



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

RAFAELA KAROLINA VIANA NUNES

TOXICIDADE DE COMPOSTOS ATIVOS CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti* EM MODELO DE *Artemia* sp.

São Cristóvão - SE

2019

RAFAELA KAROLINA VIANA NUNES

**TOXICIDADE DE COMPOSTOS ATIVOS CONTRA LARVAS DE
Aedes aegypti EM MODELO DE *Artemia* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Sergipe, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Sócrates Cabral de Holanda Cavalcanti
Química e Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos

São Cristóvão - SE
2019

N972t Nunes, Rafaela Karolina Viana
Toxicidade de compostos ativos contra larvas de *Aedes aegypti* em modelo de *Artemia sp.* / Rafaela Karolina Viana Nunes ; orientador Sócrates Cabral de Holanda Cavalcanti. – São Cristóvão, SE, 2019.
57 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Vetores de doença - Controle. 2. Larvas. 3. Inseticidas. 4. Indicadores (Biologia). 5. Toxicologia ambiental. I. Cavalcanti, Sócrates Cabral de Holanda, orient. II. Título.

CDU 615.285.7

RAFAELA KAROLINA VIANA NUNES

**TOXICIDADE DE COMPOSTOS ATIVOS CONTRA LARVAS DE
Aedes aegypti EM MODELO DE *Artemia* sp.**

Dissertação apresentada a Universidade
Federal de Sergipe, como parte das
exigências para a obtenção do título Mestre
em Ciências Farmacêuticas

São Cristóvão, ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientador:

Documento assinado digitalmente



SILVIO SANTANA DOLABELLA

Data: 08/01/2023 12:48:18-0300

Verifique em <https://verificador.itl.br>

1º Examinador:

Documento assinado digitalmente



CARLOS DIAS DA SILVA JUNIOR

Data: 06/01/2023 14:13:17-0300

Verifique em <https://verificador.itl.br>

2º Examinador:

Com muito amor, a toda minha família Viana.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente por sempre me fortalecer e trilhar meu caminho, dando força e sabedoria para seguir em frente nos momentos de desânimo.

A minha família, especialmente à minha querida mãe Isa Maria, uma mulher que sempre me inspirou a ser o que sou hoje.

A todos os professores e amigos desta jornada que me motivaram através de palavras, conselhos e ações. Em especial, a minha grande amiga e Dra Andrea Yu Kwan Villar Shan, que me motivou nesta jornada científica desde o primeiro projeto de iniciação científica, me fez acreditar que meu sonho era possível.

À Universidade Federal de Sergipe – UFS, aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade em compartilhar conhecimentos.

Obrigada a todos meus amigos de infância, colegial e UFS. Agradeço todo apoio e convivência ao longo desta jornada, saibam que vocês foram essenciais.

Meu muito obrigada às técnicas do Departamento de Farmácia Layane e Maiana, por serem companheiras desde a minha graduação.

A toda equipe do Laboratório de Química Farmacêutica, minhas meninas Thaysnara, Nathália e Luana, o Rafael, e ao meu orientador Prof. Dr. Sócrates que abriu as portas e teve confiança e generosidade em me receber como aluna de mestrado. Sou grata por tudo!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo financiamento desse projeto.

RESUMO

Dengue, febre amarela, chikungunya e Zika são doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). O controle deste vetor, por meio de pesticidas químicos não seletivos, pode trazer impactos negativos a organismos não alvo, essenciais para a manutenção de ecossistemas, além de gerar cepas resistentes aos seus efeitos. Novas alternativas precisam apresentar-se mais seletivas e ecologicamente viáveis. Neste sentido, o Laboratório de Química Farmacêutica (LQF) localizado na Universidade Federal de Sergipe vem desenvolvendo novas moléculas ativas contra larvas do *Ae. Aegypti*, com o propósito de reduzir a incidência dessas doenças. Em busca de avançar nos estudos acerca do controle do vetor com moléculas potencialmente larvicidas que causem o mínimo de efeitos tóxicos a organismos não alvo, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade aguda dos compostos larvicidas da Biblioteca do LQF, frente ao bioindicador artemia, por meio da análise da seletividade destas substâncias. A artemia é um dos organismos muito utilizados em análise ambiental por apresentar resposta nítida a pequenas variações na qualidade do ambiente. Para o cálculo da seletividade, a atividade larvicida dos compostos previamente sintetizados no LQF foi comparada com a atividade letal 50% (CL₅₀) para náuplios de *Artemia sp.* A CL₅₀ frente a artemia foi obtida em ensaios com concentrações variadas dos compostos larvicidas em água marinha artificial. As análises mostraram um índice de seletividade (IS) variável entre todos compostos testados, sendo os derivados do indol aqueles que apresentaram seletividade altamente promissora, destacando-se o derivado 1-[(4-metilfenil)sufonil]-1*H*-indol que apresentou IS >6148. Outros estudos ecotoxicológicos deverão ser realizados para avaliar os efeitos desses compostos frente a diferentes organismos da biota aquática e níveis tróficos.

Palavras chave: Náuplios, bioindicadores, vetor, seletividade, ecotoxicológico.

ABSTRACT

Dengue, yellow fever, chikungunya and Zika are diseases transmitted by the *Aedes aegypti* Linn mosquito. (Diptera: Culicidae). The control of this vector, through non-selective chemical pesticides, can bring negative impacts to non-target organisms, essential for the maintenance of ecosystems, besides generating strains resistant to its effects. New alternatives need to be more selective and ecologically viable. In this sense, the Laboratory of Pharmaceutical Chemistry (LQF) located at the Federal University of Sergipe has been developing new active molecules against Larvae of *Ae. aegypti*. to reduce the incidence of these diseases. To advance studies on vector control with potentially larvicide molecules that cause minimal toxic effects to non-target organisms, the present study aimed to evaluate the acute toxicity of larvicide compounds from the LQF Library, in front of the artemia bioindicator, through the analysis of the selectivity of these substances. Artemia is one of the widely used organisms in environmental analysis because it presents a clear response to small variations in the quality of the environment. For the calculation of selectivity, the larvicidal activity of the compounds previously synthesized in the LQF was compared with the lethal activity 50% (LC50) for *Artemia sp* nauplios. The CL50 against artemia was obtained in trials with varied concentrations of larvicide compounds in artificial marine water. The analyses showed a variable selectivity index (Is) among all compounds tested, and the indole derivatives were those that presented highly promising selectivity, especially the derivative 1-[(4-methylphenyl)sufonil]-1H-indol that presented IS >6148. Other ecotoxicological studies should be carried out to evaluate the effects of these compounds against different aquatic biota organisms and trophic levels.

Keywords: Nauplii, bioindicators, vector, selectivity, ecotoxicological.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do borneol (a) e indol (b).	9
Figura 2. Estrutura química do organofosforado temefós.	12
Figura 3. Estrutura química do piriproxifeno.	13
Figura 4. Ciclo de vida do microcrustáceo <i>Artemia</i> sp.	15
Figura 5. <i>Artemia</i> sp. representada em suas fases de desenvolvimento; Ovos (A); náuplios I (B); náuplios II (C); náuplios III (D).	16
Figura 6. Estrutura química dos derivados de éster de borneol. Cada grupo R, representa um derivado obtido da reação (1.1 – 1.12).	20
Figura 7. Estrutura química do 1-[(4-metilfenil)sufonil]-1- <i>H</i> -indol (3.3).	22
Figura 8. Estruturas químicas do (-)-borneol e seus doze derivados com suas respectivas nomenclaturas.	27
Figura 9. Estruturas químicas dos derivados do <i>N</i> -tosilindol e suas respectivas nomenclaturas.	28
Figura 10. Estruturas químicas dos quinze derivados α -clorocetofenonas e suas respectivas nomenclaturas.	29
Figura 11. Estruturas químicas dos derivados com o grupo benzenosulfonila e suas respectivas nomenclaturas.	30
 Esquema 1. Mecanismo de síntese para formação dos derivados <i>N</i> -tosilindol (3.1-3.3).	21
Esquema 2. Síntese dos derivados 2-amino- α -cloroacetofenona (5.1 – 5.15).	23

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores da concentração letal 50% (CL₅₀) (mg/L) e intervalo de confiança 95% (IC) contra *Aedes aegypti* e *Artemia* sp. para derivados do (–)-borneol.37
- Tabela 2.** Valores da concentração letal 50% (CL₅₀) (mg/L) e intervalo de confiança 95% (IC) contra *Ae. aegypti* e *Artemia* sp. para derivados do indol (1b).39
- Tabela 3.** Valores da concentração letal 50% (CL₅₀) (mg/L) e intervalo de confiança 95% (IC) contra *Ae. aegypti* e *Artemia* sp. para derivados α-cloroacetofenonas.41

LISTA DE ABREVIATURAS

Ae. aegypti - *Aedes aegypti*

AchE - acetilcolinesterase

A. salina - *Artemia salina*

Bti. - *Bacillus thuringiensis*

β -CD - beta-ciclodextrina

CHIKV - Chikungunya vírus

CL₅₀ - Concentração letal que mata 50% da população em estudo

DCM - Diclorometano

DDT - Dicloro-difenil-tricloroetano

DENV - Denominação atribuída aos sorotipos do vírus da dengue

DFB - Diflubenzuron

IC - Intervalo de Confiança

IC₅₀ - Índice Letal de 50% da população em estudo

IS - Índice de Seletividade

LQF-UFS - Laboratório de Química Farmacêutica- Universidade Federal de Sergipe

OF - Organofosforado

OMS - Organização Mundial de Saúde

R - Radical

RCI - Reguladores de Crescimento de Insetos

REAQ - Relação estrutura atividade quantitativa

UBV - Ultra Baixo Volume

ZIKV - Vírus zika

LISTA DE SÍMBOLOS E FÓRMULAS

AlCl₃ - Tricloreto de Alumínio

Ca - Número de Náuplios vivos no Controle

CuO - Óxido de cobre

DMSO - Dimetilsufóxido

hab. - habitantes

H₂O - Água

NaOH – Hidróxido de sódio

sp. - espécie

Ta - Número de náuplios no teste

TEBA - Benzil Trimetil Amônio

TsCl - Cloreto de toсила

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE SÍMBOLOS E FÓRMULAS	vi
1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Considerações sobre o vetor <i>Aedes aegypti</i>	10
2.2 Estratégias de controle vetorial	11
2.3 Ecotoxicologia	13
2.3.1 Ecotoxicologia: visão geral	13
2.3.2 Microcrustáceo <i>Artemia</i> sp.	14
2.4 Larvicidas Ativos do Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal de Sergipe.....	19
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Geral.....	25
3.2 Específicos	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Obtenção dos compostos.....	26
4.2 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Artemia</i> sp.	31
4.2.1 Procedimento experimental.....	31
4.2.2 Preparação da solução teste.....	31
4.2.3 Exposição dos náuplios II-III.....	31
4.2.4 Análise estatística	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Artemia</i> sp.	34
5.1.1 Derivados do borneol	34
5.1.2 Derivados do indol.....	38
5.1.3 Derivados das α -cloroacetofenonas	40
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

No contexto atual das doenças transmitidas por vetores, as arboviroses transmitidas por mosquitos são problemas importantes de saúde pública, especialmente em regiões de clima tropical. O *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae) é uma espécie de ampla distribuição geográfica e de grande importância epidemiológica por suas fêmeas transmitirem vírus associados as doenças dengue, febre amarela, Zika e chikungunya. Os sintomas clássicos associados a essas doenças são febres, erupção cutânea, dor de cabeça, mialgia e artralgia (Diniz et al., 2015; Calvo et al., 2016).

A dengue é considerada um problema de saúde pública a nível mundial, principalmente em países tropicais onde as condições climáticas favorecem a proliferação do vetor. Pesquisas estimam que mais de 50% da população mundial está em risco de infecção pelo vírus da dengue (Mustafa et al., 2015; Bohm et al., 2016). Em 2019, foram registrados 273.193 casos de dengue no país com uma taxa de incidência de 131 casos/100 mil habitantes (MS, 2019).

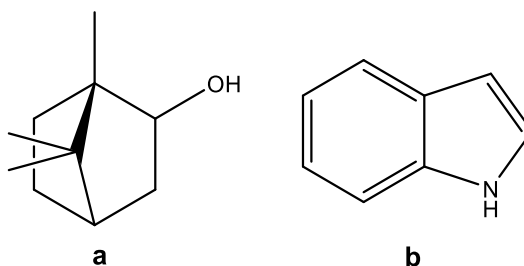
A chikungunya e a Zika transmitidas pelo vírus da chikungunya (CHIKV) e o vírus da Zika (ZIKV), respectivamente, surgiram no biênio 2014-2015 no Brasil. O ZIKV está associado à malformação congênita, incluindo microcefalia e doenças neurológicas graves como a síndrome de Guillain-Barré (Cugola et al., 2016).

Diante da gravidade, ações são realizadas no sentido de diminuir a incidência dessas doenças e uma das maneiras mais eficazes é o controle vetorial. Larvicidas sintéticos, tais como organofosforados, têm sido utilizados em vários países, porém, a resistência das larvas dos mosquitos a estes pesticidas tem reduzido sua eficácia (Galvão et al., 2019). Além disso, deve-se considerar os efeitos tóxicos sobre o meio ambiente pela contaminação do solo, da água e do ar. Os ambientes estuarinos, por exemplo, estão propensos a receber diferentes fontes residuais de pesticidas e, conseqüentemente, organismos que vivem neste ambiente sofrem ação destes produtos (Abe et al., 2014; Srinivasan et al., 2018).

O Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal de Sergipe (LQF-UFS) tem investido em pesquisas para o desenvolvimento de moléculas inéditas

que apresentem potencial larvicida seletivo para o *Ae. aegypti*. Tais moléculas foram desenvolvidas a partir de dois protótipos de importância significativa no controle larval. A primeira molécula, o (–)-borneol (Figura 1a), é um monoterpeneo presente no óleo essencial de plantas com atividade larvicida; apresenta em sua estrutura uma hidroxila disponível para derivatização, o que torna possível sintetizar uma série homóloga com potencial larvicida. Em estudos prévios, o (–)-cloroacetato de bornila, exibiu a maior potência larvicida da série derivada do borneol (CL₅₀ de 92 µM). A segunda molécula, o indol (Figura 1b), é derivada do aminoácido triptofano, de fácil modificação estrutural, que apresenta em sua estrutura um anel aromático heterocíclico presente em várias substâncias essenciais às reações metabólicas do mosquito (Han et al., 2002; Bohbot et al., 2011). Dentre a série homóloga do indol o 1-tosil-1*H*-indol com CL₅₀ de 0,9 µM apresentou atividade larvicida relativamente próxima à do temefós (larvicida de uso comercial).

Figura 1. Estrutura química do borneol (a) e indol (b).



Fonte: Nunes (2019).

Espera-se que novos derivados sintetizados a partir das moléculas previamente mencionadas além de potencialmente larvicidas, apresentem-se seletivos ao vetor *Ae. aegypti*, reduzindo efeitos nocivos ao meio ambiente.

A determinação da seletividade e risco de toxicidade a organismos (bioindicadores) afetados por agentes químicos são feitas através de ensaios de ecotoxicidade (Hawkins et al., 2018). Assim, o bioindicador *Artemia* sp., foi escolhido a partir de um estudo prévio, para avaliar a toxicidade aguda destes compostos e avançar na pesquisa do desenvolvimento e melhoramento destes larvicidas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações sobre o vetor *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae) é originário do Egito, na África, e espalhou-se pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta desde o século XVI por meio de navios que traficavam escravos. Este vetor foi descrito cientificamente pela primeira vez em 1762; no entanto, o seu nome definitivo, *Ae. aegypti*, só seria estabelecido em 1818 (Instituto Oswaldo Cruz, 2016). Por conta da fácil adaptação ao meio ambiente e de sua capacidade de transmitir doenças, este mosquito tornou-se potencialmente nocivo à saúde humana.

O mosquito apresenta ampla dispersão nos ambientes urbanos, preferencialmente no intra e no peridomicílio humano. Raramente são encontrados em ambientes semi-silvestres ou onde não há presença intensa do homem. Segundo Pereira et al. (2014), a atividade humana pautada por hábitos equivocados de utilização dos recursos hídricos e gerenciamento dos resíduos, contribuiu para aumentar a incidência do mosquito nas zonas urbanas.

Seus criadouros preferenciais são recipientes artificiais, tanto aqueles abandonados a céu aberto que servem como reservatório de água de chuva, como os utilizados para armazenar água para uso doméstico. A presença de criadouros em ambientes próximos ao homem favorece a rápida proliferação da espécie por dois aspectos: condições ideais para reprodução e fontes de alimentação (Braga et al., 2007; Belinato et al., 2012).

O *Ae. aegypti* é o principal vetor do vírus da dengue e, entre as Américas, o Brasil é o país mais afetado por esse patógeno considerado endêmico. Recentemente, outros dois arbovírus transmitidos por este vetor se espalharam rapidamente, o chikungunya (CHIKV) e o Zika (ZIKV). O ZIKV tem outras rotas possíveis de transmissão incluindo de mãe para filho, transmissão sexual e de sangue. Além de sintomas como erupção cutânea, febre e dores no corpo, o ZIKV causa microcefalia e Síndrome de Guillain-Barré (Wang et al. 2017; Garcia et al. 2018).

Considerando a eficácia parcial da vacina contra a dengue e por não existir alternativas antivirais para tratamento da Zika e chikungunya, o controle do *Ae. aegypti* continua ser a medida mais eficaz para prevenção destas doenças (Wang et al. 2017).

2.2 Estratégias de controle vetorial

A prevenção da incidência e surtos de doenças transmitidas pelo *Ae. aegypti* ocorre pelo controle mecânico, biológico e ou químico (George et al., 2015).

O controle mecânico é feito por agentes de endemias em parceria com a população, cujas ações estão centradas em detectar reservatórios naturais ou artificiais de água que possam servir como possíveis focos ou criadouros do mosquito. Durante a fase larval, estruturas sensoriais são limitadas, isto é refletido ao modo de alimentação destas larvas em seus criadouros, o que facilita o manejo de estratégias de controle do mosquito (Gonzalez et al., 2015; Zara et al., 2016).

O controle biológico busca eliminar o vetor transmissor por meio dos seus inimigos naturais, uma estratégia bastante favorável ecologicamente sendo o exemplo mais conhecido o uso de peixes larvófagos, considerados bio-inseticidas (ex. *Betta splendens*). Estas formas de controle fazem parte de políticas públicas que devem incluir estratégias apropriadas para minimizar a incidência do mosquito (Lima et al., 2015; Yamashita et al., 2018).

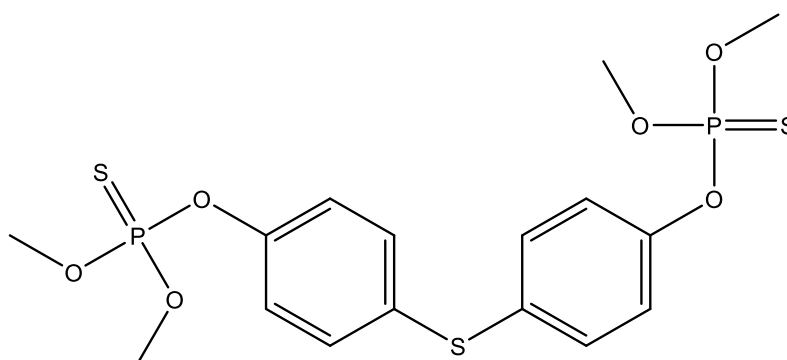
O controle químico é baseado no uso de inseticidas. O primeiro pesticida a ser empregado foi um organoclorado, o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), de efeito prolongado e que, por apresentar produtos bioacumulativos lipossolúveis de difícil degradação e absorção tecidual significativa foi substituído por organofosforados (Amato et al., 2002).

Os organofosforados (OF) são utilizados como aduictidas de pulverização aérea, como nebulizações em Ultra Baixo Volume (UBV), cujas aplicações são feitas apenas em períodos de altos índices de infestação (Aponte et al., 2013; Garciduenas et al., 2018). O OF mais conhecido é o temefós ($C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$) (Figura 2) que tem como mecanismo de ação a inibição irreversível da enzima acetilcolinesterase (AChE) no sistema nervoso central e periférico, atuando na fase larval do mosquito (Bagheri et al., 2018). Seu uso foi documentado em 1967, quando o vetor da dengue foi

reintroduzido no Brasil e, devido à epidemia de dengue em 1986, foi intensificado, sendo durante muito tempo o único larvicida disponível no país. No entanto, a aplicação por longa data deste larvicida, levou a propagação de populações resistentes e a sua substituição por outros larvicidas e novas estratégias de controle.

A resistência é resultado de alterações genéticas que podem afetar as características fisiológicas ou comportamentais do vetor (Sá et al. 2019). A estratégia foi utilizar um diferente larvicida a cada quatro anos, com o objetivo de retardar o desenvolvimento de resistência variando produtos em estágios distintos do ciclo de vida do mosquito (Garcia et al., 2018). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a utilização de um novo larvicida deve ser complementar ao controle mecânico e aprovada para uso em água potável, com a constante vigilância sob o risco em expor a população a um contaminante (Bastos et al. 2016). Ressalta-se que o temefós não foi totalmente substituído na época.

Figura 2. Estrutura química do organofosforado temefós.

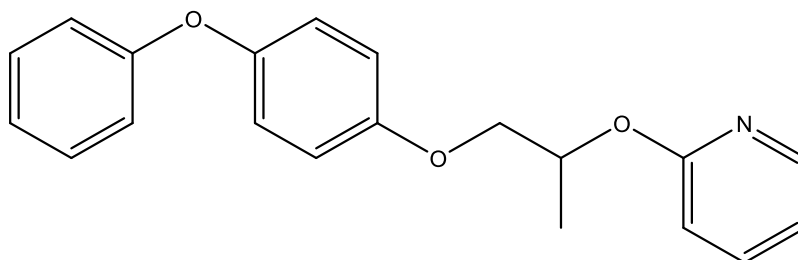


Fonte: Nunes (2019).

Em 2009, surgiu uma nova alternativa entre os agentes de controle químico, os Reguladores de Crescimento de Insetos (RCI), um grupo de pesticidas que atuam inibindo fatores fundamentais ao crescimento e desenvolvimento dos insetos. Em geral, os RCI são altamente eficazes contra larvas do vetor, conhecidos por ter baixos níveis de toxicidade, bem como uma margem de segurança contra a biota não-alvo (Lau et al. 2015). Exemplos de RCI são diflubenzuron (DFB) e novaluron que atuam como reguladores da síntese de quitina e o piriproxifeno que é análogo ao hormônio juvenil e atua na metamorfose da larva inibindo seu desenvolvimento. De acordo com a OMS, o piriproxifeno (Figura 3) é o larvicida mais utilizado inclusive em substituição

à toxina de bactérias entomopatogênicas, *Bacillus thuringiensis var. israelenses* (Bti), um larvicida biológico cuja eficácia vem diminuindo devido à resistência das larvas do mosquito (Belinato; Valle, 2015).

Figura 3. Estrutura química do piriproxifeno.



Fonte: Nunes (2019).

Vale salientar que embora diferentes níveis de resistência tenham sido identificados ao longo dos anos, os inseticidas químicos ainda são ferramentas de controle muito utilizadas e empregadas pelos órgãos responsáveis. Neste sentido, a adoção de novos compostos com mecanismos de ação diferentes é o principal passo a seguir, bem como medidas que se apresentem-se seletivas minimizando impactos a organismos não-alvo (Bowman et al., 2016).

2.3 Ecotoxicologia

2.3.1 Ecotoxicologia: visão geral

A Ecotoxicologia é a ciência que dá suporte ao enfrentamento dos problemas de poluição nos diferentes compartimentos ambientais aos organismos que ali vivem. Estudos utilizando bioindicadores são capazes de responder previamente à toxicidade de compostos químicos, sinalizando riscos ecotoxicológicos de modo a atenuar seus prováveis impactos (Hutchinson et al., 2006; Silva et al., 2015).

Nas últimas décadas, uma série de pesquisas e protocolos regulamentados de toxicidade aquática foram projetados para testar substâncias prontamente solúveis ou quimicamente estáveis (Hutchinson et al., 2006). Diversos órgãos de proteção ambiental, como a Agência de Meio Ambiente do Canadá e a Agência de Proteção do Meio Ambiente dos Estados Unidos, e de padronização como a Sociedade Americana

para Testes e Materiais, Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico, Associação de Comunidades Analíticas e Organização Internacional para Padronização, têm se concentrado na elaboração e implementação de sistemas de diagnóstico, os quais constituem a base para geração de estratégias que visem proteger os ecossistemas (Costa et al., 2008).

O efeito tóxico de uma amostra química deve ser avaliado para as espécies mais representativas da biota aquática, de preferência pertencentes a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar. Assim, há necessidade de definir quais organismos deve-se utilizar como indicador de toxicidade ambiental. Agências e autoridades de proteção ambiental e o Departamento de Conservação do Meio Ambiente de Nova Gales do Sul – Austrália utilizam com frequência os estágios larvais de *Daphnia* sp. para avaliar a toxicidade dos inseticidas em amostras de afluentes (Gartensein et al., 2006).

Um organismo bastante utilizado como bioindicador é a *Artemia* pertencente a classe de Branchiopodos, microcrustáceos aquáticos que devido à sua posição na cadeia alimentar como consumidores primários, desempenham um papel importante na dinâmica do ecossistema aquático. A *Artemia salina* (Linnaeus, 1758) é uma espécie de, muito utilizada como bioindicador em ensaios de laboratório em função da sua facilidade de manipulação e do seu baixo custo econômico (Pereira et al., 2014, Santos et al., 2017).

