



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
LINHA DE PESQUISA: QUÍMICA DOS PRODUTOS
NATURAIS



VILISAIMON DA SILVA DE JESUS

Composição química e potencial larvicida do óleo essencial de
Anemia tomentosa* (SAV.) Sw: um estudo *in vitro* e *in silico

JEQUIÉ - BA
DEZEMBRO / 2022

VILISAIMON DA SILVA DE JESUS

**Composição química e potencial larvicida do óleo essencial de
Anemia tomentosa (SAV.) Sw: um estudo *in vitro* e *in silico***

Dissertação (em formato de artigo)
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química da Universidade
Estadual do Sudoeste da Bahia, como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rosane Moura Aguiar

JEQUIÉ – BA

DEZEMBRO / 2022

J58c Jesus, Vilisaimon da Silva de.
Composição química e potencial larvicida do óleo essencial de *Anemia tomentosa* (SAV.) Sw: um estudo in vitro e in silico / Vilisaimon da Silva de Jesus.- Jequié, 2022.
55f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação da Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira e coorientação da Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar)

1. Anemiaceae, *A. aegypti* 2. Acoplamento molecular 3. Inibidores da Acetilcolinesterase 4. Sesquiterpenos I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título

CDD – 540

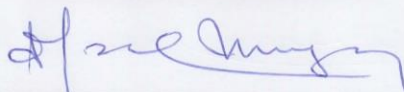
Rafaella Cândia Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO
VILISAIMON DA SILVA DE JESUS

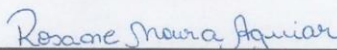
**“Composição química e potencial larvicida do óleo essencial de
Anemia tomentosa (SAV.) Sw: um estudo *in vitro* e *in silico*”.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Química.

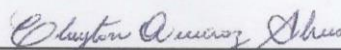
COMISSÃO EXAMINADORA



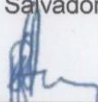
Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira
(UFMG, Belo Horizonte – MG, 2012)
(Orientador)



Prof.ª. Dr.ª. Rosane Moura Aguiar
(UFBA, Salvador-BA, 2008)
(Coorientadora)



Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves
(UFBA, Salvador-BA, 2012)



Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior
(UFRJ, Rio de Janeiro – RJ, 2008)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em
Química em 06/12/2022

*Dedico esse trabalho a todos que um dia
tiveram que lutar e a todos que um dia
tiveram que abdicar para que esse
trabalho acontecesse.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Val e Mara, e irmãos, Meicson e Ana Luíse por sempre confiarem e incentivarem nessa caminhada.

Aos meus grandes orientadores e amigos Djalma e Rosane, Dja e Rosa, que me acompanham e acreditam desde o início da minha caminhada acadêmica e científica.

A todos os amigos que fiz desde a escola, até hoje na Universidade. Especialmente à Aninha, Marianinha, Gabriel Batista, Bruna, Aldo, Juvas, Bilica, Nando, Laís, Cleber, Gabriel Aureliano, Pâmala, Tátilla, Nati, Breno, Rodrigo, Caio, Danyo por dividirem sonhos, lutas e alegrias.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (PGQUI) pela oportunidade concedida e aos docentes deste Programa por todos os ensinamentos preciosos. Agradeço ao coordenador Prof. Dr. Cleber Galvão e também a secretária Leiliane Correia, pela paciência e colaboração em todos os processos. Além disso, gostaria de agradecer a todos professores participantes do programa em especial Alexilda Oliveira, Marcos Bezerra, Valfredo Azevedo e Vanderlúcia Fonseca por toda prestatividade e ensinamentos passados durante esse período de pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo financiamento integral de bolsa de mestrado incluindo prorrogação por mais 03 meses (termo de outorga Nº BOL0264/2020).

Aos colegas do Laboratório de Óleos Essenciais, antigos e novos, pelo apoio, amizade, confraternização e solidariedade. Especialmente Carla, Juli, Maria da Luz, Lorena, Laiz e Rubens.

Ao Laboratório de Pesquisa de Inseticidas Naturais, Laboratório de Produtos Naturais da UESB-Itapetinga, na figura das professoras doutoras Débora Cardoso e Simone Gualberto e ao Laboratório de Bioinformática e Química Computacional da UESB-Jequié, na figura do professor doutor Wagner Soares. Agradeço pela imensa contribuição na realização dessa pesquisa e de todas próximas que virão.

Aos colegas de mestrado, especialmente Lânio, Valéria e Priscila, pela colaboração, atenção e parceria.

A todos demais que fizeram parte da minha trajetória pessoal e acadêmica.
E a Deus, por permitir e propiciar tudo isso.

*Infinitamente e sem sentido, eles voam
até o fim e voltam ao começo novamente.*

John Frusciante

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Constituintes químicos do OEAT identificados por CG-EM, RMN e FTIR.....	18
Tabela 2. Estruturas dos constituintes sesquiterpênicos do OEAT elucidados por CG-EM, RMN e FTIR, e comparação com dados espectrais da literatura.....	19
Tabela 3. Interações intermoleculares dos sesquiterpenos do OEAT no sítio ativo da AChE de <i>A. aegypti</i>	23
Tabela 4. Parâmetros físico-químicos do temefós e dos sesquiterpenos do OEAT.....	26
Tabela 5. Propriedades farmacocinéticas <i>in silico</i> do temefós e dos componentes do OEAT.....	27
Tabela 6. Valores de Drug Likeness, Drug score e toxicidade para temefós e os componentes do OEAT.....	28
Tabela 7. Parâmetros de toxicidade ambiental para os sesquiterpenos obtidos do óleo essencial de <i>Anemia tomentosa</i> e temefós.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
aa	Aminoácido
Ach	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AeSCP2	Proteína de transporte de colesterol em insetos
ATR-FTIR	Espectroscopia por Refletância Total Atenuada de Infravermelho com Transformada de Fourier
CG-DIC	Cromatografia gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cLogP	Log de P Calculado (Calculated LogP)
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DL	Drug Likeness
DS	Drug Score
Amu/s	Unidade de Massa Atômica por Segundo (Atomic Mass Unit per Second)
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
Fu	Fração livre
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
LOAEL	Nível do Menor Efeito Observado (Lowest Observed Adverse Effect Level)
m/z	Razão Massa/Carga
MRTD	Dose máxima tolerada recomendada (Maximum Recommended Therapeutic Dose)
OBP1	Proteína de Ligação de Odorante 1
OE	Óleo essencial
OEAT	Óleo essencial de <i>Anemia tomentosa</i>
PDB	Protein Data Bank
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Ro5	Regra dos Cinco de Lipinski
SMILES	Simplified Molecular-Input Line-Entry System
TMS	Tetrametilsilano
TR	Tempo de Retenção
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VD	Volume de Distribuição

Composição química e potencial larvicida do óleo essencial de *Anemia tomentosa* (SAV.) Sw: um estudo *in vitro* e *in silico*

