbazones as *Aedes aegypti* larvicidal. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 100, p. 162–175, 2015b.

DANG, C. H. et al. Synthesis and characterization of N-acyl-tetra-O-acyl glucosamine derivatives. **RSC Advances**, v. 4, n. 12, p. 6239–6245, 2014.

DE CARVALHO ALCÂNTARA, A. F.; BARROSO, H. D. S.; PILÓ-VELOSO, D. Redução de amidas por boranos. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 300–311, 2002.

DEVILLERS, J.; DOUCET-PANAYE, A.; DOUCET, J. P. Structure–activity relationship (SAR) modelling of mosquito larvicides. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 26, n. 4, p. 263–278, 2015.

DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. **Parasitology Research**, v. 113, n. 2, p. 565–592, 2014.

DICK, GWA; et al. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Tran Royal Soc Trop. Med. Hyg.** v. 46, n. 5, 1952.

DIEGUEZ, C. M. T. et al. Os fundamentos quânticos da ressonância magnética nuclear. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 40, n. 1, p. e1310, 2018.

DOS SANTOS, I. M. et al. Classical and 3D QSAR studies of larvicidal monoterpenes against *Aedes aegypti*: new molecular insights for the rational design of more active

- compounds. **Structural Chemistry**, v. 29, n. 5, p. 1287–1297, 2018.
- DUFFY, M. R., CHEN, T.-H., HANCOCK, W. T., POWERS, A. M., KOOL, J. L., LANCIOTTI, R. S., HAYES, E. B. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, 360(24), 2536–2543.
- EL-FAHAM, A. et al. Synthesis, Characterization, And anti-Cancer Activity of some new n' (2-Oxoindolin-3-Ylidene)-2-Propylpentane Hydrazide-Hydrazones derivatives. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 14638–14655, 2015.
- FARIAS, M. P. O.; WANDERLEY, A. G.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Cálculo da CI50 (concentração inibitória média) e CL50 (concentração letal média) do óleo da semente de andiroba (*Carapa guianensis*, Aubl.) sobre *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1887), *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 2, 2012.
- FARNESI, L. C. et al. Physiological and morphological aspects of *Aedes aegypti* developing larvae: Effects of the chitin synthesis inhibitor novaluron. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.
- FARNESI, L. C. et al. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. **Journal of Insect Physiology**, v. 83, p. 43–52, 2015.
- FERNANDES, G. Isatin 1-morpholinomethyl, 1-hydroxymethyl 1-methyl, and their halogenated derivatives, redox behaviour. Dissertação submetida à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. **Revista eletrônica da Universidade de Coimbra**, 2017.
- FERREIRA, V. M. et al. Um mosquito e três doenças: ação de combate ao *Aedes aegypti* e conscientização sobre dengue, chikungunya e Zika em Divinópolis/Mg, Brasil. **Revista Brasileira De Extensão Universitária**, v. 10, n. 2, p. 49–54, 2019.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H. et al. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences*, v. 353, n. 1376, p. 1685–1693, 1998.
- FINNEY, D. J. Probit Analysis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 9, p. 1432, 1971.
- FONTOURA, N. G.; BELLINATO, D. F.; VALLE, D.; LIMA, J. B. P. The efficacy of a

chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, 2012

FORATTINI, O. **Culicidologia médica**, vol. 2. São Paulo: Edusp, 2002.

FRANCO, O. História da febre-amarela no Brasil. In História da febre-amarela no Brasil. Brasil. **Divisão de Cooperação e Divulgação**, 1976.

FRANCO, J. C. et al. O Zika vírus e os casos recentes de microcefalia no Brasil. **Revista eletrônica Universidade La Salle** p. 92, 2016.

FRANK HADLEY COLLINS. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas. **OPAS/CDC**, 2017.

FUJIWARA, G. M. et al. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, n. January, p. 238–244, 2017.

FURLANETTO, M.; TAVARES, L. C. Validação de  $\frac{1}{2}C=O$  como descritor estrutural de caráter eletrônico para aplicação em estudos de QSAR/QSPR. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 4, p. 449–456, 2003.