2.3.2 Microcrustáceo *Artemia* sp.

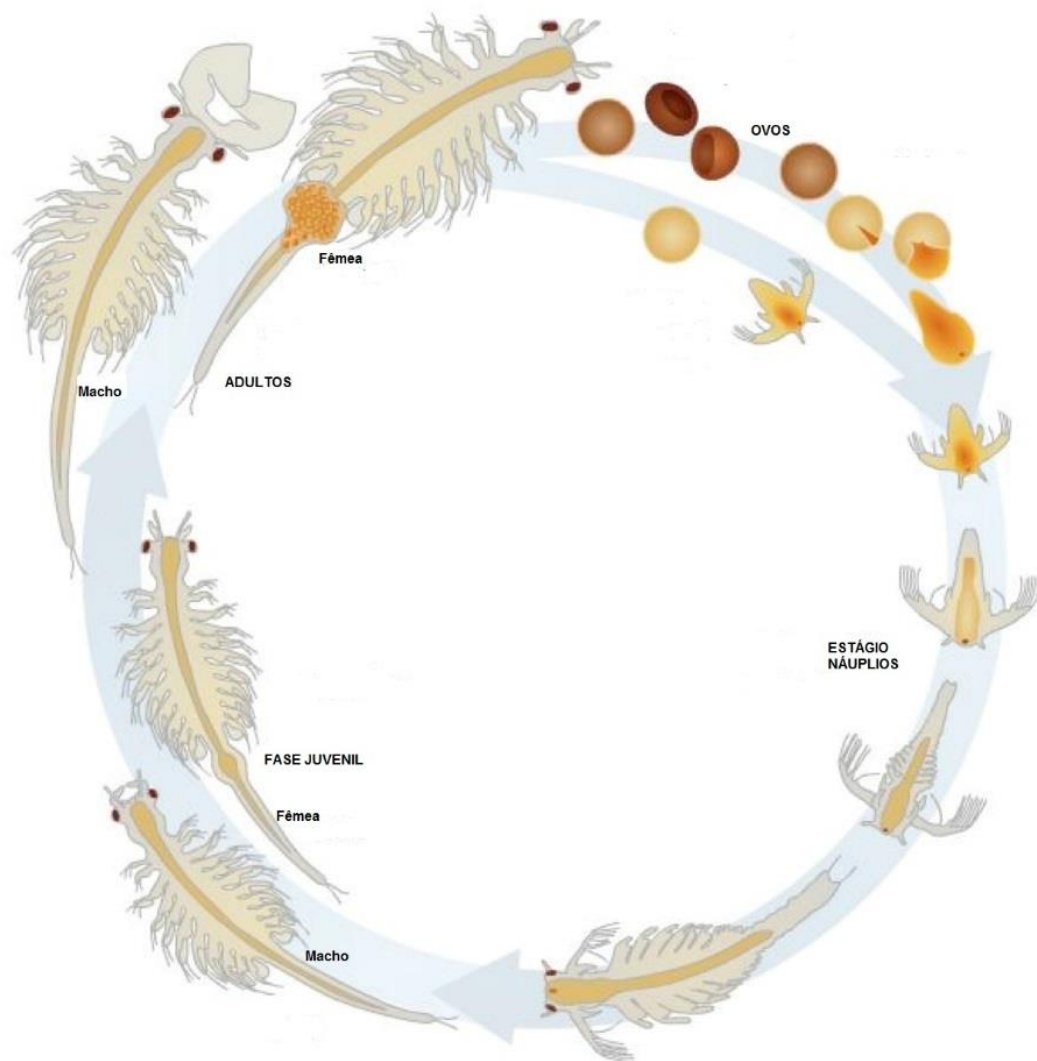
Artemia sp. é um microcrustáceo da ordem Anostraca que vive em lagos hipersalinos, alimentando-se principalmente de fitoplâncton, caracterizado por ser um importante consumidor primário, estando adaptado para sobrevivência em lagoas onde suportam variações de salinidade. A salinidade de locais como o Mar Vermelho (39 g de sal/L) ou o Mar Morto (81 g de sal/L) é tão alta que este microcrustáceo é um dos poucos organismos que podem sobreviver junto à algumas espécies de bactérias e microalgas (Varó et al., 2006).

A artemia é um organismo cosmopolita com papel fundamental na cadeia alimentar do ambiente marinho. Apresenta tolerância natural que permite ser frequentemente utilizada como modelo biológico de ambientes marinhos em

ecotoxicologia quando comparada a outros organismos teste menos adaptados a variações abióticas (Nunes et al., 2006; Herawati et al., 2014; Libralato et al., 2016; Johari et al., 2018).

Os testes com *Artemia* sp. podem envolver ensaios com seus ovos ou através dos seus náuplios cultivados em laboratório. Dentre as principais vantagens do uso deste organismo em testes de toxicidade, destacam-se: (i) rapidez (isto é, apresenta rápido ciclo de vida (Figura 4), 24-72h, (ii) custo efetividade, (iii) a disponibilidade de náuplios. Sua reprodução pode ser sexuada ou por partenogênese (sem fertilização); porém, em condições ambientais adversas, sua forma de reprodução altera-se para eclosão de ovos (Nunes et al., 2006; Varó et al., 2018).

Figura 4. Ciclo de vida do microcrustáceo *Artemia* sp.

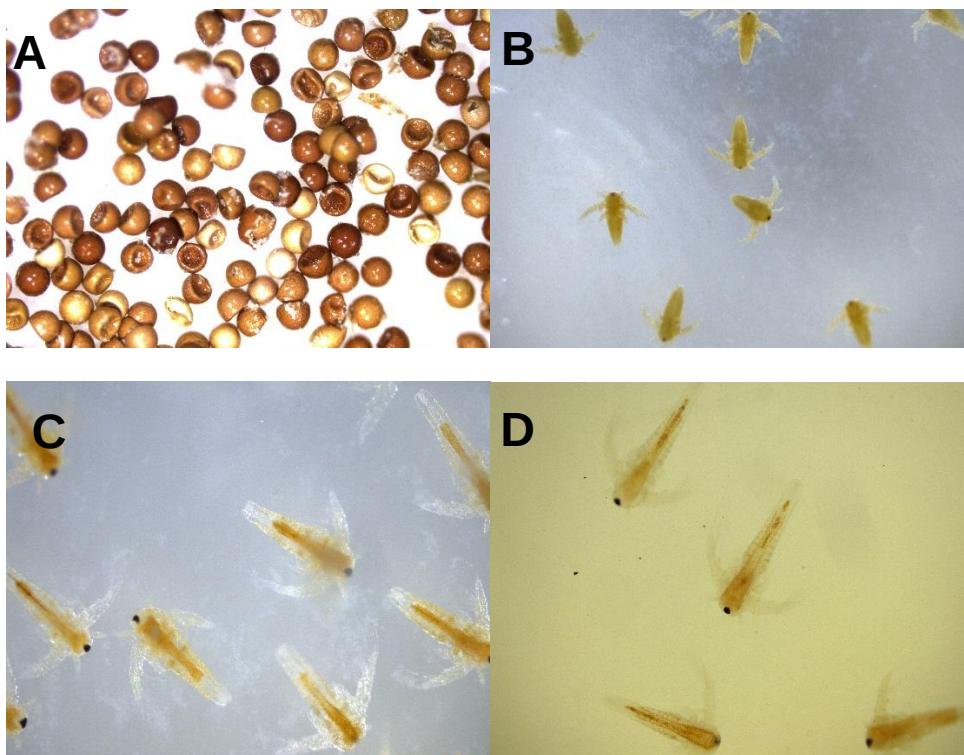


Fonte: [http:// edu.glogster.com/glog/brine-shrimp/1vjilxm4fcx?=glogpedia-source](http://edu.glogster.com/glog/brine-shrimp/1vjilxm4fcx?=glogpedia-source)

É importante salientar que tais ovos preservam o embrião, podendo ser mantidos secos sob condições anóxicas, o que lhes garantem ser conservados por longos períodos e, de preferência, em recipiente fechado à temperatura ambiente. Quando reidratados, os embriões retornam ao seu desenvolvimento dando origem aos náuplios de primeiro estágio larval. Neste estágio são utilizados como alimento natural para peixes e crustáceos em aquiculturas, pois contém alta quantidade de proteína e aminoácidos (Mandhav et al., 2017).

Morfologicamente, seu exoesqueleto apresenta cutícula constituída por quitina e outros minerais, sendo sua função principal impedir que o crustáceo perca água para o ambiente, bem como permitir periodicamente sua muda (Astrop et al., 2015). Os náuplios apresentam 400 a 500 µm de comprimento, tem cor marrom-laranja (por acumulação de reserva vitelínica), um olho vermelho na região da cabeça e três pares de apêndices: primeiro par de antenas (função sensorial), segundo par de antenas (função locomotora e filtradora) e as mandíbulas (função de absorção dos alimentos, somente a partir da fase náuplios II) (Vanhaecke; Persone, 1981; Corrêa et al., 2011).

Figura 5. *Artemia* sp. representada em suas fases de desenvolvimento; Ovos (A); náuplios I (B); náuplios II (C); náuplios III (D).



Fonte: Nunes (2019).

Na fase náuplios I, o microcrustáceo não se alimenta, pois seu trato digestivo não é funcional. Após algumas horas, consomem toda reserva vitelínica para assumir a fase náuplios II. Já nesta fase, começam a filtrar pequenas partículas de 1 a 50 μ m.

Os náuplios de artemia (Figura 5) são comumente utilizados para examinar a toxicidade a agentes químicos, efeitos de bioacumulação, ou seja, quando peixes alimentados por náuplios de artemia, exposto a um agente químico (pesticida), passam por um processo de bioacumulação. Este processo é importante para avaliar o consumo humano de peixes contaminados (Nunes et al., 2006; Ozkan et al., 2015; Mandhav et al., 2017).

Nos últimos anos, o uso de modelos de invertebrados aquáticos para avaliar os efeitos toxicológicos de contaminantes ambientais tornou-se prevalente. As características morfológicas desse microcrustáceo demonstram interações significativas com o meio aquático, fazendo com que enfrente uma exposição maior ao risco de contaminantes ambientais em comparação com outras espécies aquáticas (Wang et al., 2017). Além disso, observa-se que o ensaio com este microcrustáceo apresenta boa reprodutividade, tornando-se um excelente bioindicador para estudos de ecotoxicidade. De acordo com Libralato et al. (2016), náuplios de artemia foram

usados para testar a toxicidade de um amplo espectro de substâncias químicas. O DFB em ensaio de toxicidade demonstrou efeito sobre a reprodução da *A. salina* (Cunningham, 1976).

Gartensein et al. (2006) demonstraram que o DFB teve forte efeito no desenvolvimento de *A. salina* após 48h de tratamento e forte efeito inibitório sobre os náuplios I que evoluíram para o náplios II. A porcentagem de náuplios I que progrediram para náuplios II no ensaio utilizando 0,13; 1 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de DFB, foi de 70%, 16% e 2% respectivamente. A CL_{50} para náuplios de *A. salina* quando expostas ao DFB por 48h foi de 0,37 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Neste mesmo estudo, os náuplios foram expostos a DFB, cipermetrina e diazon e a CL_{20} após 48h foi de 4,33; 6,88 e 8,33 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Assim, novas alternativas químicas devem apresentar-se inócuas ou seletivas ao organismo alvo.

2.4 Larvicidas Ativos do Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal de Sergipe

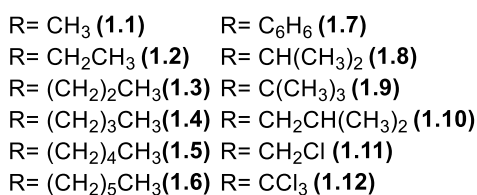
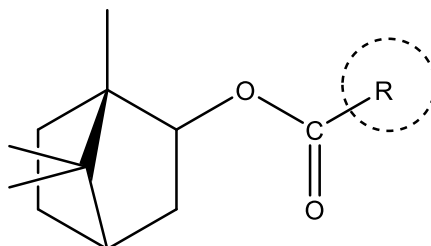
As pesquisas realizadas no LQF-UFS buscam o desenvolvimento de novos compostos larvicidas frente ao *Ae. Aegypti* a partir de moléculas com mecanismos de ação diferentes bem como alternativas que na literatura apresentem eficácia, como a eficácia larvicida dos óleos essenciais contra *Ae. aegypti* e outros mosquitos (Fontes et al., 2012).

Óleos essenciais são constituídos de compostos bioativos (monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides) biodegradáveis em produtos não-tóxicos e potencialmente adequados para uso em programas de manejo integrado (Jayakumar et al., 2016).

Tendo em vista o propósito de avaliar a atividade de compostos de origem natural, o LQF-UFS desenvolveu modificações na molécula do borneol, um monoterpeneo bicíclico encontrado no óleo essencial de plantas com atividade larvicida como *Thymus staureoides* Cosson, *Ocimum basilicum* Linn. e *Clausena dentata* Wild, a fim de determinar o perfil biológico destes derivados frente a larvas do mosquito *Ae. Aegypti* (Nunes et al., 2018).

A síntese e a atividade larvicida dos derivados do borneol foi previamente realizada por Martins (2016) utilizando a metodologia descrita por Devlin et al. (2005) e Matos e Andrade (2008), com modificações. Utilizou-se cloreto de acila como reagente, piridina como base e diclorometano (DCM) como solvente e obteve-se 12 derivados de ésteres de borneol, como mostrado na Figura 6.

Figura 6. Estrutura química dos derivados de éster de borneol. Cada grupo R, representa um derivado obtido da reação (1.1 – 1.12).



Fonte: Nunes (2019).