Autor: Vilisaimon da Silva de Jesus

Orientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rosane Moura Aguiar

RESUMO: *Anemia tomentosa* (SAV.) Sw. é uma espécie importante da família Anemiaceae com ocorrência na maioria de estados brasileiros. Suas partes aéreas são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diferentes doenças, mas os estudos químicos com as espécies do gênero são ainda escassos. Neste trabalho foi realizado um estudo químico sobre o óleo essencial de *Anemia tomentosa* (OEAT) visando conhecer sua composição química e seu potencial larvicida frente ao *Aedes aegypti*, através de métodos *in vitro* e *in silico*. O espécime foi coletado no município de Jequié, Bahia, Brasil e o óleo essencial (OE) foi obtido por hidrodistilação utilizando um aparelho tipo Clevenger. Foram utilizadas técnicas cromatográficas e espectrométricas (CG-MS, CG-DIC e NMR mono e bidimensional), caracterizando e semi-quantificando 10 componentes do OE. A composição química do OEAT consistiu de 87,51% de sesquiterpenos, destacando-se Presilphiperfolan-1-ol (42,13%) e Silphiperfol-5-eno (19,47%). O ensaio larvicida *in vitro* com OEAT demonstrou atividade citotóxica, gerando a eliminação total das amostras larvares de *A. aegypti* em 48h de teste. O estudo *in silico* com os compostos químicos desta espécie exibiu potencial de inibição da Acetilcolinesterase (AChE) de *A. aegypti*, com elevadas energias de afinidade entre a enzima e os sesquiterpenos triquinanos, obtendo-se valores entre -6,8 e -8,2 kcal/mol para esses compostos, destacando-os quando comparado com o organofosforado Temefós (-7,5 kcal/mol). O hexanal, presente no óleo, apresenta energia de afinidade semelhante à acetilcolina, composto endógeno (-4,3 kcal/mol e -4,0 kcal/mol, respectivamente). Os compostos químicos identificados no OEAT têm potencial farmacológico para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas larvicidas, além de baixa toxicidade humana e ambiental, como observado nas previsões da ADMETox. O OEAT demonstrou potencial para o desenvolvimento de larvicidas fitoquímicos e análogos semi-sintéticos contra o *A. aegypti*.

Palavras-chave: Anemiaceae, *A. aegypti*, Acoplamento molecular, Inibidores da Acetilcolinesterase, Sesquiterpenos.

Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Anemia tomentosa* (SAV.) Sw: an *in vitro* and *in silico* study

Author: Vilisaimon da Silva de Jesus

Advisor: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rosane Moura Aguiar

ABSTRACT: *Anemia tomentosa* (SAV.) Sw. is an important specie from Anemiaceae family with the occurrence mostly of Brazilian states. This plant is used in traditional medicine for treatment of different diseases, but the chemistry studies with the species from the genus are scarce yet. This work was to carry out a chemical study on the essential oil of *Anemia tomentosa* (EOAT) aiming to know its chemical composition and larvicidal potential on *Aedes aegypti*, through *in vitro* and *in silico* methods. The specimen was collected in the municipality of Jequié, Bahia, Brazil and the essential oil (EO) was obtained by hydrodistillation using a Clevenger apparatus. Chromatographic and spectrometric techniques were used (CG-MS, CG-FID and mono and bidimensional NMR), being characterized from the 10 components of EO. The chemical composition of EOAT consisted of 87.51% of sesquiterpenes, highlighting Presilphiperfolan-1-ol (42.13%) and Silphiperfol-5-ene (19.47%). *In vitro* larvicidal assay with the EOAT demonstrated citotoxicity potential activity up to 48h with 100% of larval deaths of *A. aegypti*. The *in silico* study with the chemical compounds from this species showed potential for inhibition of Acetylcholinesterase (AChE) of *A. aegypti*, with the sesquiterpenes triquinanes activity between -6,8 and -8,2 kcal/mol standing out when compared to the organophosphate Temephos (-7,5 kcal/mol). Hexanal, contained in the oil, presents similar affinity energy to the acetylcholine (-4,3 kcal/mol and -4,0 kcal/mol respectively). The chemical compounds identified in the EOAT have pharmacokinetic potential for the development of larvicidal pharmaceutical formulations, in addition to low human and environmental toxicity, as observed in the ADMETox predictions. The EOAT showed potential for the development of phytochemicals and semisynthetic analogues with larvicidal action against the *A. aegypti*.

Keywords: Anemiaceae; *A. aegypti*; Molecular docking; Acetylcholinesterase Inhibitors; Sesquiterpens.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. PARTE EXPERIMENTAL	15
2.1. Coleta do material vegetal	15
2.2. Extração do óleo essencial e análises cromatográficas	15
2.3. Análises espectrométricas	16
2.4. Ensaio larvicide <i>in vitro</i>	16
2.5. Predição de modelagem por homologia	16
2.6. Conjunto de dados, triagem virtual, acoplamento molecular e ferramentas ADMETox	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
3.1. Análise da composição química do OEAT	18
3.2. Avaliação da atividade <i>in vitro</i> do OEAT	20
3.3. Docking molecular dos compostos majoritários do óleo essencial de <i>Anemia tomentosa</i> (SAV.) Sw contra acetilcolinesterase (AChE) de <i>Aedes aegypti</i>	21
3.4. Predição <i>in vitro</i> de propriedades ADMETox	25
4. CONCLUSÃO	31
5. PERSPECTIVAS	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
APÊNDICES	41
APÊNDICE A	41

Apresentação

Esta Dissertação de Mestrado faz parte dos estudos desenvolvidos no âmbito do Projeto de Pesquisa denominado ***Avaliação da associação de extratos de espécies do gênero Psychotria e óleo essencial de Lippia thymoides no combate de doenças negligenciadas***. Este projeto foi contemplado no edital de bolsas de mestrado FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia) Nº BOL0264/2020.

O trabalho de dissertação foi desenvolvido nos Laboratório de Óleos Essenciais e Laboratório de cromatografia Dr. Jailson Bittencourt da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Jequié. As análises por técnicas de Química Computacional foram realizadas em parceria com o Prof. Dr. Wagner Rodrigues de Assis Soares, no Laboratório de Bioinformática e Química Computacional - UESB-Jequié, e as avaliações da atividade larvicida *in vitro* se deram em colaboração com o Laboratório de Pesquisa de Inseticidas Naturais – UESB-Itapetinga, com as Prof. Dr^{as}. Simone Andrade Gualberto e Débora Cardoso da Silva.

Este trabalho foi escrito seguindo o formato de ***Publicação***, conforme as orientações constantes no ***Manual para Elaboração de Dissertações*** do Programa de Pós-Graduação em Química (PGQUI-UESB). A escrita da dissertação seguiu as instruções do periódico ***Microchemical Journal***, para submissão, e contará com as sugestões da banca para possíveis posteriores alterações.

Além do trabalho principal apresentado nessa dissertação, foram feito alguns trabalhos de colaboração com outros pesquisadores do Programa e externos, os quais geraram publicações (apresentadas nos anexos) em revistas ou capítulos de livros.

Link para acesso ao Manual de dissertações do PGQUI:

http://www2.uesb.br/ppg/ppgquimica/wp-content/uploads/2018/09/Manual-para-elabora%C3%A7%C3%A3o-de-disserta%C3%A7%C3%A3o-Vers%C3%A3o-Final-_01.04.pdf

1. INTRODUÇÃO

Anemia tomentosa (SAV.) Sw é uma espécie pertencente à família Anemiaceae, ocorre frequentemente em regiões rochosas e possui folhas extremamente aromáticas, utilizadas na medicina popular como auxiliar da digestão, expectorantes, antigripais e no tratamento da bronquite. Na América do Sul, encontra-se distribuída em áreas montanhosas das regiões nordeste e central do Brasil, além de Bolívia, Paraguai e Argentina [1-4]. Esse estudo utilizou folhas de *Anemia tomentosa* coletadas na área do bioma Caatinga, num afloramento rochoso no município de Jequié, Bahia, Brasil.