GANGE, D.M. Indole as insecticides and acaricides. **American Cyanamid Company**. EP0697172A1. Depósito: 18 ago. 1995. Concessão: 21 fev. 1996.

GARCIA, R. B. et al. Avaliação de géis obtidos a partir da acetilação da quitosana em meio heterogêneo. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 486–492, 2008.

GARTENSTEIN, S.; QUINNELL, R. G.; LARKUM, A. W. D. Toxicity Effects of Diflubenzuron, Cypermethrin and Diazinon on the Development of *Artemia Salina* and *Heliocidaris Tuberculata*. **Ecotoxicology**, v. I, n. Wang 1987, p. 83–90, 2006.

GAUDIO, A. C. Modelos Clássicos de Estudo Quantitativo das Reações entre Estrutura Química e Atividade Biológica. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 278–289, 1996.

GOMES, P. R. B. et al. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do *Zingiber officinale* Roscoe (Gengibre) frente ao mosquito *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 597–604, 2016.

GONZALEZ, P. V. et al. The use of *Aedes aegypti* larvae attractants to enhance the effectiveness of larvicides. **Parasitology Research**, v. 115, n. 6, p. 2185–2190, 2016.

GUTIERREZ, A. C. et al. *Leptolegnia chapmanii* (Straminipila: Peronosporomycetes) as a future biorational tool for the control of *Aedes aegypti* (L.). **Acta Tropica**, v. 169, p. 112–118, 2017.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue: an update. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 1, 2002.

HAN, Q.; BEERNTSEN, B. T.; LI, J. The tryptophan oxidation pathway in mosquitoes with emphasis on xanthurenic acid biosynthesis. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 3, p. 254–263, 2007.

HAN, Q.; FANG, J.; LI, J. 3-Hydroxykynurenine transaminase identity with alanine glyoxylate transaminase. A probable detoxification protein in *Aedes aegypti*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 18, p. 15781–15787, 2002.

HAN, Q.; BEERNTSEN, T.B.; LI, J. The tryptophan oxidation pathway in mosquitoes with emphasis on xanthurenic acid biosynthesis. **Insect Physiol**, v. 53, n. 3, p. 254–263, 2007.

HANSCH, C.; VERMA, R. P. Larvicidal activities of some organotin compounds on mosquito larvae: A QSAR study. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 260–273, 2009.

HONÓRIO, N. A. et al. Temporal Distribution of *Aedes aegypti* in Different Districts of Rio De Janeiro, Brazil, Measured by Two Types of Traps . **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 5, p. 1001–1014, 2009.

HUANG, G. Chitinase Inhibitor Allosamidin and Its Analogues: An Update. **Current Organic Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 115–120, 2012.

HUBBARD, T.D.; MURRAY, I.A.; PERDEW, G.H. Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 43, n. 10, p. 1522–1535, 2015.

J. PAGLIERO, R. et al. Rapid and Facile Synthesis of N-Benzenesulfonyl Derivatives of Heterocycles and their Antimicrobial Properties. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 8, n. 9, p. 778–791, 2011.

JAIN, RENUKA; SHARMA, KANTI; KUMAR, D. Synthesis of 4-Substituted 2- ( 4-Methylpiperazino ) pyrimidines and Quinazoline Analogs as Serotonin 5-HT 2A Receptor Ligands. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 50, n. March, p. 315–319, 2013.

JAYAKUMAR, R. et al. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v. 55, n. 7, p. 675–709, 2010.

JEANKUMAR, V. U. et al. Discovery and structure optimization of a series of isatin derivatives as Mycobacterium tuberculosis chorismate mutase inhibitors. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 83, n. 4, p. 498–506, 2014.

KAHAMBA, N. F. et al. Habitat characteristics and insecticide susceptibility of Aedes aegypti in the Ifakara area, south-eastern Tanzania. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2020.