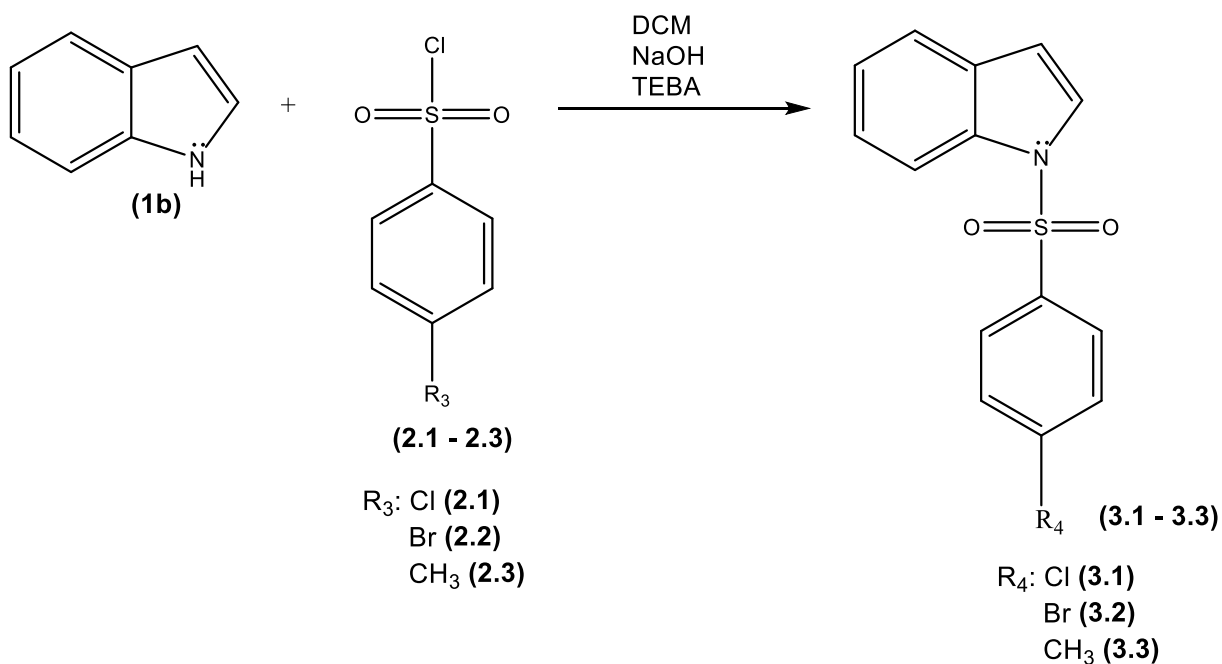
Outra molécula promissora nos estudos da equipe LQF-UFS foi o indol (Figura 1b, página 2), derivado do aminoácido triptofano, que tem em sua estrutura um anel aromático heterocíclico presente em várias substâncias essenciais às reações metabólicas do vetor *Ae. aegypti* (Bohbot et al., 2011). A via bioquímica deste aminoácido é importante para a síntese de omocromos (pigmentos dos olhos em alguns insetos) e destoxificação de espécies reativas contendo radical oxigênio (Han et al., 2002).

Relatos na literatura destacaram que o indol exibiu toxicidade para larvas do *Ae. aegypti* com CL₅₀ de 108 µM e a adição de um grupo metila na posição 3 do anel indólico, conseguiu aumentar a atividade larvicida resultando em uma CL₅₀ de 16 µM (Thanabalu et al., 1996).

Em estudo desenvolvido pela equipe do LQF-UFS, algumas séries homólogas foram sintetizadas com a hipótese de inibir o metabolismo do triptofano na larva do *Ae. aegypti*. Esta hipótese considera que a inibição irá gerar radicais livres causando a morte da larva. Os derivados sintetizados por Macedo et al. (2017) foram obtidos conforme metodologia de Che et al. (2013), através de uma síntese regioseletiva a partir do indol (1b) com cloreto de tosila (TsCl), na presença de cloreto de benzil trimetil

amônio (TEBA), hidróxido de sódio (NaOH) e solvente (DCM). Os derivados ativos do *N*-tosilindol estão representados no esquema 1 de síntese abaixo:

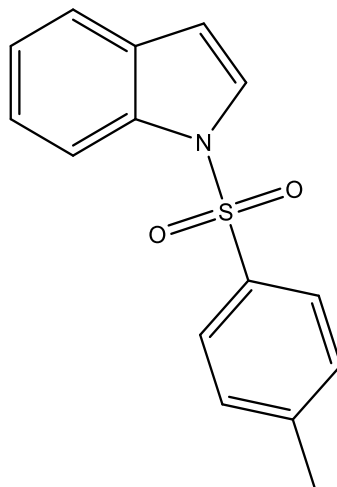
Esquema 1. Mecanismo de síntese para formação dos derivados *N*-tosilindol (**3.1-3.3**).



Fonte: Nunes (2019).

Neste estudo, a Relação Estrutura Atividade Quantitativa (REAQ) mostrou que a inclusão destes grupos em regiões específicas do anel, em especial o grupo tosila introduzido no nitrogênio, resultando no 1-[(4-metilfenil)sufonil]-1-*H*-indol (Figura 5), proporcionou uma melhor atividade frente a larvas do *Ae. aegypti* (dados não publicados), demonstrando o avanço nas pesquisas desenvolvidas pela equipe LQF-UFS. Estudos de REAQ objetivam racionalizar e aperfeiçoar a busca por compostos promissores, ou seja, testar compostos com determinadas propriedades já conhecidas as quais serão fundamentais para uma atividade biológica satisfatória (Oliveira et al., 2014).

Figura 7. Estrutura química do 1-[(4-metilfenil)sufonil]-1-*H*-indol (**3.3**).



Fonte: Autor

A equipe LQF-UFS direcionou seus estudos à química das anilinas e suas possibilidades reacionais. Um processo reacional para obtenção de anilinas é a reação de Wohl-Que. As anilinas podem reagir com ácidos carboxílicos ou até mais prontamente com cloreto de acila e anidridos. Um exemplo obtido por este tipo de reação é a fenazina, um derivado da anilina que possui ação antimalárica, anti-HCV, anticâncer, tuberculostática, antibiótica e antioxidante (Forezi, 2011).

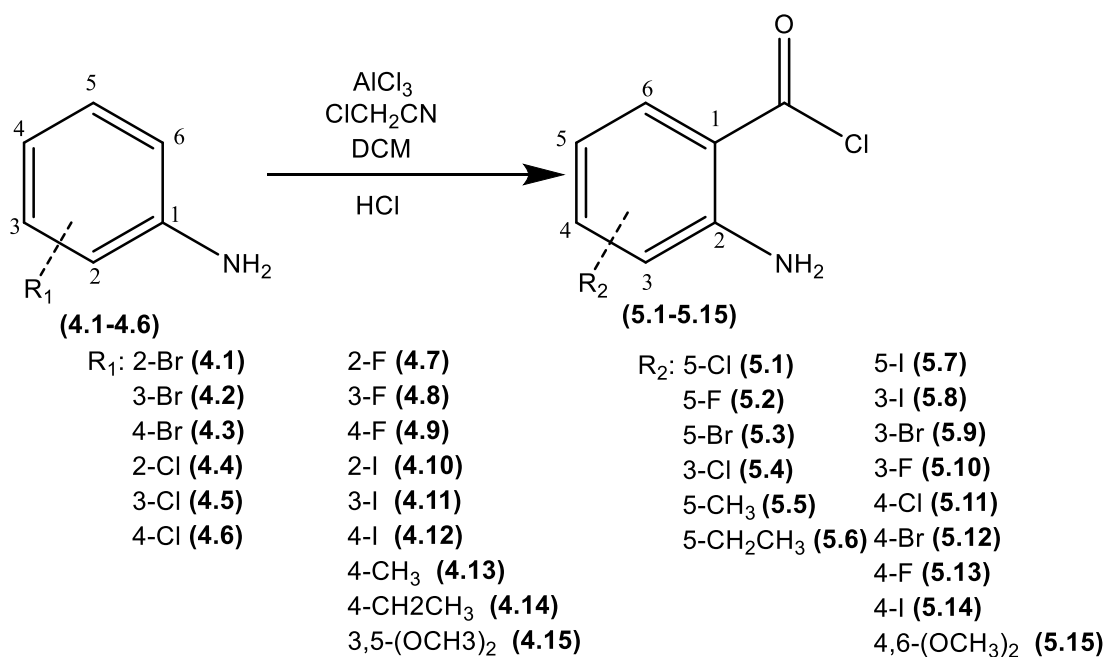
Dessa forma, os derivados da α -cloroacetofenona substituídos (esquema **2, 5.1 – 5.15**) foram obtidos por meio da reação de acilação sob as condições de Houben-Hoesch adaptada por Sugawara et al. (1979), usando cloroacetonitrila (ClCH_2CN) como reagente, cloreto de alumínio (AlCl_3) como catalisador e DCM como solvente polar aprótico (Oliveira, 2017).

Estudos a frente propuseram explorar o potencial do indol substituído pela inclusão de grupos sulfonados, tendo como estrutura central o indol modificado pela substituição do hidrogênio nos carbonos 5 e 7 por grupos com características eletrônicas e estéricas diferentes, como os halogêneos cloro (Cl), bromo (Br) e iodo (I) (Macedo et al., 2018).

Os derivados por sulfonilação foram sintetizados conforme a metodologia de Che et al. (2013) por meio de três reações em sequência (esquema **3**). Inicialmente

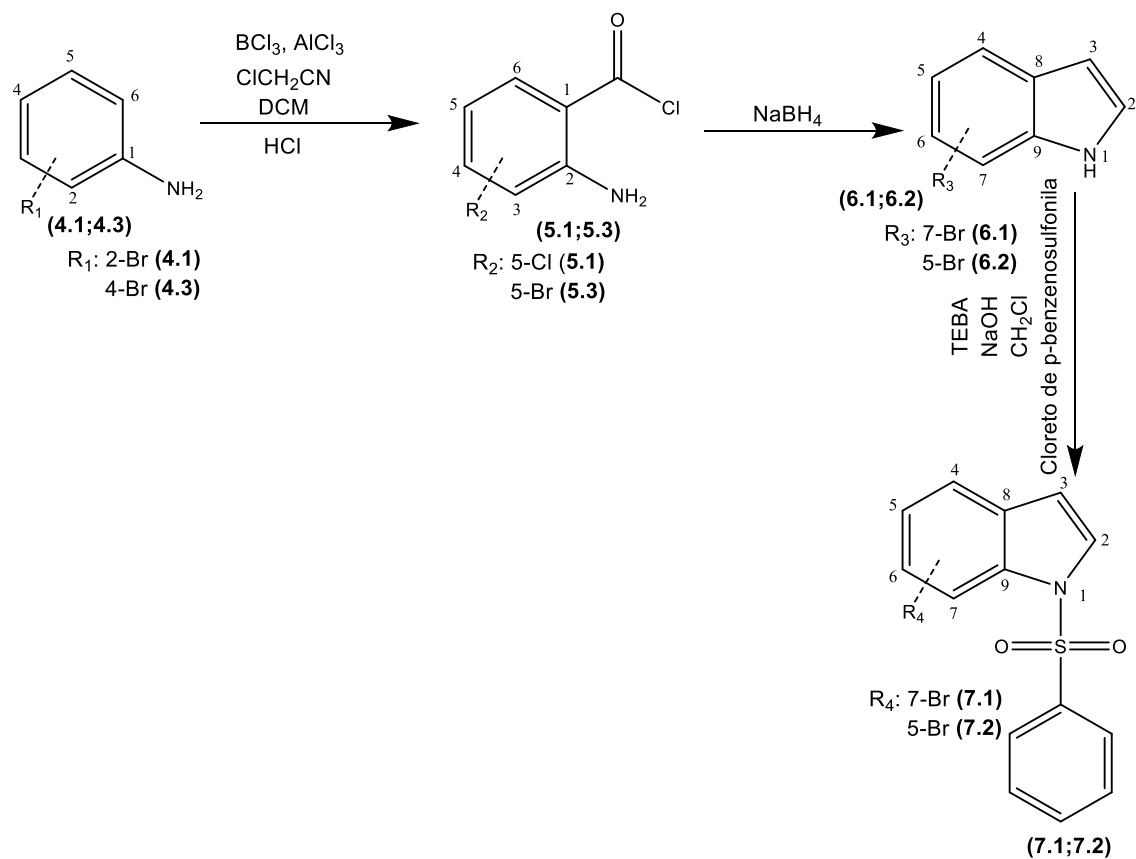
obteve-se as 1-(2-amino-fenil)-2-cloro-etanonas substituídas via acilação regioselectiva na posição *orto* de anilinas substituídas, conforme descrito por Sugawara et al. (1979). Em seguida, estas anilinas passaram por um processo de ciclização e posterior redução por borohidreto de sódio (NaBH_4), formando o anel indólico seguindo-se a metodologia de Wager e Miller (2006).

Esquema 2. Síntese dos derivados 2-amino- α -cloroacetofenona (**5.1 – 5.15**).



Fonte: Nunes (2019).

Esquema 3. Mecanismo de síntese em três passos sequenciais para obtenção dos derivados 1-(benzenosulfonil)-1-*H*-indol substituído (7.1-7.2).



Fonte: Autor

Uma vez que estas moléculas exibiram atividade larvica moderada houve o interesse em determinar a seletividade destes larvicidas em potencial a organismos não alvo para atuar como indicador de ecotoxicidade e direcionar as pesquisas para estudos ecotoxicológicos mais amplos no futuro.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a toxicidade aguda dos compostos sintetizados no LQF-UFS ativos contra larvas de *Aedes aegypti* frente a *Artemia* sp.

3.2 Específicos

1. Determinar a concentração letal 50% (CL₅₀) de compostos ativos contra larvas do *Ae. aegypti* obtidos pela equipe LQF-UFS frente à náuplios de *Artemia* sp, sendo estes:

- (-)-borneol (1a) e doze derivados;
- Três derivados do *N*-tosilindol;
- Quinze derivados do 1-(2-amino-fenilsubstituído)2-cloroetanona;
- Dois derivados do 1-(benzenosufonil)-1*H*-indol.

2. Determinar o índice de seletividade (IS) para todos os derivados testados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A obtenção dos compostos e ensaios biológicos deste trabalho foram desenvolvidos no LQF-UFS.

4.1 Obtenção dos compostos

Uma vez que a avaliação toxicológica frente à náuplios de *Artemia* sp era uma análise inédita realizada no LQF-UFS, foi necessária uma ampla seleção de compostos ativos com ação larvícida. O (–)-borneol e seus derivados (Figura 8), assim como os derivados indol (Figura 9 e 11) e os precursores do indol, derivados das anilinas substituídas (Figura 10), foram obtidos da biblioteca química do LQF-UFS.