Os óleos essenciais (OE) são formados por metabólitos secundários voláteis e semivoláteis, produzido por mais de 17.500 espécies, sendo armazenado em vários órgãos vegetais como folhas, frutos, flores, raízes e sementes, sendo caracterizados quimicamente pela presença de hidrocarboretos e terpenos [5-7]. Os sesquiterpenos são terpenos com 15 átomos de carbono, oxigenados ou não, com um amplo espectro de atuação farmacológica. O óleo essencial de *Anemia tomentosa* (OEAT) exibe atividades contra tuberculose e outras bactérias, além de atividade repelente [1-4].

O mosquito *A. aegypti* é um dos principais vetores humanos de patógenos e os vírus de dengue, Zika e Chikungunya são exemplos destes que são transmitidos pela fêmea da espécie [8]. Diversos estudos com óleos essenciais demonstram atividade larvicida, atribuída a composição majoritária sesquiterpenos [9-11].

Diversos alvos moleculares tem sido explorados através da busca de inibidores para desenvolvimento de novos larvicidas sustentáveis associado a compostos ativos naturais [12, 13]. Acetilcolinesterase se configura como o principal alvo molecular de ação larvicida por conta da interferência gerada pelos larvicidas que realizam seu bloqueio através de receptores mecanotrópicos, inibindo o movimento da larva, o que impede a sua alimentação, levando desta forma, ao potencial citotóxico e controle químico [14].

Dessa maneira, este trabalho apresenta a avaliação química e farmacológica do óleo essencial extraído da espécie *Anemia tomentosa* (OEAT) no Município de Jequié, Bahia, Brasil. Os resultados da aplicação de técnicas cromatográficas (CG-EM e CG-DIC) e ensaios biológicos "*in vitro*" e estudos "*in silico*" nos permitiram avaliar a composição química e o potencial larvicida contra o *Aedes aegypti* deste óleo essencial. Os dados de RMN confirmaram a identidade dos principais compostos presentes no EOAT.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Coleta do material vegetal

Partes aéreas de *Anemia tomentosa* foram coletadas em fevereiro de 2021 na região de Poço Dantas (latitude -13.8575, longitude -40.0836), zona rural do município de Jequié, Bahia, Brasil. As exsiccatas da planta foram encaminhadas ao Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – HUESB, onde passaram por classificação sistemática sob código de registro 8934.

2.2. Extração do óleo essencial e análises cromatográficas

A extração do OE foi realizada por hidrodestilação de folhas frescas (1300 g) de *Anemia tomentosa* e permitiu a obtenção do OEAT (5,1 g) com rendimento bruto de aproximadamente 0,4% m/m. O óleo essencial obtido apresentou coloração amarelada e odor característico cítrico-amadeirado. O óleo bruto obtido foi passado por uma coluna preenchida com sulfato de sódio anidro para eliminar a umidade. O OEAT (densidade medida em 0,951 g/mL) foi armazenado em freezer com temperatura em torno de -18 °C.

As análises cromatográficas para identificação dos principais constituintes do OEAT foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo QP2010-SE, acoplado a um detector de espectrometria de massas (CG-EM) equipado com um detector de filtro iônico quadrupolo simples, que opera por ionização por impacto de elétrons (EI, 70 eV.), configurado com uma velocidade de varredura de 1000 amu/s e detecção de fragmentos de m/z entre 45 e 800 Da. A separação cromatográfica dos componentes de EOAT utilizou uma coluna capilar Agilent SLB-5ms (5% difenil/95% dimetil siloxano) com dimensões específicas (Comprimento: 30 m × d.i.: 0,32 mm × fd: 0,32 µm). O gás de arraste utilizado foi Hélio, com velocidade linear de 48,4 cm/s e pressão de 22,2 kPa. As amostras foram solubilizadas (1%) em diclorometano e injetadas (1µL) em triplicata no modo split (1:40). O injetor e o detector foram ajustados para operar a 220 e 240 °C, respectivamente. O forno foi programado com taxa de aquecimento de 3°C/minuto, passando de 40 a 280°C, e mantendo a temperatura final por mais 4 minutos. A fonte de íons e a interface foram mantidas a 240 e 280 °C graus, respectivamente. A identificação dos componentes do óleo essencial foi feita por comparação com seus índices de retenção (IR), calculados em uma série de n-alcanos (C8-C36), e por comparação de seus espectros de massa com a biblioteca NIST-14 (match >90%) e literatura [15].

Os constituintes do EOAT foram quantificados utilizando cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-2010 Plus, com detector de ionização de chama (GC-DIC). Os parâmetros de ajuste do tipo de coluna, forno e temperatura de entrada foram iguais aos do CG-EM. As vazões dos gases usados como carreador (coluna, split vent e purga, H₂), chama DIC (H₂) e gás auxiliar (N₂) foram de 14,0 mL.min⁻¹, 40 mL.min⁻¹, e 30 mL.min⁻¹, respectivamente. Um fluxo de 400 mL.min⁻¹ de ar sintético alimentou a chama do DIC. A proporção de divisão da amostra foi de 1:10. Os parâmetros operacionais foram estabelecidos após a verificação da melhor resolução. As injeções foram realizadas em triplicata e os volumes de injeção foram de 1,0 µL.

2.3. Análises espectrométricas

Análises espectrométricas de infravermelho e RMN de ¹H e ¹³C de OEAT foram usadas para melhorar e resolver ambiguidades na identificação de seus constituintes químicos por CG-EM. Os espectros FTIR (4000 a 450 cm⁻¹) foram obtidos em um espectrômetro Perkin-Elmer ATR-FTIR, modelo Spectrum Two. Espectros uni e bidimensionais RMN foram registrados em um espectrômetro Varian Inova 500 NMR (500 MHz), usando TMS como padrão interno e clorofórmio-D como solvente.

2.4. Ensaio larvicide *in vitro*

As larvas de 3º e 4º ínstaes de *A. aegypti* foram obtidas de ovos da linhagem Rockefeller, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Pesquisa em Toxicologia do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As larvas foram colocadas em um recipiente de vidro contendo 30 mL de solução 0,1% (1 mg/mL) de OEAT solubilizado em 0,5% de Tween 80 em água. Cada ensaio utilizou 30 larvas e, após cinco repetições, um total de 150 larvas. As soluções controle foram: (i) Tween 80 0,5% e (ii) H₂O destilada e deionizada. As medições de mortalidade (total de nove) ocorreram após 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, incluindo 24 e 48 horas desde o início do experimento. Os experimentos foram realizados em condições de laboratório. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC).

2.5. Predição de modelagem por homologia

A enzima AChE1 de *A. aegypti* foi modelada através de modelagem por homologia utilizando o Swiss-Modeller PDB e AlphaFold. A sequência proteica foi recuperada do

GenBank para *A. aegypti* (ID: ABN09910.1). O melhor modelo de pontuação usando foi avaliado no Swiss-Modeller tendo como base o QMEAN Global mais próximo de 1,0 e identidade próximo de 100% [16]. O modelo identificado e utilizado para a modelagem por homologia foi o PDB 6ARY. A estrutura modelada passou por um processo de minimização de energia usando o pacote Gromacs 2018 com o campo de força GROMOS96 [17]. No modelo finalizado da proteína-alvo, átomos de hidrogênio foram adicionados e utilizados para análise da acoplagem molecular fazendo o uso do MGL Tools [18]. Todas as imagens e o potencial eletrostático da superfície foram visualizados usando PyMOL e Discovery Studio 2021[16].