KHAN, H. A. A.; AKRAM, W.; ARSHAD, M.; HAFEEZ, F. Toxicity and resistance of field collected Musca domestica (Diptera: Muscidae) against insect growth regulator insecticides. **Parasitology Research**, v. 115, n. 4, 2016.

KIKUGAWA, Y. Reduction of Alkylindoles with Sodium Borohydride-Aluminium Chloride in Pyridine. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 534, p. 364–370, 1978.

KIM, B. N. et al. Bacteremia due to Tribe Proteeae: a review of 132 cases during a decade (1991-2000). **Scandinavian Journal of Infections Diseases**. v. 35, n. 2, p. 98-103, 2003.

KLEIN, D. **Organic Chemistry**. 2. ed. [s.l.] Wiley, 2015.

KNEETEMAN, M. et al. Polar Diels-Alder Reactions Using Heterocycles as Electrophiles. Influence of Microwave Irradiation. **International Research Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 229–235, 2015.

KOROKOLVAS A. **Fundamentos de Farmacologia Molecular: Base para o Planejamento de Fármacos**. 1 ed. São Paulo: EDART, 1974.

KOROKOLVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. [s.l.] Guanabara Koogan, 1982.

KUMARI, A.; SINGH, R. K. Medicinal chemistry of indole derivatives: Current to future therapeutic prospectives. **Bioorganic Chemistry**, v. 89, n. May, p. 103021, 2019.

LEE, J. H.; WOOD, T. K.; LEE, J. Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 11, p. 707–718, 2015.

LI, J.; LI, G. Transamination of 3-hydroxykynurenine to produce xanthurenic acid: A major

branch pathway of tryptophan metabolism in the mosquito, *Aedes aegypti*, during larval development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 10, p. 859–867, 1997.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de saude publica**, v. 50, p. 1–7, 2016.

LIMA, J. B. P., Da-Cunha, M. P., Júnior, R. C. D. S., Galardo, A. K. R., Soares, S. D. S., Braga, I. A., Valle, D. (2003). Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of rio de janeiro and espírito santo, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 68(3), 329–333.

LIMA, J. M. et al. Prospecção fitoquímica de *sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *artemia salina*. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, p. 7–11, 2009.

LIMA, L. M. **Biologia Molecular**, v. 30, n. 6, p. 1456–1468, 2007.

LIMA, T. C. et al. Larvicidal activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and derivatives. **Chemosphere**, v. 104, p. 37–43, 2014.

LOBATO DA SILVA, S. et al. Preclinical acute toxicological evaluation of the methanolic stem bark extract of *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **Acta Amaz**, v. 46, n. 1, p. 73–80, 2016.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas. In: Koogan G, . **Dinâmica das Doenças 93 Infecciosas e Parasitárias**. 2º Ed. Rio de Janeiro; p. 75–97, 2005.

LUCIA, A.; ZERBA, E.; MASUH, H. Knockdown and larvicidal activity of six monoterpenes against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and their structure-activity relationships. **Parasitology Research**, v. 112, n. 12, p. 4267–4272, 2013.

MA, W. et al. Pyriproxyfen Resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Biotype B: Metabolic Mechanism. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 1, p. 158–165, 2010.

MACORIS, M. DE L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C. M.; GARBELOTO, V. C.; BRACCO, J. E. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, 2003.

MACEDO, N.A. Síntese e atividade de oito novos derivados do indol. 2015. **(Iniciação**

**Tecnológica em Ciências Farmacêuticas)** – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2015.

MALLET, J., BARTON, N. H., Strong natural selection in a warning-color hybrid zone. **Evolution**, 43(2), pp. 421-431, 1989.

MARCHIORI, E.; HOCHHEGGER, B.; ZANETTI, G. Manifestações pulmonares da dengue. **J Bras Pneumol.**, v. 46, n. 1, p. 10–12, 2020.

MASCARENHAS, M. D. M. et al. Simultaneous occurrence of COVID-19 and dengue: what do the data show? **Cadernos de Saude Publica**, v. 36, n. 6, 2020.

MATOS, M. A. R. et al. Are isatin and isatoic anhydride antiaromatic and aromatic respectively? A combined experimental and theoretical investigation. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 1, n. 14, p. 2566–2571, 2003.