Figura 8. Estruturas químicas do (-)-borneol e seus doze derivados com suas respectivas nomenclaturas.

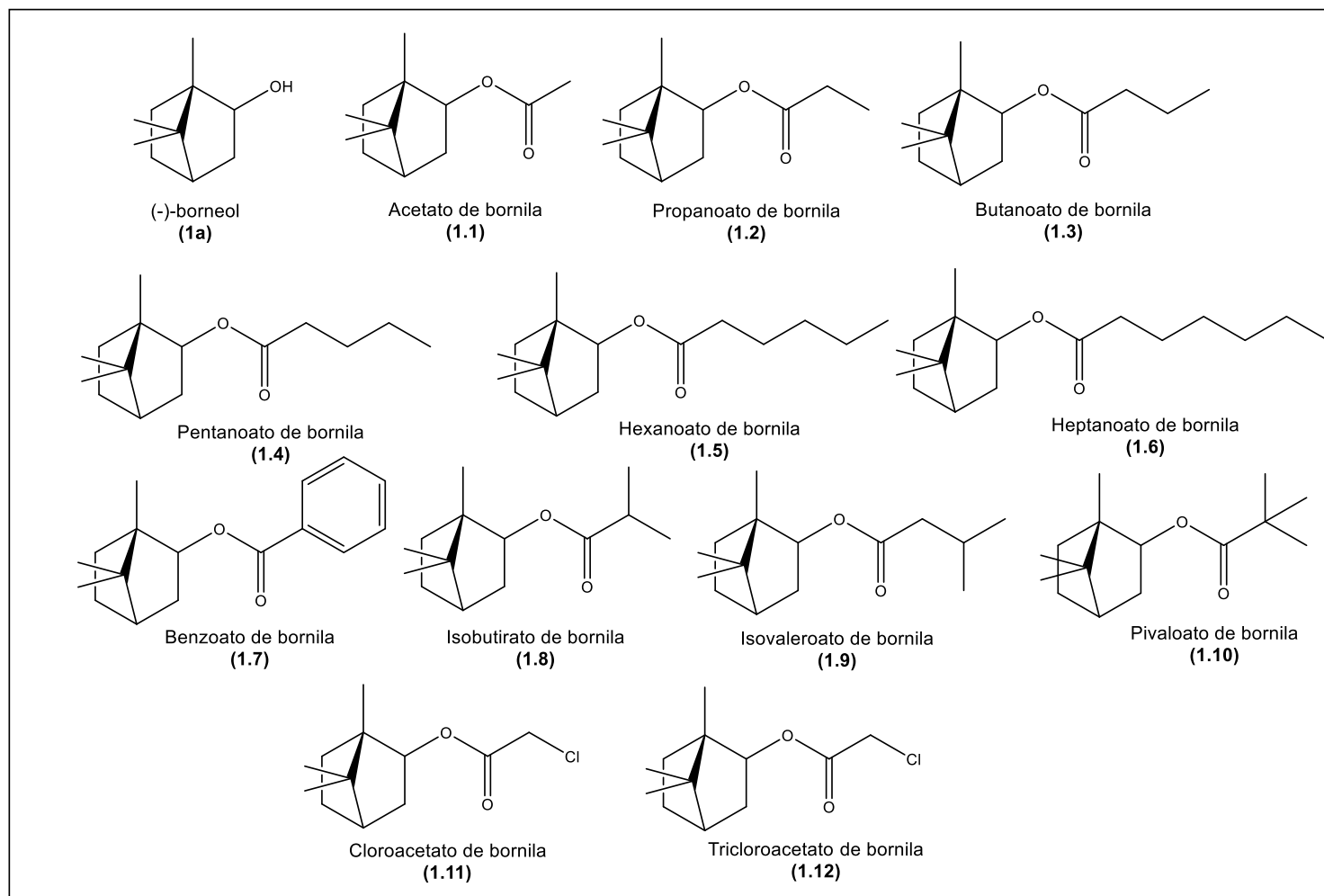
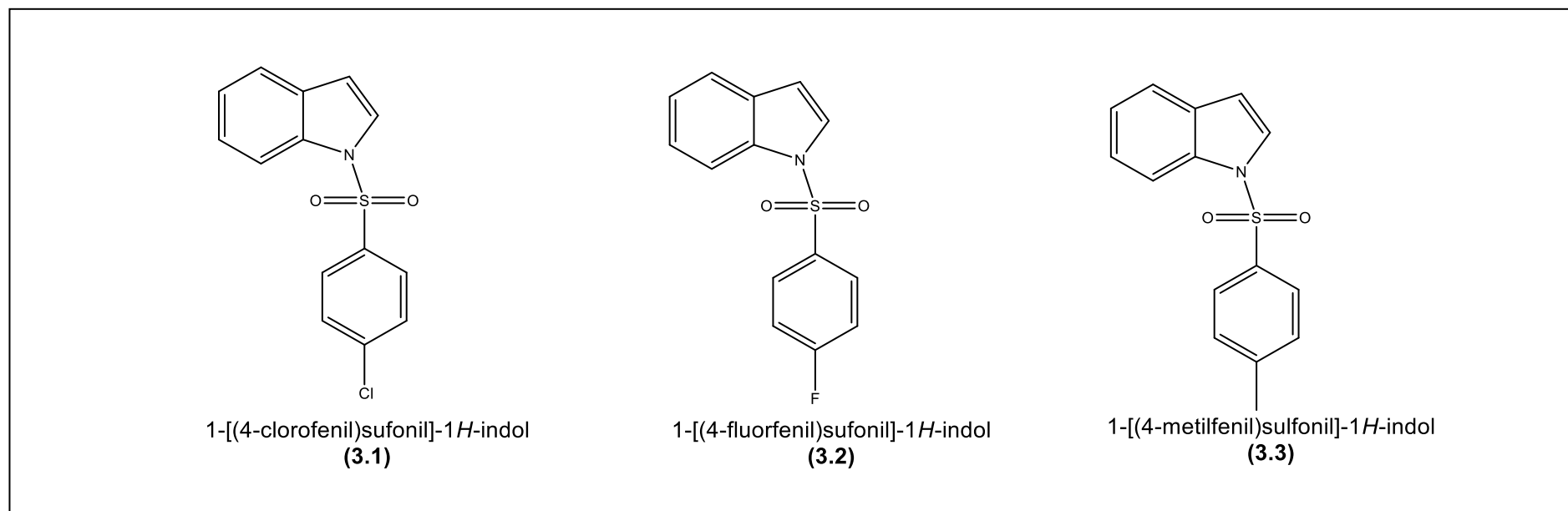
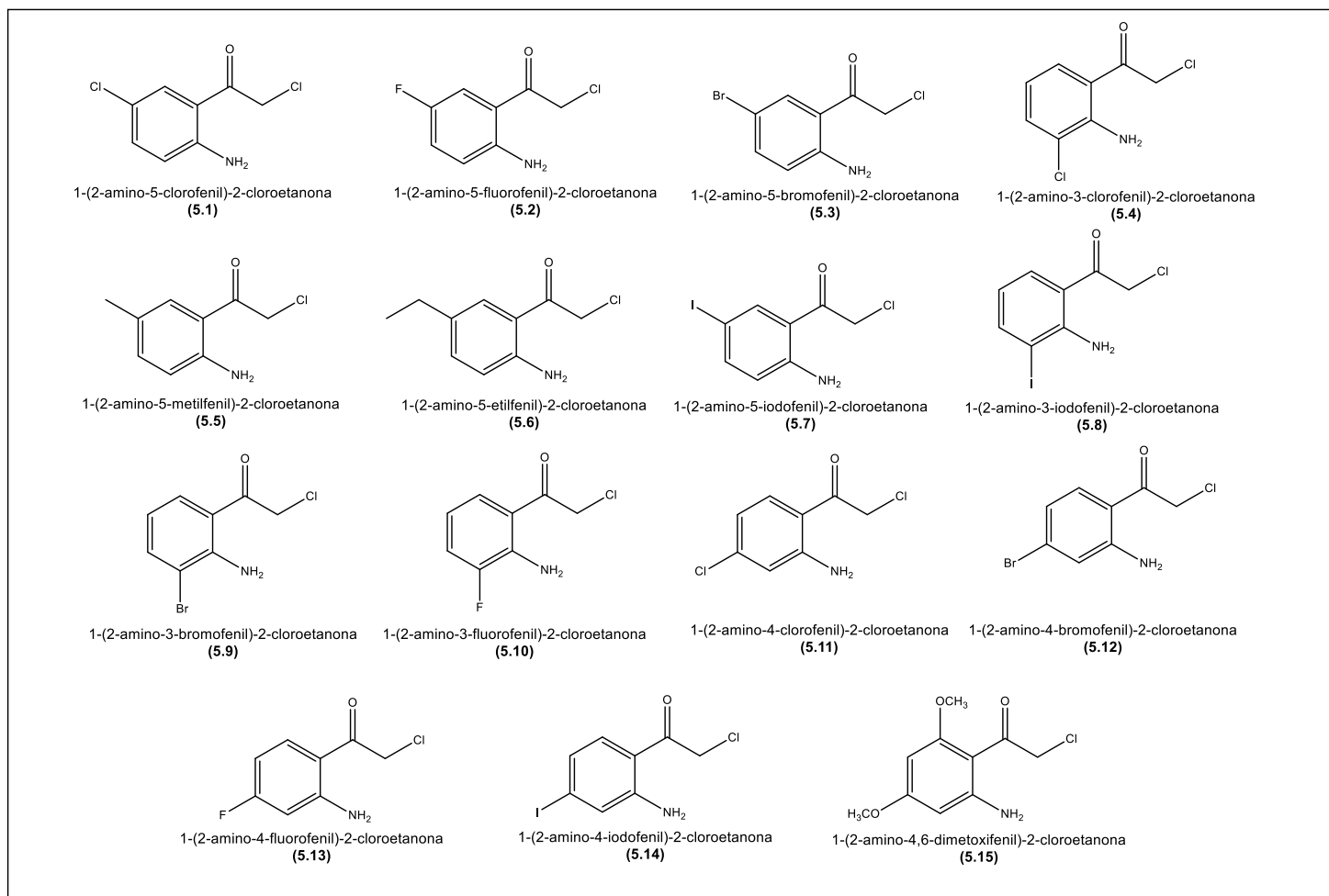


Figura 9. Estruturas químicas dos derivados do *N*-tosillindol e suas respectivas nomenclaturas.



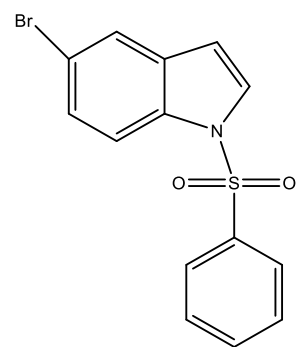
Fonte: Nunes (2019)

Figura 10. Estruturas químicas dos quinze derivados α -clorocetofenonas e suas respectivas nomenclaturas.

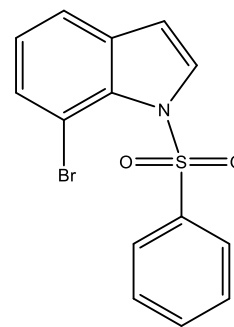


Fonte: Nunes (2019).

Figura 11. Estruturas químicas dos derivados com o grupo benzenosulfonila e suas respectivas nomenclaturas.



5-bromo-1-benzenosulfonila-1*H*-indol
(7.1)



7-bromo-1-benzenosulfonila-1*H*-indol
(7.2)

Fonte: Nunes (2019).

4.2 Ensaios de toxicidade aguda com *Artemia* sp.

Os ensaios de toxicidade com *Artemia* sp. foram realizados de acordo com a metodologia descrita pelo Artemia Reference Center (ARC), adaptado por Nunes et al. (2018).

4.2.1 Procedimento experimental

Os ovos secos de *Artemia* sp., obtidos comercialmente (Maramar Aquacultura Comércio Importação e Exportação LTDA.) foram mantidos em sua própria embalagem, no LQF-UFS, até início do procedimento.

Para realizar os experimentos de toxicidade em *Artemia*, preparou-se água marinha artificial (32g sal marinho/ 1L de água destilada), da qual retirou-se 0,5L para incubação dos ovos de *Artemia* sp., 80-100mg, em funil de separação de 1L à $25^{\circ}\text{C} \pm 1\%$, sob iluminação constante e lateral com lâmpada de led de 6 W e aeração. Após 24h de incubação, os náuplios foram transferidos para um béquer de vidro (1L) sem aeração e iluminação por 24h para se atingir o estágio de náuplios II-III.

4.2.2 Preparação da solução teste

Para o preparo de cada composto testado, utilizou-se Eppendorff de 1mL para um ensaio piloto, onde pesou-se 10mg do composto em balança semi-micro. Logo depois, adicionou-se 100 μL do tensoativo Tween 80, seguido por homogeneização com o auxílio de espátula pequena. Em seguida, com o auxílio de uma micropipeta, adicionou-se 300 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Por fim, acrescentou-se 600 μL de água marinha artificial e homogeneizou-se novamente. Quando necessário, uma escala maior de solução mãe foi preparada.

4.2.3 Exposição dos náuplios II-III

Realizou-se um teste piloto com diferentes concentrações da solução teste (10-1000mg/L), necessário para se determinar a faixa de concentração de mortalidade dos náuplios em 24h. As faixas das concentrações dos ensaios de toxicidade foram predeterminadas por esta curva concentração-resposta em replicata de 10 náuplios II-III.