2.6. Conjunto de dados, triagem virtual, acoplamento molecular e ferramentas

ADMETox

Todas as moléculas foram verificadas e projetadas usando o software Marvin Sketch. As estruturas moleculares foram baixadas no formato SMILES, e depois, usando o programa Open babel, foram convertidas para um formato *sdf* 3D para cálculos de docking. A estrutura cristalográfica (6ARY) da acetilcolinesterase (AChE) do *Anopheles gambiae* foi obtida do Protein Data Bank (PDB). Todas as simulações de acoplamento foram realizadas com o programa AutoDock Vina. O acoplamento foi realizado entre os ligantes propostos: 10 compostos obtidos no OEAT, acetilcolina (Pub chem CID 187) temefós (pub chem CID 5392) e o receptor, que foram preparados e convertidos para o formato *pdbqt* usando o programa Autodock tools. Os resultados do docking e a avaliação de cada complexo receptor-ligante, como energia de afinidade (Kcal/Mol) e posicionamento do ligante dentro do sítio ativo da acetilcolinesterase foram analisados usando o programa PyMOL 2.1. Nove conformações de ligantes foram geradas para cada complexo e retornaram suas respectivas energias de afinidade. Em seguida, todas as melhores conformações ligante-proteína selecionadas foram representadas graficamente usando PyMOL 2.1, e seus respectivos mapas de interação 2D foram gerados usando o programa Discovery Studio 4.5. As propriedades do ADMETox foram avaliadas pelos programas Data Warrior™, PkCSM™ e EPA™.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise da composição química do OEAT

O OEAT foi obtido (0,4% m/m) na forma de um óleo de coloração amarelada e odor cítrico-amadeirado e densidade (0,951 g/mL) característico de um óleo essencial rico em terpenoides. Os dados físico-químicos e atributos organolépticos da OEAT são semelhantes aos observados em estudos anteriores [4, 19]. O baixo rendimento obtido para OEAT apresentou similaridade com as espécies *A. radianna* e *A. hirsuta* [20] e pode estar relacionada ao clima quente da região onde a espécie foi estudada, localizada no semiárido baiano [21].

. **Tabela 1:** Constituintes químicos do OEAT identificados por CG-EM, RMN e FTIR.

TR (min)	Constituintes químicos	Classe	Área (%)	IR _{calc}	IR _{lit.}
5.924	Hexanal (1)	AL	1,47 ± 0,66	802	801
25.475	7- <i>epi</i> -Silphiperfol-5-ene (2)	SH	0,56 ± 0,02	1329	1328
25.849	Presilphiperfol-7-ene (3)	SH	5,72 ± 0,12	1333	1336
26.291	Silphiperfol-5-ene (4)	SH	19,47 ± 0,26	1350	1348
30.288	α-Murolene (5)	SH	4,02 ± 0,13	1496	1500
33.229	Silphiperfolan-6-α-ol (6)	OS	3,52 ± 0,16	1509	1507
33.423	Cameroonan-7-α-ol (7)	OS	4,15 ± 0,01	1512	1511
33.671	Presilphiperfolan-1-ol (8)	OS	42,13 ± 0,23	1515	1518*
35.925	Prenopsan-8-ol (9)	OS	4,69 ± 0,06	1570	1577
36.365	Presilphiperfolan-8-ol (10)	OS	3,25 ± 0,03	1586	1586
Total			88,98± 0,19		
Aldehydes		AL	1,47 ± 0,66		
Sesquiterpene hydrocarbons		SH	29,77 ± 0,13		
Oxygenated sesquiterpenes		OS	57,74 ± 0,10		

IR_{calc} – Índice de retenção cromatográfico calculado com padrão seriado de hidrocarbonetos (C8-C26).

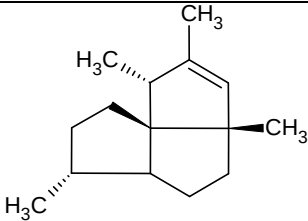
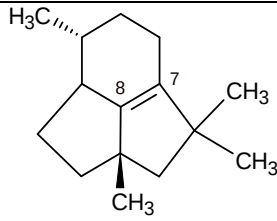
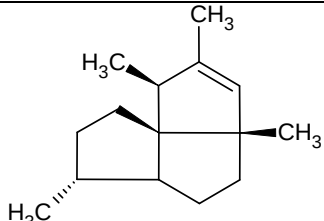
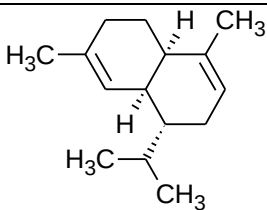
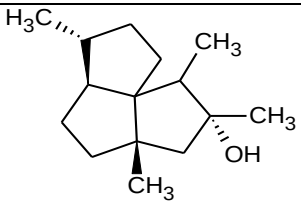
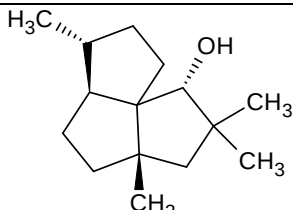
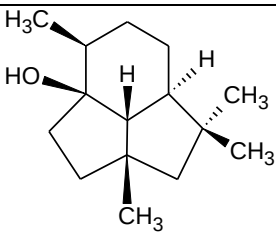
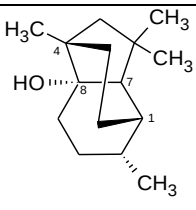
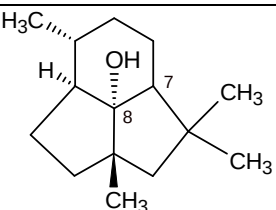
IR_{lit} - Índice de retenção cromatográfico reportado (Base de dados spectral NIST14 e literatura).

*Pinto, *et al.*, 2009

As análises CG-EM e CG-DIC (**Tabela 1**) permitiram a identificação e semiquantificação de dez constituintes químicos principais do óleo essencial de folhas frescas de *Anemia tomentosa*, revelando prevalência de sesquiterpenos (87,5%). O principal constituinte do EOAT é o sesquiterpeno triquinano, presilphiperfolan-1-ol (8, TR

em 33,671 min, 42,13%). A análise dos espectros de RMN mostrou um sinal de ^{13}C (C-OH) mais intenso a 84,90 ppm, referente ao composto (8) [4, 22]. O composto (8) foi isolado das folhas de *Anemia tomentosa* (extrato de acetato de etila) por cromatografia líquida em coluna de sílica gel eluída com hexano:acetato de etila (9:1 v/v) e análise de seus dados espectrométricos (Atividade óptica $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$, FTIR, e RMN) de (8) confirmaram sua identificação como Presilphiperfolan-1-ol [23, 24]. Veja a **Tabela 2**.

Tabela 2. Estruturas dos constituintes sesquiterpênicos do OEAT elucidados por CG-EM, RMN e FTIR, e comparação com dados espectrais da literatura.

		
(2): MS: M^+ m/z 204 (35%), 189 (33%), 175 (64%), 161 (24%), 133 (54%), 122 (100%); NMR: δ_{H} 4.94 (H-5, <i>s-br</i>), δ_{C} 133.11 (C-5), 142.43 (C-6).	(3): MS: M^+ m/z 204 (20%), 189 (38%), 161 (53%), 147 (51%), 119 (100%), 105 (58%); NMR: δ_{C} 131.55 (C-8), 161.07 (C-7).	(4): MS: M^+ m/z 204 (21%), 189 (38%), 161 (53%), 147 (51%), 133 (35%), 119 (100%); NMR: δ_{H} 4.90 (H-5, <i>s-br</i>), δ_{C} 133.46 (C-5), 140.80 (C-6).
		