MELIS, C. et al. Isatin: A privileged scaffold for the design of carbonic anhydrase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 68–73, 2017.

MELO, J. A.; MORAIS, J. O.; COSTA, A. F. N.; CANUTO, B. G. A.; MORAIS, A. M. B. Alterações morfológicas em *Aedes aegypti* da cidade de Patos-PB ocasionadas pelo uso do regulador de crescimento de inseto pyriproxyfen. **Journal of Medicine and health promotion**, 2017.

MELO, A. L. D. A.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. *Bacillus thuringiensis*: Mechanism of action, resistance, and new applications: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 317–326, 2016.

MERZENDORFER, H. Chitin synthesis inhibitors: Old molecules and new developments. **Insect Science**, v. 20, n. 2, p. 121–138, 2013.

MERZENDORFER, H.; ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: Structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 24, p. 4393–4412, 2003.

MINHO, A. P.; GASPAR, E. B.; DOMINGUES, R. Guia Prático para Determinação de Curva Dose-Resposta e Concentração Letal em **Bioensaios com Extratos Vegetais**, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dengue, instruções para Pessoal de Combate ao Vetor. Dengue; Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor, **Manual de Normas Técnicas**, p. 11–13, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE-SVS. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, 1 Ed, p. 157 Brasília, 2009

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Incidência de Dengue . **Brasil** , Grandes Regiões e Unidades Federadas , 1990 a 2016. 2017b;

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informações Técnicas**. 2017c [citado 28 de fevereiro de 2021]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/informacoestecnicas-febreamarela>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 14, 2021. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 14, p. 1–24, 2021.

MONTE, Z. S. et al. Pyrimidine derivatives: QSAR studies of larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 7, p. 1531–1540, 2020.

MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (denv-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67–70, 2015.

NATH, R. et al. Isatin containing heterocycles for different biological activities: Analysis of structure activity relationship. **Journal of Molecular Structure**, v. 1222, p. 128900, 2020.

NÓBREGA, M. E. B. DA et al. Surto de síndrome de Guillain-Barré possivelmente relacionado à infecção prévia pelo vírus Zika, Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil, 2015. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 27, n. 2, p. e2017039, 2018.

NUNES, B. S. et al. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v. 144, n. 2, p. 453–462, 2006.

NUNES, R. K. V. et al. Evaluation of (–)-borneol derivatives against the Zika vector, *Aedes aegypti* and a non-target species, *Artemia* sp. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 31, p. 31165–31174, 2018.

NUNES, R.K.V. Toxicidade de compostos ativos contra larvas de *Aedes aegypti* em modelo de *Artemia* sp. 2019. Tese (**Mestrado em Ciências Farmacêuticas**) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2019.

OKAUCHI, T.; ITONAGA, M.; MINAMI, T.; OWA, T.; KITO, K.; YOSHINO, H. A

general method for acylation of indoles at the 3-position with acyl chlorides in the presence of dialkylaluminum chloride. **Organic Letters**, v. 2, n. 10, p. 1485–1487, 2000.

OLIVEIRA, R. et al. Synthesis, Activity, and QSAR Studies of Tryptamine Derivatives on Third-instar Larvae of *Aedes Aegypti* Linn. **Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 6, p. 580–587, 2015.

OLIVEIRA, V. S. et al. The enzyme 3-hydroxykynurenine transaminase as potential target for 1,2,4-oxadiazoles with larvicide activity against the dengue vector *Aedes aegypti*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 22, p. 6996–7003, 2013.

OTTONI, O.; NEDER, A.V.F.; DIAS, A.K.B.; CRUZ, R.P.A.; AQUINO, L.B. Acylation of indole under friedel–crafts conditions an improved method to obtain 3-acylindoles regioselectively. **Organic Letters**, v. 3, n. 7, p. 1005–1007, 2001.

PAGLIERO, R. J. et al. Lead selection of antiparasitic compounds from a focused library of benzenesulfonyl derivatives of heterocycles. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 17, p. 3945–3949, 2017a.