Com os dados de mortalidade, para alguns compostos foi necessário planejar as concentrações, sendo necessário ajustar as concentrações das soluções teste para ensaio em triplicata, de modo a encontrar uma faixa de concentrações em que a menor concentração utilizada marginasse a faixa de mortalidade com zero mortos, e a maior concentração matasse todos os náuplios.

Dez náuplios em estágio II-III foram transferidos com auxílio de uma pipeta de Pasteur de plástico para uma proveta de 10mL. O volume da proveta completado para atingir 10mL com água marinha artificial e após, transferido para copos descartáveis de 80mL. Este procedimento foi repetido até atingir o número de copos suficientes para o ensaio propriamente dito.

Logo após, verteu-se aproximadamente 2mL de água marinha artificial no copo contendo os náuplios para um copo vazio de 80mL, tomando cuidado para não verter nenhum dos náuplios. Volume adequado da solução mãe foi transferido com auxílio de micropipetas automáticas, e a solução resultante, homogeneizada. Em seguida, pode-se verter todo conteúdo do copo com os náuplios, este procedimento foi repetido para todos os copos evitando a exposição dos náuplios a concentrações elevadas da solução mãe, mesmo que momentaneamente.

Foram realizados testes paralelos para controle negativo utilizando Tween 80, DMSO e água marinha artificial, na maior concentração aplicada em cada teste. Como controle positivo foi utilizado temefós e diflubenzuron, pesticidas padrões.

4.2.4 Análise estatística

A concentração letal 50% (CL₅₀) dos náuplios e o intervalo de confiança (IC) para cada composto foram calculados. Os dados de mortalidade foram submetidos à Análise probit de acordo com Finney (1971), com auxílio o software Minitab.

Nos casos em que ocorreram mortes no controle $\leq 20\%$, os dados foram corrigidos pela fórmula de Abbott (1987) (Equação, 1), em que Ca é o número de náuplios vivos no controle e Ta, o número de náuplios no teste. A CL₅₀ dos compostos foi considerada diferente quando o IC 95% não se sobrepôs.

$$\% \text{ Mortalidade} = \{(Ca - Ta)/Ca\} \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

A eficácia e ecotoxicidade entre os compostos foram comparadas através do índice de seletividade (IS), calculado pela razão entre os valores de CL_{50} obtidos nos ensaios toxicidade aguda, e suas respectivas CL_{50} da atividade larvicida frente ao *Ae. aegypti*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio de toxidade aguda com *Artemia* sp.

No bioensaio, o larvicida temefós apresentou $CL_{50} > 1500 \text{ mg/L}$, que de acordo com Meyer et al. (1982) é considerado não tóxico para artemia. Em contraste, para no bioensaio com o DFB, devido ao mecanismo deste composto, foi necessário avaliar a mortalidade após 48h, resultando em CL_{50} de $0,0109 \text{ mg/L}$ (IC de $0,0078 \text{ mg/L}$ a $0,0145 \text{ mg/L}$), sendo classificado como extremamente tóxico (Meyer et al., 1982). Por fim, não houve mortalidade no controle negativo realizado em todas replicatas.

5.1.1 Derivados do borneol

O borneol (**1a**) apresentou-se inócuo para *Artemia* sp. até 1000 mg/L (Tabela 1). Apesar deste resultado, modificações na molécula (**1a**) com a adição de grupo acetato, aumento do número de metilenos e adição de cadeias alifáticas ramificadas provaram aumentar a toxicidade para *Artemia* sp. comparados a atividade larvicida a *Ae. Aegypti*. São eles os compostos **1.1**, **1.2**, **1.3**, **1.4**, **1.5**, **1.6**, **1.7**, **1.8**, **1.9**, **1.10** os quais exibiram CL_{50} entre $24,8 \text{ mg/L}$ a $190,1 \text{ mg/L}$.

O cloroacetato de bornila (**1.11**) e o tricloroacetato de bornila (**1.12**) são compostos clorados que apresentaram potências promissoras comparadas a sua atividade larvicida. A inclusão do cloro (halogênio) no composto (**1**), contribuiu para a redução da toxicidade de até quatro vezes comparados ao composto benzoato de bornila (**1.7**) com CL_{50} de $190,1 \text{ mg/L}$. O tricloroacetato de bornila apresentou CL_{50} de $724,1 \text{ mg/L}$ para náuplios de artemia.

Derivados naturais ou pesticidas eficientes contra larvas do *Ae. aegypti*, uma vez considerados biodegradáveis e não tóxicos, são adequados para manejo de larvas deste vetor. Óleos essenciais (OEs) de plantas, por exemplo, são excelentes candidatos, prontamente disponíveis em países tropicais, economicamente viáveis e com baixa toxicidade em mamíferos. Ademais, múltiplos bioativos de OEs com modos de ação complexos podem não desenvolver a resistência em mosquitos (Silva et al., 2008; Huang et al., 2019).

OEs são indicados como agentes larvicidas em potencial. A planta *Lippia gracillis*, apresenta OE constituído por monoterpenos e sesquiterpenos, que demonstrou forte atividade larvicida contra *Ae. Aegypti*. Entretanto, a inclusão deste OE no complexo β -ciclodextrina (β -CD), melhorou este perfil larvicida bem como não apresentou toxicidade para náuplios de artemia (Galvão et al., 2019).

Nos últimos anos, OEs e seus componentes majoritários ganharam atenção especial como alternativas larvicidas ecologicamente viáveis no controle do vetor *Ae. aegypti*.

OE de *Eugenia uniflora* Linn. (Myrtaceae) e seus majoritários, curzereno, trans- β -elemenona e γ -elemeno foram avaliados quanto a sua atividade larvicida como também a sua avaliação ecotoxicológica para quatro espécies não-alvo. Dentre os compostos avaliados o curzereno mostrou ótimo potencial larvicida e baixa toxicidade às espécies não-alvo (Govindarajan et al., 2017).

Em outro estudo, componentes prevalentes em OEs, o cinamato de metila, linalol e sua mistura binária, cinamato de metila-linalol 1:4, mostraram atividade moderada frente a larvas do *Ae. aegypti* com CL_{50} de 35,5mg/L, 96,1mg/L e 57,7mg/L respectivamente, e baixa toxicidade para o ambiente e mamíferos em ensaios com *Artemia salina* Leach (Fujiwaraa et al., 2017).

Por outro lado, o diflubenzuron, um larvicida convencional atualmente disponível para controle de larvas do *Ae. aegypti*, é extremamente tóxico (CL_{50} de 0,0109mg/L) para náuplios de artemia como nos dados anteriormente descritos. Da mesma forma, o piriproxifeno, em dados apresentados na literatura demonstrou alta toxicidade para *Artemia salina* (Santos et al., 2017).

De acordo com a Tabela 1, dados de atividade larvicida frente a larvas do *Ae. aegypti* obtidos por Martins (2016) e a toxidade aguda em *Artemia* sp., não mostram correlação entre elas, sugerindo que esta série atue através de diferentes mecanismos de ação em ambos os organismos, sendo interessante avaliar a seletividade entre eles.

Para tanto, compostos com $IS > 1$ são menos tóxicos para *Artemia* sp. enquanto com um $IS < 1$ são classificados como tóxicos. No entanto, outras espécies do

ecossistema também devem ser avaliadas para uma melhor avaliação da ecotoxicidade (Nunes et al., 2018).

Tabela 1. Valores da concentração letal 50% (CL₅₀) (mg/L) e intervalo de confiança 95% (IC) contra *Aedes aegypti* e *Artemia* sp. para derivados do (–)-borneol.

Compostos	<i>Ae. aegypti</i> CL ₅₀ (IC 95%)	<i>Artemia</i> sp. CL ₅₀ (IC 95%)	Índice de Seletividade (IS)
(–)-borneol (1a)	254 (225 a 285)	>1000	>3,92
Acetato de bornila (1.1)	250 (222 a 289)	24,8 (16,5 a 35,6)	0,10
Propanoato de bornila (1.2)	103 (96 a 110)	155,4 (133,3 a 177,9)	1,50
Butanoato de bornila (1.3)	239 (219 a 259)	131,0 (105,0 a 165,4)	0,55
Pentanoato de bornila (1.4)	166 (146 a 190)	10,4 (8,6 a 12,2)	0,05
Hexanoato de bornila (1.5)	476 (430 a 531)	177,1 (112,3 a 250,1)	0,36
Heptanoato de bornila (1.6)	6725 (2214 a 226,819)	172,0 (146,0 a 202,9)	0,02
Benzoato de bornila (1.7)	106 (95 a 119)	190,1 (172,8 a 211,0)	1,72
Isobutirato de bornila (1.8)	98 (91 a 107)	53,0 (38,9 a 64,5)	0,53
Isovaleroato de bornila (1.9)	107 (105 a 119)	6,2 (5,5 a 7,0)	0,05
Pivaloato de bornila (1.10)	182 (171 a 191)	104,4 (73,5 a 145,8)	0,57
Cloroacetato de bornila (1.11)	21 (19 a 22)	170,7 (149,0 a 194,9)	8,40
Tricloroacetato de bornila (1.12)	103 (93 a 115)	724,1 (575 a 859,9)	7,02

Fonte: Nunes (2019).

Observou-se que os compostos **(1.1)**, **(1.3 – 1.6)**, e **(1.8 – 1.10)** apresentaram alta toxicidade frente a náuplios de *Artemia* sp. quando comparados com a atividade larvícida frente ao *Ae. aegypti*, em que o IS variou de 0,02 a 0,57. Consequentemente, os referidos compostos não são considerados seguros para o meio ambiente.

Já os derivados clorados **(1.11)** e **(1.12)** apresentaram IS 8,40 e 7,02, respectivamente, demonstrando que estes derivados do (–)-borneol estão menos propensos a ser danosos ao meio ambiente.

Compostos contendo cloro em suas estruturas demonstraram previamente possuir uma maior potência larvícida contra o *Ae. aegypti* (Oliveira et al., 2014). Salienta-se que pela primeira vez houve relato da seletividade de compostos clorados entre estas duas espécies, abrindo margem para estudos futuros de compostos clorados e seletivos para organismo alvo (Nunes et al., 2018).

5.1.2 Derivados do indol

A série dos indóis substituídos na posição 4 do anel sulfonil aromático **(3.1 - 3.3)** e os derivados benzenosulfonil **(7.1 - 7.2)** demonstraram ser pouco tóxicos para *Artemia* sp., exibindo CL₅₀ >1000mg/L (Tabela 2), e as melhores potências larvicidas contra *Ae. aegypti*, com CL₅₀ variando de 0,24 a 12,26mg/L, respectivamente.

Estes derivados apresentaram altos índices de seletividade (IS), variando de >81,56 à >6148, sendo considerados de uso seguro frente a náuplios de artemia, tornando a substituição na posição 4 do anel sulfonil aromático bem como também a inserção de halogênio no anel indólico, alterações promissoras para estudos futuros de compostos com alta potência larvícida e baixa ecotoxicidade frente à náuplios de artemia.

O derivado **(3.3)** exibiu IS>6148, o que o classifica dentre os derivados *N*-benzenosulfonil como a molécula mais promissora.

Tabela 2. Valores da concentração letal 50% (CL₅₀) (mg/L) e intervalo de confiança 95% (IC) contra *Ae. aegypti* e *Artemia* sp. para derivados do indol (1b).

Compostos	<i>Ae. aegypti</i> CL₅₀ (IC 95%)	<i>Artemia</i> sp. CL₅₀ (IC 95%)	Índice de Seletividade (IS)
1-[(4-clorofenil)sufonil]-1 <i>H</i> -indol (3.1)	1,6357 (1,4265 a 1,8757)	>1000	>611,35
1-[(4-fluorfenil)sufonil]-1 <i>H</i> -indol (3.2)	1,5504 (1,3454 a 1,7867)	>1000	>645
1-[(4-metilfenil)sufonil]-1 <i>H</i> -indol (3.3)	0,244 (0,212 a 0,280)	>1500	>6148
5-bromo-1-benzenosulfonila-1 <i>H</i> -indol (7.1)	12,2602 (10,8134 a 13,9005)	>1000	>81,56
7-bromo-1-benzenosulfonila-1 <i>H</i> -indol (7.2)	12,1068 (11,0757 a 13,2343)	>1000	>82,6

Fonte: Nunes (2019).

5.1.3 Derivados das α -cloroacetofenonas

Os compostos avaliados por Oliveira (2017) (Tabela 3), **(5.1 – 5.4)** e **(5.7 – 5.15)** apresentaram atividade larvicida com CL_{50} variando de 4,29mg/L a 26,72 mg/L e **5.5;5.6** obtiveram o melhor perfil biológico frente a larvas do *Ae. aegypti* com CL_{50} de 2,12 e 0,59mg/L, respectivamente.

Destaque para os compostos com substituição halogênica **5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.7, 5.8, 5.9, 5.10, 5.11, 5.12, 5.13** e **5.14** que apresentaram CL_{50} em 24h baixa frente a náuplios de artemia (0,33-5,85mg/L). Os valores de IS classificam esses compostos de perfil tóxicos para *Artemia* sp. Entretanto, existe a necessidade em avaliar esses efeitos para mais de uma espécie representativa da biota aquática, de preferência em diferentes níveis tróficos, para que assim seja possível interpretar corretamente o risco de exposição ao ambiente deste larvicida (Nunes, 2011; Araújo et al., 2018).

Os compostos **5.5** e **5.6**, com substituição de grupo alquil na posição 5 do anel, apresentaram melhor atividade larvicida como também um $IS > 1$, que sugere indicativo de segurança frente a náuplios de artemia. O composto **5.15** com substituição na posição 4 e 6 do anel, dentre todos os derivados foi o composto que apresentou melhor atividade frente à náuplios com CL_{50} de 15mg/L, a razão entre as CL_{50} para cálculo da seletividade provou não ser satisfatória com um $IS < 1$.