(5): MS: M^+ m/z 204 (13%), 189 (21%), 161 (40%), 148 (74%), 133 (63%), 91 (100%); NMR: δ_{H} 0.71 e 0.79 (H-12 e H-13, <i>d</i>, $J=7$ Hz), δ_{C} 120.63 e 134.18 (C-5 e C-4), δ_{C} 124.38 e 135.93 (C-9 e C-10).	(6): MS: M^+ m/z 222 (12%), 207 (23%), 175 (5%), 151 (55%), 135 (%), 107 (28%); NMR: δ_{H} 2.18 (H-1, <i>dd</i>, 8.0, 5.5 Hz); δ_{C} 9.49 (7-Me), δ_{C} 78.48 (C-6),	(7): MS: M^+ m/z 204 (9%), 166 (19%), 135 (100%), 124 (36%), 109 (32%), 96 (45%); NMR: δ_{H} 3.58 (H-7, <i>t</i>, $J=6.5$ Hz), δ_{C} 89.69 (C-7).
		
(8): MS: M^+ m/z 222.05 (<1%), 207 (20 %), (%), 189 (3%), 165 (57%), 123 (100%); NMR: δ_{H} 1.64 (H-8, <i>d</i>, $J=8.5$Hz), δ_{C} 84.90 (C-1). FTIR cm^{-1}: 3450 (OH), 2950 (CH), 1450 (CH_3), 1370 (CH_2); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -52.0$ (CHCl_3, 2.0).	(9): MS: M^+ m/z 222 (15%), 207 (27%), 137 (100%), 111 (78%), 95 (45%), 83 (63%); NMR: δ_{H} 2.02 (H-2_{ax}, <i>ddd</i>, 15.0, 12.0, 8.0 Hz); δ_{C} 82.11 (C-8).	(10): MS: M^+ m/z 222 (<1%), 207 (%), 189 (%), 161 (%), 149 (%), 119 (100%); NMR: δ_{H} 2.74 (H-1, <i>dd</i>, $J=9.5, 3.0$ Hz), δ_{C} 96.93 (C-8).

A análise complementar dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do OEAT identificou sinais característicos de deslocamentos químicos de sesquiterpenos com hidroxilas de álcoois e uma ligação dupla ($\text{C}=\text{C}$) [25], permitindo a caracterização estrutural de seus nove sesquiterpenos constituintes. Os valores de deslocamento em δ_{H} 1,64 (d, $J=8,5$, H-8) e δ_{C} 84,90 (C-1) foram atribuídos ao Presilphiperfolan-1-ol (**8**), o constituinte mais abundante da OEAT [23]. Os valores de deslocamento de prótons em δ_{H} 4,94 (H-5, *s-br*), 4,90 (H-5, *s-br*) e 5,43 (H-5 e H-9, *m*) foram atribuídos a quatro prótons olefínicos dos sesquiterpenos (**2**), (**4**) e (**5**), respectivamente [26, 27]. No espectro de RMN, quatro outros sinais de sesquiterpenos oxigenados também foram observados em δ_{C} 78,48 (C-6), 89,69 (C-7), 82,11 (C-8) e 96,93 (C-8), atribuídos ao oxigenado sesquiterpenos Silphiperfolan-6- α -ol (**6**), Camaronan-7 α -ol (**7**), Prenopsan-8-ol (**9**) e Presilphiperfolan-8 α -ol (**10**), respectivamente [28, 29]. Os cinco pares de sinais de RMN ^{13}C de carbono olefínico observados em δ_{C} 133,11 e 142,40 ($\text{C}_5=\text{C}_6$), δ_{C} 141,55 e 161,07 ($\text{C}_8=\text{C}_7$), δ_{C} 133,46 e 140,80 ($\text{C}_5=\text{C}_6$), δ_{C} 120,63 e 134,18 ($\text{C}_9=\text{C}_{10}$) ($\text{C}_8=\text{C}_9$), δ_{C} 124,38 e 135,93 ($\text{C}_5=\text{C}_4$) ($\text{C}_3=\text{C}_4$) foram atribuídos aos compostos (**2**), (**3**), (**4**) e (**5**) do OEAT, este último possuindo duas ligações duplas, respectivamente [22, 26, 27]. Consulte a **Tabela 2**.

3.2. Avaliação da atividade *in vitro* do OEAT

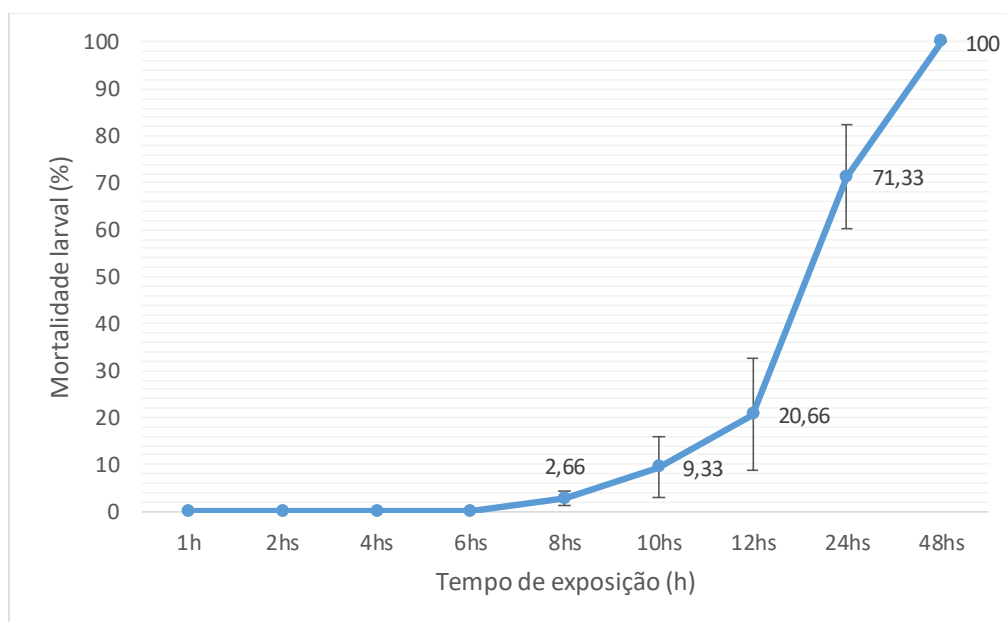
Os resultados encontrados mostram ampla atividade larvícida para OEAT (**Figura 1**). Após 24 horas da avaliação, 71,31% das larvas de *A. aegypti* haviam sido eliminadas, com posterior eliminação total (100%) em 48 horas de teste. A alta concentração de sesquiterpenos encontrada no EOAT justifica a toxicidade para larvas de insetos [8].

A diversidade química dos terpenos permite variação no seu grau de polaridade, podendo assim aumentar a absorção de substâncias tanto lipofílicas quanto hidrofílicas através das membranas, contribuindo para a ação sinérgica decorrente da combinação entre os componentes do óleo. Com isso, a variação do gradiente de lipofilicidade que resulta de uma mistura de sesquiterpenos neutros e funcionalizados pode justificar a atividade larvícida dessa classe de compostos [30, 31].

Os sesquiterpenos presentes nos óleos essenciais podem apresentar atividades em diferentes locais-alvo nas larvas. A inibição da oviposição pode ser obtida pela interação com a proteína de ligação de odorante 1 (OBP1), um dos membros mais importantes no sistema olfativo [32]. As atividades desses constituintes do OE são relatadas em outros

receptores e proteínas, como o receptor do ácido γ -aminobutírico (GABA), causando morte por superativação do sistema nervoso; bloqueio da proteína responsável pelo transporte de colesterol em insetos (AeSCP2) presente em altas concentrações nas larvas; e inibição da acetilcolinesterase (AChE), gerando um efeito neurotóxico semelhante ao produzido por inseticidas organofosforados e carbamatos [33, 34].