PAGLIERO, R. J. et al. Lead selection of antiparasitic compounds from a focused library of benzenesulfonyl derivatives of heterocycles. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 17, p. 3945–3949, 2017b.

PAIXÃO, E. S., TEIXEIRA, M. G., & RODRIGUES, L. C. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. **BMJ Global Health**, 3(Suppl 1), e000530, 2018.

PAKRAVAN, P. et al. Biochemical and pharmacological characterization of isatin and its derivatives: From structure to activity. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 2, p. 313–335, 2013.

PANDEY, S. K. et al. Structure-activity relationships of monoterpenes and acetyl derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Management Science**, v. 69, n. 11, p. 1235–1238, 2013.

PANINI, M. et al. An overview of the main pathways of metabolic resistance in insects. **Invertebrate Survival Journal**, v. 13, p. 326–335, 2016.

PANMEI, K. et al. Lufenuron: A Potential Chitin Synthesis Inhibitor Against *Aedes aegypti* L. v. 8, n. **Iccesi** 2019, p. 154–160, 2020.

PANTOURIS, G.; LOUDON-GRIFFITHS, J.; MOWAT, C. G. Insights into the mechanism of inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase by isatin derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. April, p. 70–78, 2016.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, zika and chikungunya: Emerging arboviruses in the new world. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671–679, 2016.

PAULA, A. R. et al. Neem oil increases the persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2019.

PAVIA, D. et al. **Introdução à espectroscopia**. [s.l.] Cengage Learning, 2015.

PAVIA, D. L. et al. **Introduction to spectroscopy**, p. 708, 2008.

PELKEY, E. T.; GRIBBLE, G. W. Synthesis of 2-nitroindoles via the Sundberg indole synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 38, n. 32, p. 5603–5606, 1997.

POPP, P. D. The Chemistry of Isatin. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, v. 18, n. C, p. 1–58, 1975.

RANSON, H., N'Guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z., & Corbel, V. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? **Trends in Parasitology**, 27(2), 91–98, 2011.

RAPHEMOT, R. et al. Discovery and characterization of a potent and selective inhibitor of *Aedes aegypti* inward rectifier potassium channels. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

RASHAD, A. A. et al. A reassessment of mycophenolic acid as a lead compound for the development of inhibitors of chikungunya virus replication. **Tetrahedron**, v. 74, n. 12, p. 1294–1306, 2018.

ROBERT D. BEREMAN, DONALD HF. BAIRD, J. B. AND J. R. D. Resonance Induced Properties In Monothiocarbamates Derived From Aromatic Amines: Comparison Of The Coordination Chemistry Of Indole And Indoline Monothiocarbamates, **Journal of Coordination Chemistry**, 1983.

ROBERTSON, J., Russell, R., Preisler, H., & Savin, N. **Bioassays with Arthropods**, 2007.

RODRÍGUEZ, C. M. M.; BISSET, C. J. A.; HERNÁNDEZ, C. H.; RICARDO, Y.;

- FRENCH, L.; PÉREZ, O.; FUENTES, I. Partial characterization of esterase activity in a temephos-resistant *Aedes aegypti* strain. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 64, n. 3, 2012.
- ROY, S. A convenient synthesis of 2-nitroindoles. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 1325–1328, 2005.
- ROY, S.; GRIBBLE, G. W.; JASINSKI, J. P. 2-Nitro-1-(phenylsulfonyl)-1H-indole. **Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online**, v. 63, n. 5, p. 2628–2629, 2007.
- RUEL, D.; YAKIR, E.; BOHBOT, J. D. Supersensitive odorant receptor underscores pleiotropic roles of indoles in mosquito ecology. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, n. January, p. 1–8, 2019.
- SANTOS, S. R. L. et al. of Phenylpropanoids , Terpenes , and Related Compounds. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1049–1054, 2010.
- SANTOS, S. R. L. et al. Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 150–153, 2011.
- SANTOS, V. S. V.; CAIXETA, E. S.; JÚNIOR, E. O. C.; PEREIRA, B. B. Ecotoxicological effects of larvicide used in the control of *Aedes aegypti* on nontarget organisms: Redefining the use of pyriproxyfen. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 80, n. 3, 2017.
- SARWAR M, Salman M. Insecticides resistance in insect pests or vectors and development of novel strategies to combat its evolution. **International Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering**, 1, 344–351, 2015.
- SEIXAS, G. et al. Insecticide resistance is mediated by multiple mechanisms in recently introduced *Aedes aegypti* from Madeira Island (Portugal). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–16, 2017.
- SELVAM, P. et al. Synthesis and anti-HIV activity of 4-[(1,2-dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidene) amino]-N(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl)-benzene sulfonamide and its derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 4, p. 313–316, 2001.
- SHAH, R. M.; SHAD, S. A.; ABBAS, N. Mechanism, stability and fitness cost of resistance to pyriproxyfen in the house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 119, n. 1, p. 67–73, 2015.