Tabela 3. Valores da concentração letal 50% (CL₅₀) (mg/L) e intervalo de confiança 95% (IC) contra *Ae. aegypti* e *Artemia* sp. para derivados α -cloroacetofenonas.

Compostos	<i>Ae. Aegypti</i> CL₅₀ (IC 95%)	<i>Artemia</i> sp. CL₅₀ (IC 95%)	Índice de Seletividade (IS)
1-(2-amino-5-clorofenil)-2-cloroetanona (5.1)	4,29 (3,85 a 4,76)	3,79 (3,62 a 3,98)	0,88
1-(2-amino-5-fluorofenil)-2-cloroetanona (5.2)	11,71 (11,15 a 12,26)	2,91 (2,73 a 3,12)	0,24
1-(2-amino-5-bromofenil)-2-cloroetanona (5.3)	11,20 (10,80 a 11,61)	4,39 (4,07 a 4,78)	0,39
1-(2-amino-3-clorofenil)-2-cloroetanona (5.4)	9,2 (8,33 a 10,05)	0,33 (0,79 a 0,99)	0,03
1-(2-amino-5-metilfenil)-2-cloroetanona (5.5)	2,12 (1,85 a 2,41)	2,69 (2,47 a 2,95)	1,26
1-(2-amino-5-etilfenil)-2-cloroetanona (5.6)	0,59 (0,53 a 0,66)	2,56 (2,35 a 2,80)	4,34
1-(2-amino-5-iodofenil)-2-cloroetanona (5.7)	8,90 (8,0 a 9,76)	5,85 (4,95 a 7,11)	0,66
1-(2-amino-3-iodofenil)-2-cloroetanona (5.8)	4,84 (4,39 a 5,34)	0,76 (0,67 a 0,86)	0,15
1-(2-amino-3-bromofenil)-2-cloroetanona (5.9)	14,42 (13,17 a 15,86)	0,94 (0,87 a 1,01)	0,06
1-(2-amino-3-fluorofenil)-2-cloroetanona (5.10)	13,47 (12,67 a 14,24)	2,86 (2,71 a 3,00)	0,21
1-(2-amino-4-clorofenil)-2-cloroetanona (5.11)	10,05 (9,44 a 10,72)	1,32 (1,22 a 1,43)	0,13
1-(2-amino-4-bromofenil)-2-cloroetanona (5.12)	7,84 (7,22 a 8,51)	1,93 (1,83 a 2,05)	0,25
1-(2-amino-4-fluorofenil)-2-cloroetanona (5.13)	15,99 (15,05 a 16,99)	3,34 (3,07 a 3,64)	0,21
1-(2-amino-4-iodofenil)-2-cloroetanona (5.14)	11,35 (9,99 a 12,97)	1,14 (1,04 a 1,23)	0,10
1-(2-amino-4,6-dimetoxifenil)-2-cloroetanona (5.15)	26,72 (25,48 a 27,98)	15,00 (12,36 a 17,76)	0,56

Fonte: Nunes (2019).

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram avaliados 33 derivados frente ao bioindicador *Artemia* sp. e, para todos os derivados foi possível obter IS e as atividades aqui apresentadas.

Modificações feitas na hidroxila do borneol e a inclusão de grupos alquil ou halogênios na molécula do indol resultaram em diferentes níveis de toxicidade frente ao bioindicador *Artemia* sp.

A seletividade entre os larvicidas ativos do LQF-UFS foi variável de acordo com o tipo de substituinte inseridos nas moléculas.

O 1-[(4-metilfenil)sufonil]-1-*H*-indol (**3.3**) foi o derivado testado que apresentou potencial mais promissor como larvicida, por exibir uma ótima potência larvicida e apresentar-se inócuo para náuplios de *Artemia* sp.

Com o bom desempenho dos derivados do indol, o LQF-UFS dará continuidade aos estudos, com pesquisa translacional, inserindo estudos ecotoxicológicos para mais espécies de representatividade ecológica da biota aquática preferencialmente de diferentes níveis tróficos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, F.R., Coleone, A.C., Machado, A.A., Neto, J.G.M. (2014) Ecotoxicity and environmental risk assessment of larvicides used in the control of *Aedes aegypti* to *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 77(1–3), 37-45 DOI: 10.1080/15287394.2014.865581
- Abbott, W.S. (1987) A method of computing the effectiveness of an insecticide 1925. *Journal of The American Mosquito Control Association* 3, 302–303.
- Amato, C.D., Torres, J.P.M., Malm, O. (2002) DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade e contaminação Ambiental- Uma revisão. *Química Nova* 25 (6), 995-1002. DOI: 10.1590/S0100-40422002000600017
- Aponte, H.A., Penilla, R.P., Manzanilla, F.D., Mendoza, A.C., López, A.D., Solis, F., Saide, P.M., Ranson, H., Lenhart, A., Macall, P.J., Rodriguez, A. D. (2013) The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, México. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107, 226-234 DOI: 10.1016/j.pestbp.2013.07.005
- Araújo, C.V.M, Griffith, D.M., Vera, V., Jentzsch, P.V., Cervera, L., Nieto-Ariza, B., et al. (2018) A novel approach to assessing environmental disturbance based on habitat selection by zebra fish as a model organism. *Science of The Total Enviroment*. 619–620:906-915 DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.170
- Astrop, T.I., Sahni, V., Blackledge, T.A., Stark, A.Y. (2015) Mechanical properties of the chitin-calcium-phosphate “clam shrimp” carapace (Branchiopoda: Spinicaudata): Implications for taphonomy and fossilization. *Journal of Crustacean Biology*, 35, 123-131. DOI: 10.1163/1937240X-00002332
- Bagheri, N., Khataee, A., Hassanzadeh, J., Habibi, B. Sensitive biosensing of organophosphate pesticides using enzyme mimics of magnetic ZIF-8. (2018). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 209, 118-125 DOI: 10.1016/j.saa.2018.10.039.
- Bastos, C.M., D’Avila, O.P., Umpierre, R.N., Faccini, L.S., Gonçalves, M.R., Harzheim, E. (2016) O uso de larvicidas em água potável é seguro? *Revista Brasileira de Medicina e Família na Comunidade*. 11(38):1-5 DOI: 10.5712/rbmfc11(38)1300
- Belinato, T.A., Valle, D., (2015) The impact of selection with diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor, on the fitness of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations. *PloS One* 10, e0130719. DOI:10.1371/journal.pone.0130719
- Bellinato, D.F., Viana-Medeiros, P.F., Araújo, S.C., Martins, A.J., Lima, J.B.P., Valle, D. (2016) Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations. *BioMed Res. Int.* 2016, 8603263 DOI: 10.1155/2016/8603263.

Braga, I.A., Valle, D. (2007) *Aedes aegypti*: Inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília. 25, DOI: 10.5123/s1679-49742016000200017

Bohbot, J.D., Fu, L., Le, T.C., Chauhan, K.R., Cantrell, C.L., Dickens, J.C. (2011) Multiple activities of insect repellents on odorant receptors in mosquitoes. Medical and Veterinary Entomology. 25, 436-444 DOI: 10.1111/j.1365-2915.2011.00949.x.

Bohm, A.W., Costa, C.S., Neves, R.G., Flores, T.R., Nunes, B.P. (2016) Dengue incidence trend in Brazil, 2002-2012. Epidemiologia e Serviços de Saúde 25(4),725-733 DOI: 10.5123/S1679-49742016000400006.

Bowman, L.R., Donegan, S., McCall, P.J. (2016) Is dengue vector control deficient in effectiveness or evidence: Systematic review and meta-analysis. PLOS Neglected Tropical Diseases. 10, DOI: 10.1371/journal.pntd.0004551

Calvo, E.P., Sánchez-Quete, F., Durán, S., Sandoval, I., Castellanos, J.E. (2016) Easy and inexpensive molecular detection of dengue, chikungunya and zika viruses in febrile patients. Acta Tropical 163, 32–37 DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.07.021

Che, Z., Zhang, S., Shao, Y., Fan, L., Xu, H., Yu, X. Zhang, R. (2013). 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, 61(24), 5696–5705. DOI:10.1021/jf400536q

Corrêa, J.M., Penafort, J.M. (2011) Considerações sobre biologia e utilização de *Artemia* sp. (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca) Revista eletrônica de Veterinária. 1695-7504

Cortes, R.;L., Melo, V.A.D., Dolabella, S.S., Marteis, L.S. (2018) Variation in temephos resistance in field populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the State of Sergipe, Northeast Brazil. 51(3):284-290 DOI: 10.1590/0037-8682-0449-2017

Costa, C.R., Oliveira, P. (2008) A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. Química Nova 31, 1820-1830 DOI: 10.1590/S0100-40422008000700038.

Cugola, F.R., Fernandes, I.R., Russo, F.B., Freitas, B.C., Dias, J.L.M., Guimarães, K.P., Benazzato, C. et al. (2016) The brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. Nature 534, 267-271 DOI: 10.1038/nature18296.

Cunningham, P.A. (1976) Effects of Dimilin (Th 6040) on Reproduction in the Brine Shrimp, *Artemia salina*. Environmental Entomology 5, 701-706 DOI: 10.2307/1352233.

Devlin, F., Stephens, P., Besse, P. (2005) Conformational rigidification via derivatization facilitates the determination of absolute configuration using chiroptical

spectroscopy: A case study of the chiral alcohol endo-borneol. The Journal of organic chemistry. v.70(8), 2980-2993 DOI: 10.1021/jo0478611

Diniz, D.F.A., Santos, M.A.V.M., Santos, E.M.M., Beserra, E.B., Helvecio, E., Carvalho, D.L. (2015) Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. Parasites & Vectors. 8(1) DOI: 10.1186/s13071-015-1276-5

Duchet, C., Franquet, E., Lagadic, L., Lagneau, C. (2015) Effects of *Bacillus thuringiensis israelensis* and spinosad on adult emergence of the non-biting midges *Polypedilum nubifer* (Skuse) and *Tanytarsus curticornis* Kieffer (Diptera: Chironomidae) in coastal wetlands. Ecotoxicology and Environmental Safety 115, 272–278. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.02.029

Ferguson, N.M., Cucunuba, Z.M., Dorigatti, I., Nedjati-Gilani, G.L., Donnelly, C.A., Basanez, M.-G., Nouvellet, P., Lessler, J., (2016). Countering the Zika epidemic in Latin America. Science 353, 353–354 DOI: 10.1126/science.aag0219

Finney, D.J., (1971) Probit Analysis. Journal of Pharmaceutical Sciences 60, 1432. DOI:10.1002/jps.2600600940

Fontes, U.R.J.; Ramos, C.S.; Serafini, M.R.; Cavalcanti, S.C.H; Alves, P.B.; Lima, G.M.; Andrade, P.H.S.; Bonjardim, L.R.; Quintans, L.J.; Araújo, A.A.S. (2012) Evaluation of the lethality of *Porophyllum ruderale* essential oil against *Biomphalaria glabrata*, *Aedes aegypti* and *Artemia salina*. African Journal of Biotechnology 11, 3169-3172, DOI: 10.5897/AJB11.1314

Forezi, L.S.M. (2011) Métodos de Preparação industrial de solventes e reagentes químicos –Anilina. Revista Virtual de Química ,3, DOI: 10.5935/1984-6835.2011005

Fujiwara, G.M., Annies, V., Oliveira, C.F., Lara, R.A., Gabriel, M.M, Betim, F.C.M., Nadal, J.M., Farago, P.V., Dias, J.F.G. et al. (2017) Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 139, 238-244 DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.01.046

Galvão, J.G., Cerpe, P., Santos, D.A., Gonsalves, J.K., Santos, A.J., Nunes, R.K., et al. (2019) *Lippia gracilis* essential oil in β -cyclodextrin inclusion complexes: an environmentally safe formulation to control *Aedes aegypti* larvae: *Lippia gracilis* essential oil in β -cyclodextrin inclusion complexes. Pest Management Science. 75,452-459 DOI:10.1002/ps.5138.

Garcia, G.A., David, M.R., Martins, A.J.,Freitas, R.M., Linss, J.G.B., Araújo, S.C., Lima, J.B.P., Valle, D. (2018) The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian Regions. Plos Neglected Tropical Diseases. 12(2) DOI:10.1371/journal.pntd.0006227

Garciduenas, A.L.C., Waliszewski, S.M., Ramos, R.R., Valenzuela, M.C.M. (2018) Time trend tendency (1988–2014 years) of organochlorine pesticide levels in the adipose tissue of Veracruz inhabitants. *Environmental Monitoring and Assessment*. 190;206 DOI: 10.1007/s10661-018-6581-y

Gartenstein, S., Quinell, R.G., Larkum, A.W.D., (2006). Toxicity effects of diflubenzuron, cypermethrin and diazinon on the development of *Artemia salina* and *Heliocidaris tuberculata*. *Australasian Journal of Ecotoxicology*. 12, 83-90.