Figura 1: Mortalidade (%) acumulativa das larvas do *A. aegypti*, em relação ao tempo de exposição ao tratamento com OEAT.



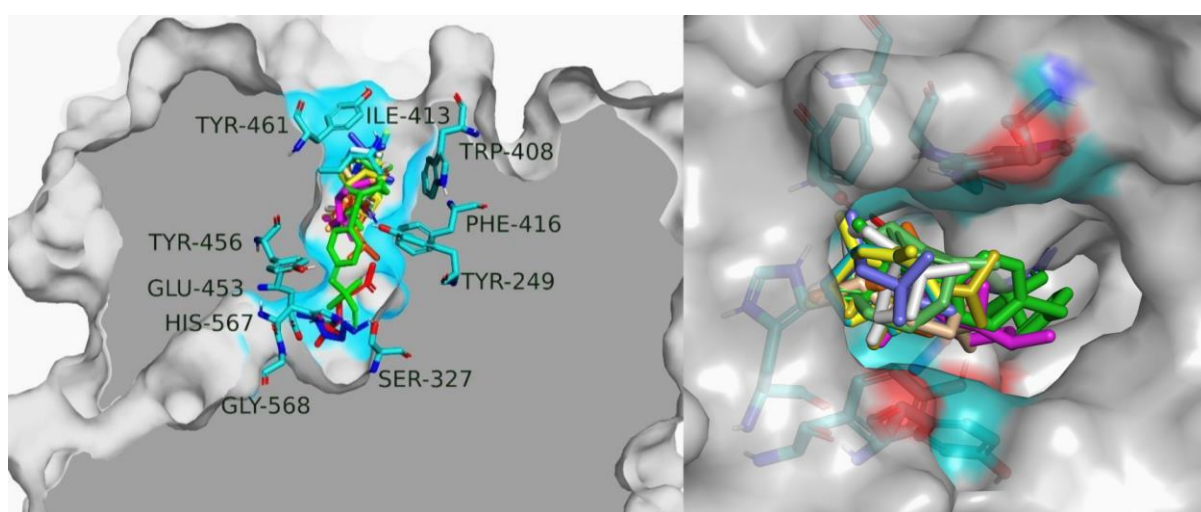
Os sesquiterpenos triquinanos como **(3)**, **(7)** e **(10)** são descritos na literatura possuindo atividade larvicida [35]. Estudo conduzido por Pavela e cols. (2016) relatou a ação larvicida destes compostos frente a espécie de *Culex quinquefasciatus* Say, o agente transmissor da filariose [36]. Silphiperfolanos, Presilphiperfolanos, Cameroonanos são grupos de sesquiterpenos derivados do cariofileno [37]. O OEAT mostrou-se rico em compostos que apresentam esqueleto cariofilênico o que corrobora sua alta atividade larvicida apresentada por esse produto natural [11, 35].

3.3. Docking molecular dos compostos majoritários do óleo essencial de *Anemia tomentosa* (SAV.) Sw contra acetilcolinesterase (AChE) de *Aedes aegypti*

O melhor modelo de pontuação usado foi avaliado no Swiss-Modeller tendo como base o QMEAN Global de 0,92 (quanto mais próximo maior a acurácia do modelo) e

identidade de 92,58%, mostrando que a estrutura modelada mantém alto grau de homologia para AChE do *Aedes aegypti*. O resultado do docking molecular indica que todos os sesquiterpenos descritos para o óleo essencial de *Anemia tomentosa* interagem com os aminoácidos do sítio ativo da (AChE) de *Aedes aegypti*, apresentando energias de afinidade que variam entre -4,0 e -8,2 kcal/mol demonstrando potencial para inibição da enzima com energias superiores ao larvicida Tamefós (-7,5 kcal/mol), com exceção do **(1)** (-4,3 kcal/mol) que apresentou energia similar ao ligante endógeno acetilcolina (-4,0 kcal/mol). O sítio ativo desta enzima tem um formato de canal iônico, com 10 resíduos aminoácidos mais representativos, dos quais os compostos sesquiterpenos se ligam com um comportamento bem característico na entrada do canal (**Figura 2**).

Figura 2: Acoplamento molecular dos componentes do óleo essencial frente a enzima AChE de *A. aegypti*



Em **cinza**: destaca-se o sítio ativo em forma de “desfiladeiro” da AChE do *Aedes aegypti*; **Vermelho**: Acetilcolina; **Verde**: Temefós; **Azul**: Hexanal; **Amarelo**: Silphiperfol-5-eno; **Magenta**: Presilphiperfol-7-eno, **Ciano**: α -Muurolene, **Laranja**: Silphiperfolan-6 α -ol; **Bege**: Cameroon-7 α -ol.

A AChE em artrópodes exerce importantes funções fisiológicas envolvidas na manutenção de mecanismos de transmissão neuronal e locomoção, o que favorece o processo de exploração do ambiente e alimentação [13, 38], sendo o sítio ativo desta enzima, conservado evolutivamente entre espécies de mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Anopheles* [39, 40]. A AChE é um dos principais alvos para inseticidas e a perturbação deste receptor leva à acumulação de acetilcolina (ACh) causando hiperestimulação e eventual bloqueio da neurotransmissão em insetos [13, 41].

De forma geral, os sesquiterpenos compõe óleo essencial quase em sua totalidade e possuem estruturas químicas similares, com pequenas variações estruturais, o que justifica energias de afinidade muito próximas. Os sesquiterpenos majoritários, **(4)** (-8,2 kcal/mol) e **(8)** (-7,6 kcal/mol) apresentaram melhor afinidade do que o larvicida Tamefós (-7.2 kcal/mol), sendo o resultado *in silico*, correspondente com os dados do ensaio *in vivo*, no qual a atividade larvicida apresentou 100% de inibição em 48h. Foi possível inferir com a integração de dados computacionais e biológicos, que atividade biológica pode estar associada tanto ao potencial individual dos compostos isolados, inclusive os majoritários, quanto pela ação sinérgica entre eles. Os compostos terpenoides presentes em óleos essenciais tem grande potencial neurotóxico e, em insetos, provocam paralisia seguida de morte, levando a caracterizá-los como bioinseticidas. Dentre os alvos moleculares associados ao sistema nervoso de insetos a AChE é um dos mais investigados [13]. Os parâmetros de energia de afinidade são exibidos na **Tabela 3**.

Tabela 3. Interações intermoleculares dos sesquiterpenos do OEAT no sítio ativo da AChE de *A. aegypti*.