SHARP, R. A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. **Agronomy**, v. 3, n. 4, p. 757–793, 2013.

SHEN, SHENGQIANG; DONG, L. Q Synthesis, Optimization, and Evaluation of Glycosylated Naphthalimide Derivatives as Efficient and Selective Insect  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase OfHex1 Inhibitors.pdf. **J. Agric. Food Chem.**, v. 67, p. 6387–6396, 2019.

SILVA, T. M. S. DA et al. Effects of *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae) on the developmental reproductive biology of *Aedes aegypti* / Efeitos da *Indigofera Suffruticosa* Mill (Fabaceae) na biologia reprodutiva do desenvolvimento de *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, p. 2384–2399, 2021.

SILVA, H. H. G. Período de quiescência dos ovos e ciclo de vida de *Aedes aegypti* ( Linnaeus , 1762 ) ( Diptera , Culicidae ) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 1, p. 113–114, 1998.

SILVA, M. Síntese Assistida Por Micro-Ondas De Tiossemicarbazonas Derivadas Da Isatina Com Potencial Atividade Biológica. (**Dissertação de Mestrado**). Universidade Federal da Paraíba, 2018.

SILVA, R. B. et al. Do isolamento à síntese da convolutamidina. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 924–929, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. [s.l.] Grupo Gen - LTC, 2010.

SIMAS, N. K. et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilterpenóides. **Química Nova**, v. 27, n. 01, p. 46- 49, fev. 2004.

SINGH, R. et al. Chitin, chitinases and chitin derivatives in biopharmaceutical, agricultural and environmental perspective. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 9985–10005, 2020.

SOARES, S. S.; VALLE, D.; RAMOS, R. P.; RIBEIRO GALARDO, A. K.; CUNHA, M. P.; BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; JÚNIOR, R. C. DA S. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo,

- Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 3, 2003.
- SOUSA, J. R. et al. Synthesis and larvicidal activity of indole derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Applied Entomology**, n. August, p. 1–10, 2019.
- SUN, R. et al. Benzoylurea Chitin Synthesis Inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 31, p. 6847–6865, 2015.
- SUNDBERG, R.J. Electrophilic Substitution Reactions on the Indole Ring. In: RICHARD J.S. **Organic Chemistry**. Elsevier Ltd, V. 18, p. 1–92, 1970.
- SUNDBERG, R. J. The Chemistry of Indoles. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, v. 7, p. 1–14, 2000.
- TALYULI, O. A. C.; ROJAS, V. B.; TARACENA, M. L.; SOARES, A. L. M.; OLIVEIRA, J. H. M.; OLIVEIRA, P. L. The use of a chemically defined artificial diet as a tool to study *Aedes aegypti* physiology. **Journal of Insect Physiology**, v. 83, 2015
- TARGANSKI, S. K. et al. Larvicidal activity of substituted chalcones against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and non-target organisms. **Pest Management Science**, v. 77, n. 1, p. 325–334, 2021.
- TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631–639, 2004.
- THANABALU, T.; PORTER, A. G.; HINDLEY, J. Purification and identification of a metabolite from *Escherichia coli* which is toxic to mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, n. 3, p. 306–308, 1996.
- THOMAS, G. **Química medicinal : uma introdução**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2003.
- TISOVSKÝ, P. et al. Effect of structure on charge distribution in the Isatin Anions in aprotic environment: Spectral study. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1–22, 2017.
- VASCONCELOS; CARVALHO, R. EPIDEMIAS DE FEBRE AMARELA RELACIONADAS A DESASTRES AMBIENTAIS. **Ciência e Tecnologia em busca de inovações empreendedoras**, v. 3, n. September, p. 55–59, 2015.
- VASCONCELOS, P. F. DA C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 9–10, 2015.