George, L., Lenhart, A., Toledo, J., Lazaro, A., Han, W.W., Velayudhan, R., et al. (2015) Community-effectiveness of temephos for dengue vector control: A systematic literature review. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 9(9) DOI: 10.1371/journal.pntd.0004006

Gonzalez, P.V., Audino, P.A.G., Masuh, H.M. (2015) Behavioral response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae to synthetic and natural attractants and repellents. *Journal Medical Entomology*. 52(6) DOI: 10.1093/jme/tjv136

Govindarajam, M., Rajeswary, M., Senthilmurugan, S., Vijayan, P., et al. (2017) Curzerene, trans- β -elemenone, and γ -elemene as effective larvicides against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus*, and *Culex tritaeniorhynchus*: toxicity on non-target aquatic predators. *Environmental Science and Pollution Research* 25(11), 10272-10282 DOI: 10.1007/s11356-017-8822-y

Han, Q., Fang, J, Li, J. (2002) 3-Hydroxykynurenine Transaminase identity with alanine glyoxylate transaminase: A probable detoxification protein in *Aedes aegypti*. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(18) DOI: 10.1074/jbc.M201202200

Hansch, C., Verma, R.P. (2009) Larvicidal activities of some organotin compounds on mosquito larvae: A QSAR study. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 44(1) DOI: 10.1016/j.ejmech.2008.02.040

Hawkins, N.J., Bass, C., Dixon, A., Neve, P., (2018). The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biological Reviews*, 000-000.

Herawati, V.E., Hutabarat, J., Radjasa, O.K. (2014) Nutritional Contento of *Artemia* sp. fed with *Chaetoceros calcitrans* and *Skeletonema costatum*. *HAYATI Journal of Biosciences* December. 21(4), 166-172

Huang, H.T, Lin, C.C., Kuo, T.C., Chen, S.J., Huang, R.N. (2019) Phytochemical composition and larvicidal activity of essential oils from herbal plants. *Journal of Plant*. 249 DOI:10.1007/s00425-019-03147-w

Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B., (2006) Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquatic Toxicology* 76, 69–92 DOI: 10.4308/hjb.21.4.166

Instituto Oswaldo Cruz (IOC) (2016), Dengue vírus e vetor. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/> Acesso em: 17/12/18

Jayahumar, M.; Arivoli, S.; Raveen, R.; Tennyson, S. (2016) Larvicidal and pupicidal efficacy of plant oils against *Culex quinquefasciatus* Say 1823 (Diptera: Culicidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies* 4, 449-456

Johari, S.A., Rasmussen, K., Gulumian, M., Khansari, M.G., Tetarazako, N., Kashiwada, S., Asghari, S., Park, J.W., Yu, J. (2018) Introducing a new standardized nanomaterial environmental toxicity screening testing procedure, ISO/TS20787: aquatic toxicity assessment of manufactured nanomaterials in saltwater lakes using *Artemia* sp. Nauplii. *Toxicology Mechanisms and Methods*.1(47) DOI: 10.1080/15376516.2018.1512695

Kamaraj, C., Deepak, P., Balasubramani, G., Karthi, S., Arul, D., Aiswarya, D., Amutha, V., Vimalkumar, E., Mathivanan, D. et al. (2018) Target and non-target toxicity of fern extracts against mosquito vectors and beneficial aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 161, 221-230 DOI:10.1016/j.ecoenv.2018.05.062

Lau, K.W., Chen, C.D., Lee, H.L., Rashid, Y.N., Azirun, M.S. (2015) Evaluation of insect growth regulators against field-collected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Malaysia. *Journal Medical Entomology* 52(2): 199-206 DOI: 10.1093/jme/tju019

Libralato, G., Prato, E., Migliore, L., Cicero, A.M., Manfra, L. (2016) A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological Indicators*. 69,35-49 DOI: 10.1016/j.ecolind.2016.04.0171470-160X/

Lima, E.P., Goulart, M.O., Rolim Neto, M.L. (2015) Meta-analysis of studies on chemical, physical and biological agents in the control of *Aedes aegypti*. *BMC Public Health*.4(15)858 DOI: 10.1186/s12889-015-2199-y

Lira, P.N.B., Silva, J.K.R., Andrade, E.H.A., Sousa, P.J.C., Silva, N.N.S., Maia, J.G.S. (2009) Essential oil composition of three *Peperomia* species from the Amazon, Brazil. *Natural Product Communications*. 4, 427-430.

Macedo, N. A., Brito, T. B., Cavalcante, S. C. H. Desenvolvimento de novos agentes larvicidas frente ao *Aedes aegypti*: Síntese de derivados do indol. 2017 - Apresentação de Trabalho, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2017.

Macedo, N. A., Brito, T. B., Cavalcante, S. C. H. ; Nunes, R. V., Barreto, R. R. Desenvolvimento de novos agentes larvicidas frente ao *Aedes aegypti*: síntese de derivados do indol substituído. 2018 – Apresentação de Trabalho, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2018.

Martins, U.N. Síntese e desenvolvimento de um modelo de QSAR para derivados do (-)-borneol contra larvas de *Aedes aegypti*. Ulisses Nicola Martins; Orientador Sócrates Cabral de Holanda Cavalcanti. – São Cristóvão, 2016. 89 f.

Matos, R.A.F., Andrade, C.K.Z. (2008) Synthesis of new chiral ionic liquids based on (-)-menthol and (-)-borneol. *Tetrahedron Letters*, 29,1652-1655 DOI: 10.1016/j.tetlet.2008.01.011

Mandhav, M.R., David, E.M., Kumar, R.S.S., Swathy, J.S., Bhuvaneshwari, M., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2017) Toxicity and accumulation of Cooper oxide (CuO) nanoparticles in different life stages of *Artemia salina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 52, 227-238 DOI: 10.1016/j.etap.2017.03.013

Meyer, B.N., Ferrigini, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., MacLaughlin, J.L. (1982) Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*, 45; 31-34 DOI:10.1055/s-2007-971236

Ministério da Saúde (2019), Monitoramento de casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019 e Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti*. <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos> Acessado em: 12/07/2019

Mustafa, M.S., Rasotgi, V., Jain, S., Gupta, V. (2015). Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India* 71, 67–70 DOI: 10.1016/j.mjafi.2014.09.011.

Muthukrishnan, S., Kumar, T.S., Rao, M.V., (2017). Anticancer activity of biogenic nanosilver and its toxicity assessment on *Artemia salina* evaluation of mortality, accumulation and elimination: An experimental report. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 5, 1685-1695 DOI: 10.1016/j.jece.2017.03.004.

Nunes, B. (2011) The use of cholinesterases in ecotoxicology. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 212, 29–59 DOI:10.1007/978-1-4419-8453-1_2

Nunes, B.S., Carvalho, F.D., Guilhermino, L.M., Stappen, G.V. (2006) Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution* 144(2), 453-62 DOI: 10.1016/j.envpol.2005.12.037

Nunes, R.K.V., Martins, U.N., Brito, T.B., Nepel, A., Costa, E.V., Barison, A., et al. (2018) Evaluation of (-)-borneol derivatives against the Zika vector, *Aedes aegypti* and a non-target species, *Artemia* sp. *Environmental Science and Pollution Research*. 25(31), 311355-31174 DOI: 10.1007/s11356-018-2809-1.

Oliveira, R.R.B.; Brito, T.B., Nepel, A., Costa, E.V., Barison, A., et al, (2014) Synthesis, activity and QSAR studies of tryptamine derivatives on third-instar larvae

of *Aedes aegypti* Linn. Medicinal Chemistry 10, 580-587. DOI: 10.2174/1573406409666131202144010

Oliveira, R.R.B. Síntese de derivados da anilina no combate ao mosquito transmissor da dengue, Zika e chikungunya, *Aedes aegypti*. Rafael Reis Barreto de Oliveira; Orientador Sócrates Cabral de Holanda Cavalcanti - São Cristóvão, 2017. 93f.

Ozkan, Y., Altinok, I., Ilhan, H., Sokmen, M. (2015) Determination of TiO₂ and AgTiO₂ nanoparticules in *Artemia salina*: Toxicity, Morphological changes, uptake and depuration. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 1, 36-42 DOI:10.1007/s00128-015-1634-1

Pereira, A.S., Cerejeira, M.J., Daam, M.A. (2014) Comparing ecotoxicological standards of plant protection products potentially toxic to groundwater life with their measured and modelled concentrations. Ecotoxicology Environmental Safety. 102,152–159 DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.01.020

Raphemot, R., Rouhier, M.F., Swale, D.R., Days, E., Weaver, C.D., et al. (2014) Discovery and characterization of a potent and selective inhibitor of *Aedes* Inward Rectifier Potassium Channels. PLOS ONE 9(11): e110772. DOI:10.1371/journal.pone.0110772

Rosa, C.S., Veras, K.S., Silva, P.R., Neto, J.J.L., Cardoso, H.L.M., Alves, LP.L., Brito, M.C.A., Amaral, F..M.M., Maia, J.G.S., Monteiro, O.S., Moraes, D.F.C. (2016) Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. Revista Brasileira Planta Médica, Campinas. 18(1), 19-26 DOI: 10.1590/1983-084X/15_006

Rotini, A., Manfra, L., Canepa, S., Tornambè, A., Migliore, L. (2015) Can Artemia Hatching Assay Be a (Sensitive) Alternative Tool to Acute Toxicity Test Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 95, 745–751 DOI: 10.1007/s00128-015-1626-1

Sá, E.L.R., Rodovalho, C.M., Sousa, N.P.R., Sá, I.L.R., Bellinato, D.F., Dias, L.S., Silva, L.C., Martins, A.J., Lima, J.B.P. (2019) Evaluation of insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations connected bby roads and rivers: the case of Tocantins state in Brazil. Memória Instituto Oswaldo Cruz, 114:e180318 DOI: 10.1590/0074-02760180318

Santos, V.S.V., Caixeta, E.S., Júnior, E.O.C, Pereira, B.B., (2017) 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 80, 155–160. DOI:10.1080/15287394.2016.1266721

Silva, J.S., Rocha, I.K.B., Freitas, L.C., Pereira, N.J., Neta, R.N.F.C, (2015) Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos. Revista de Bioética. 23(2); 409-18. DOI: 10.1590/1983-80422015232079

Silva, W.J., Dória, G.A.A., Maia, R.T., Nunes, R.S., Carvalho, G.A., Blank, A.F., Alves, P.B., Marçal, R.M., Cavalcanti, S.C.H., (2008) r. Bioresource Technology 99, 3251-3255. DOI:10.1016/j.biortech.2007.05.064

Sugasawa, Tsutomu et al. (1979) Aminohaloborane in organic synthesis. 2. Simple synthesis of indoles and 1-acyl-3-indolinones using specific ortho. alpha.-chloroacetylation of anilines. The Journal of Organic Chemistry, 44(4), 578-586 DOI: 10.1021/jo01318a021

Srinivasan, P.V., Thanigaivel, A., Edwin, E.S., Ponsankar, A., Nathan, S., Selin-Rani, S., et al. (2018) Toxicological effects of chemical constituents from Piper against the environmental burden *Aedes aegypti* Liston and their impact on non-target toxicity evaluation against biomonitoring aquatic insects. Environmental Science and Pollution Research. 25(11):10434–46. DOI:10.1007/s11356-017-9714-x

Thanabalu, T., Porter, A.G., Hindley, J. (1996) 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 DOI:10.1006/jipa.1996.0046

Vanhaecke, P.; Persone, G. (1981) Report on na intercalibration exercise on a short-term standard toxicity test with artemia nauplii (ARC-TEST). Inserm, 106, 359-376.

Varó, I., Amat, F., Navarro, J.C., Barreda, M., Pitarch, E., Serrano. R. (2006). Assessment of the efficacy of *Artemia* sp (Crustacea) cysts chorion as barrier to chlorpyrifos (organophosphorus pesticide) exposure. Effect on hatching and survival. Science of the total Environment 148-153 DOI:10.1016/j.scitotenv.2005.10.006

Yamashita, W.M.S., Takahashi, L.T., Chapiro, G. (2018) Traveling wave solutions for the dispersive models describing population dynamics of *Aedes aegypti*. Mathematics and Computers in Simulation.146 DOI: 10.1016/j.matcom.2017.10.012

Wager, C.A.B., Miller, S. A. (2006) Two robust, efficient syntheses of [phenyl ring-U-14C] indole through use of [phenyl ring-U-14C] aniline. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals. The Official Journal of the International Isotope Society, 49(7), 615-622 DOI:10.1002/jlcr.1067

Wang, C., Jia, H., Zhu, L., Zhang, H., Wang, Y. (2017) Toxicity of α -Fe₂O₃ nanoparticles to *Artemia salina* cysts and three stages of larvae. Science of The Total Environment 598, 847-855 DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.183

Wang, H., Xie, Y., Jiao, M., Hu, X., Li, J., Xu, P., Zhang, Y., Chang, J. (2018) Metabolism of diflubenzuron in lizard (*Eremias argus*) and comparative toxicity of

diflubenzuron and its metabolite. Journal of Agricultural and Food Chemistry. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b03713

Wang, L., Zhao, H., Oliva, S.M., Zhu, H. (2017) Modeling the transmission and control of Zika in Brazil. Scientific Reports 7: 7721. DOI: 10.1038/s41598-017-07264-y

World Health Organization (WHO) (2016), Immunization, vaccines and biologicals: Dengue. https://www.who.int/immunization/diseases/dengue/q_and_a_dengue_vaccine_dengvaxia_use/en/ Acesso em: 10/12/2018

Xu, H., Wang, Y.Y. (2010) Antifungal agents. Part 5: Synthesis and antifungal activities of aminoguanidine derivatives of N-arylsulfonyl-3-acylindoles. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 20, 7274-7277. DOI:10.1016/j.bmcl.2010.10.084

Zara, A. L. S. A.; Santos, s. M.; Oliveira, E. S. F.; Carvalho, R. G.; Coelho, G. E. (2016) Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: Uma revisão Epidemiologia e Serviços de Saúde, v.25,391-404. DOI: 10.5123/S1679-49742016000200017