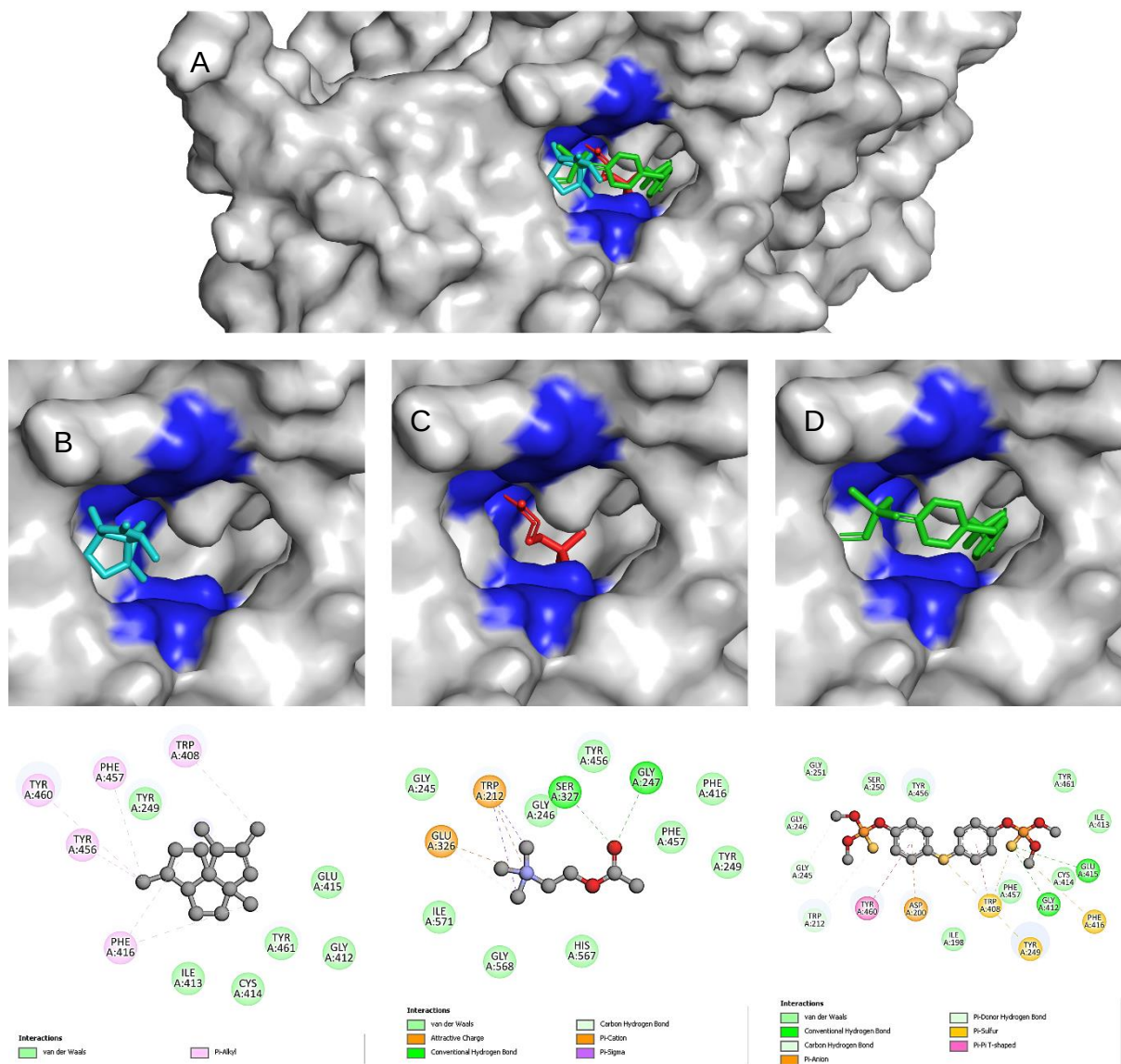
Comp	EF	HIS567	TYR460	TYR456	PHE416	TRP408	GLY247	GLY246	GLY245
Lig1	-8.2	-	PiA	PiA	PiA	PiA	-	-	-
Lig2	-8.2	-	PiA	PiA	PiA	PiA	-	-	-
Lig3	-7,9	-	PiA	PiA	Vw	PiA	-	-	-
Lig4	-7,9	-	PSg	PiA	Vw	PiA	-	-	-
Lig5	-7,7	-	PSg	PiA	VW	PiA	-	-	-
Lig6	-7,6	-	PiA	PiA	PiA	PiA	-	-	-
Lig7	-7,6	-	PiA	PiA	PiA	PSg	-	-	-
Lig8	-7,6	-	PiA	PiA	Vw	PSg	-	-	-
Lig9	-7,5	-	TS	Vw	PSu	PSu	-	Vw	PiD
lig10	-6,8	-	PiA	PiA	PiA	Vw	Vw	-	-
Lig11	-4,3	-	-	PSg	-	-	-	Vw	Vw
Lig12	-4	-	-	Vw	Vw	-	HB	Vw	Vw
Lig13	-6.4	Vw	-	TS	PiA	-	CH	Vw	Vw

EF (Kcal / Mol): Energia de afinidade; **Vw:** Interação de Van der Waals; **TS:** Interações tipo π - π ; **HB:** Ligação de hidrogênio; **A:** Interações alquílicas; **PiA:** Interações π -alquil; **PSg:** Ligação π - δ ; **CH:** Ligação C-H. **PSu:** Interação π -S; **PiD:** Ligação H - π -doador; **Lig1:** 7-*epi*-Silphiperfol-5-ene; **Lig2:** Silphiperfol-5-ene **Lig3:** Cameroon-7 α -ol; **Lig4:** Silphiperfolan-6 α -ol; **Lig5:** Presilphiperfol-7-ene; **Lig6:** Presilphiperfolan-1-ol; **Lig7:** Prenopsan-8-ol; **Lig8:** Presilphiperfolan-8-ol ; **Lig9:** Tamefós; **Lig10:** α -Muuroolene; **Lig11:** Hexanal; **Lig12:** Acetylcholine; **Lig13:** 2-methyl-1-[1-(pentan-3-yl)-1H-pyrazol-4-yl]propan-1-one (Keniya et al., 2018).

Todos os compostos presentes no óleo essencial interagem na entrada do “desfiladeiro” da AChE mostrando características em potencial para o desenvolvimento de novos inibidores naturais como alternativa a crescente resistencia aos larvicidas

organofosforados [40]. Alguns fatores podem estar associados ao maior potencial de atividade larvica de um óleo essencial, tais como: a concentração relativa de cada constituinte na mistura presentes no óleo essencial [48], o tamanho espacial das moléculas [38], presença de menos anéis na sua estrutura associado a maior atividade [49, 50]. Portanto, encontrar atividade inibidora sobre a AChE, esta associada ao potencial sinérgico presente entre seus compostos, bem como sua capacidade seletiva e de irreversibilidade. Comparado aos sesquiterpenos, os monoterpenos são bem estudados e demonstram ter um menor potencial inibitório sobre a enzima [51].

Figura 3. Mapa 2D das interações dos aminoácidos do bolso de ligação do canal da AChE do *Aedes aegypti*.



A. Complexo AChE com os principais ligantes; **B.** Complexo receptor-7-epi-Silphiperfol-5-ene enzima AChE; **C.** Complexo Receptor-Acetilcolina Enzima AChE; **D.** Complexo receptor-Temefós enzima AChE.

Diferenças estruturais na posição dos aminoácidos podem ser estratégias que levam a seletividade de compostos ao sítio ativo da AChE de *Aedes* em detrimento da mesma enzima em humanos. Divergências na entrada do “desfiladeiro” entre mosquitos (cisteína livre) e seres humanos (Phe295) podem ser um alvo potencial para inibidores seletivos covalentes [52, 53]. O resíduo de serina catalítica mostra que é possível encontrar taxas elevadas de inibição seletiva para enzima do mosquito, em detrimento da enzima de vertebrados [54, 55, 56]. Embora o potencial de inibidores covalentes tenha sido investigado em vários estudos, os inibidores com um modo de ação diferente, tais como inibidores não covalentes, são menos bem explorados [38, 56]. Além disso, uma das barreiras para o desenvolvimento de novos inseticidas é ultrapassar a crescente resistência aos inibidores de AChE conferida, por mutações no sítio ativo. Apesar da presença de mutações, estudos mostram que é possível atingir enzimas mutantes resistentes com inibidores não covalentes, dentre os quais, aqueles obtidos de OEs [33, 42].