VIEIRA, C. Investigação Farmacogn stica E Biológica De Folhas De Indigofera suffruticosa Mill SOBRE Aedes aegypti. **UFPE**, p. 1–68, 2011.

VIEIRA, J. R. C. et al. Oviposition and embryotoxicity of indigofera suffruticosa on early development of aedes aegypti (Diptera: Culicidae). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 4–9, 2012.

VIEIRA SANTOS, V. S. et al. Ecotoxicological effects of larvicide used in the control of Aedes aegypti on nontarget organisms: Redefining the use of pyriproxyfen. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 80, n. 3, p. 155–160, 2017.

VILA-CARRILES, W. H.; ZHAO, G.; BRYAN, J. Defining a binding pocket for sulfonylureas in ATP-sensitive potassium channels. **FASEB J.** 21, 18–25, 2007.

WANG, N. et al. Synthesis and anti-osteoporosis activity of novel Teriparatide glycosylation derivatives. **RSC Advances**, v. 10, n. 43, p. 25730–25735, 2020.

WATTS, D. M. et al. Effect of temperature on the vector efficiency of Aedes aegypti for dengue 2 virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 36, n. 1, p. 143–152, 1987.

WILSON, K.; WALKER, J. M. (EDS.). Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. 7. ed. [s.l.] **Cambridge University Press**, 2009.

WHO, World Health Organization. Global vector control response 2017–2030. **WHO**, 2017 a. Disponível em: <<http://www.who.int/vector-control/publications/global-control-response/en/>>. Acesso em: 26 de fevereiro de 2021.

WHO, World Health Organization. Fact sheet: Vector-borne diseases. **WHO**, 2017b. Disponível em:< <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>>. Acesso em: 26 de fevereiro de 2021

WHO. World Health Organization. Microcephaly.**WHO**, 2018b. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/microcephaly>>. Acesso em: 01 de mar o de 2021.

WHO. World Health Organization. Zika virus. **WHO**, 2018c. Disponível em:< <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>>. Acesso em: 01 de mar o de 2021.

- WU, J. et al. Design, synthesis and insecticidal activities of novel pyrazole amides containing hydrazone substructures. **Pest Management Science**, v. 68, n. 5, p. 801–810, 2012.
- WU, W. et al. Development of multiplex real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of Zika, dengue, yellow fever, and chikungunya viruses in a single tube. **Journal of Medical Virology**, v. 90, n. 11, p. 1681–1686, 2018.
- XU, H.; WANG, Y. An efficient synthesis of N-arylsulfonylindoles from indoles and arylsulfonyl chlorides in the presence of triethylbenzylammonium chloride (TEBA) and NaOH. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 125–127, 2010.
- XU, H.; WANG, Y.; Antifungal agents. Part 5: Synthesis and antifungal activities of aminoguanidine derivatives of N-arylsulfonyl-3-acylindoles. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 24, p. 7274–7277, 2010a.
- ZHANG, L. et al. PPh<sub>3</sub> Mediated Reductive Annulation Reaction between Isatins and Electron Deficient Dienes to Construct Spirooxindole Compounds. **Journal of Organic Chemistry**, v. 82, n. 11, p. 5782–5789, 2017.
- ZHOU, L. et al. Isatin compounds as noncovalent SARS coronavirus 3C-like protease inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 12, p. 3440–3443, 2006.