Os sesquiterpenos triquinanos estudados possuem estrutura química semelhante em virtude de serem obtidos pela mesma rota quimiossintética, apresentaram características similares de energia de afinidade e interação com o sítio enzimático [57]. Assim, como pode ser exemplificado na **Figura 3**, para o composto **(2)**, todas as moléculas formaram um complexo com o sítio ativo da AChE. Os 3 ligantes com melhores energias: **(2)** (-8,2 kcal/Mol), **(4)** (-8,2 kcal/Mol), **(6)** (-7,9 kcal/Mol), apresentaram melhores interações intermoleculares, prevalecendo Van Der Waals, Interações π -alquil e polar (π -alquil) com resíduos de aminoácidos (aa) presentes no sítio catalítico da enzima como: Cys414, Glu415, Phe416, Phe457 (**Figura 3**). O temefós interage com 19 resíduos aa, a acetilcolina com 13 resíduos aa, e os compostos naturais variam entre 9 e 11 interações, sendo aqueles compostos que apresentam estruturas triquinanas. Com exceção de **(1)**, todos os compostos interagem com pelo menos 8 aminoácidos semelhantes ao temefós, em particular aqueles envolvidos no sítio catalítico da enzima (Tyr460, Tyr456, Tyr249, Tyr461, Ile413, Gly412, Glu415, Phe416, Phe457, Trp408).

3.4. Predição *in vitro* de propriedades ADMETox

As predições *in silico* para os parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos e toxicológicos dos sesquiterpenos identificados no óleo de *Anemia tomentosa*, demonstraram que estes compostos apresentam boa absorção oral e biodisponibilidade, de acordo com a regra dos 5 de Lipinski (Ro5) (**Tabela 4**). Os sesquiterpenos apresentaram

uma baixa área de superfície polar (159.6-181.9 Å), alta taxa de absorção intestinal (94.1-98.6%) e um melhor perfil de lipossolubilidade (cLogP) quando comparada ao temefós (88,8%) [58]. Devido a suas estruturas químicas muito similares, apresentam volumes de distribuição (VDs= 0,78) e elevada ligação às proteínas plasmáticas como caracteres semelhantes. Estas moléculas revelaram uma elevada capacidade de distribuição aos tecidos, demonstrada pela baixa fração de droga não-ligada no plasma sanguíneo ($F_u = 0.18$) quando comparado ao Temefós ($F_u = 0,0$) que, com maior concentração nos tecidos em detrimento ao sangue, pode vir a induzir maior toxicidade. Desta forma, os sesquiterpenos triquinanos tem um melhor perfil para distribuição em tecidos humanos (**Tabela 5**). Os sesquiterpenos não apresentaram hepatotoxicidade e possuem bom perfil de excreção renal quando comparado ao Temefós, o que pode auxiliar na sua metabolização e excreção caso entrem em contato com o organismo humano durante a utilização como larvicida [59].

Tabela 4. Parametros físico-químicos do temefós e dos sesquiterpenos do OEAT.

Molecules	EF	MW	cLogP	HBA	HBD	RO5	RB	TPSA
Lig1	-8.2	204.35	39.82	0	0	-	5	160.11
Lig2	-8.2	204.35	39.82	0	0	-	15	160.11
Lig3	-7,9	222.37	32.96	1	1	-	14	165.92
Lig4	-7,9	204.35	41.53	0	0	-	15	159.58
Lig5	-7,7	204.35	41.53	0	0	-	18	159.58
Lig6	-7,6	222.37	3.26	1	1	-	0	165.92
Lig7	-7,6	224.39	41.00	1	1	-	0	181.94
Lig8	-7,6	222.37	3.26	1	1	-	0	165.92
Lig9	-7,5	204.35	4.25	0	0	-	0	176.24
Lig10	-6,8	100.16	16.56	1	0	-	0	100.34
Lig11	-4,3	146.21	-31.09	3	0	-	0	123.69
Lig12	-4	466.47	56.17	6	0	-	0	337.01

EF (Kcal / Mol): Energia de afinidade; **HBA:** Aceptor de ligação de hidrogênio; **HBD:** Doador de ligação de hidrogênio; **cLogP:** Lipossolubilidade; **MW (g/Mol):** Peso molecular; **TPSA (Å):** Superfície de área polar; **RO5:** Regra dos 5 de Lipinski; **RB:** Número de ligações rotacionáveis. **Lig1:** 7-*epi*-Silphiperfol-5-ene; **Lig2:** Silphiperfol-5-ene; **Lig3:** Cameroon-7- α -ol; **Lig4:** Silphiperfolan-6 α -ol; **Lig5:** Presilphiperfol-7-ene; **Lig6:** Presilphiperfolan-1-ol; **Lig7:** Prenopsan-8-ol; **Lig8:** Presilphiperfolan-8-ol; **Lig9:** Temefós; **Lig10:** α -Murolene; **Lig11:** Hexanal; **Lig12:** Acetilcolina.

Os sesquiterpenos analisados não interferem na atividade enzimática da CYP3A4, a principal enzima do complexo microsomal hepático responsável pela metabolização da grande maioria das substâncias químicas administradas oralmente, indicando uma facilidade de biotransformação, além de favorecer o processo de desintoxicação e eliminação do organismo (**Tabela 6**) [59]. Somado ao baixo risco de dano hepático, tais

compostos exibem maior taxa de clearance renal (0.43-0,99 log mg/kg/dia) quando comparada ao temefós (0.09log mg/kg/dia) podendo ser mais facilmente excretados. Devido à característica lipofílica destes compostos (**Tabela 5**), os mesmos podem fixar e penetrar com maior facilidade na estrutura das larvas, aumentando, conseqüentemente, seu poder de inibição, com menor impacto ao ser humano quando comparado ao temefós, que pode ser mais facilmente absorvido quando inalado, através da pele ou por ingestão (**Tabela 6**) [60, 61].

Tabela 5. Propriedades farmacocinéticas *in silico* do temefós e dos componentes do OEAT.

Molecules	%Abs	VDss	Fu	1A2	2C19	2C9	2D6	3A4	Hept.	TC
Lig1	96,68	0,75	0,11	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	0.99
Lig2	96,68	0,75	0,11	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	0.99
Lig3	92.83	0,75	0.21	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	0.79
Lig4	98.66	0.78	0.01	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	0.97
Lig5	95.43	0.78	0.18	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0.82
Lig6	94.14	0.54	0.32	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	0.76
Lig7	93.27	0.4	0.37	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0.81
Lig8	95.18	0.57	0.35	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	0.78
Lig9	88.80	-0.21	0	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	-0.09
Lig10	96.59	0.67	0.22	Não	Não	Não	Não	Não	Não	1.18
Lig11	95.79	0.05	0.58	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0.43
Lig12	100	0.14	0.81	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0.84

%Abs: Porcentagem absorvida; VDss: Volume de distribuição (logL.kg⁻¹), Fu: Fração livre; 1A2 = CYP1A2; 2C19 = CYP2C19; 2C9 = CYP2C9; 2D6 = CYP2D6; 3A4 = CYP3A4: Se a molécula é um inibidor enzimático ou não; Hept.: Hepatotoxicidade, TC: Depuração renal (log mg/kg/dia), **Lig1**: 7-*epi*-Silphiperfol-5-ene; **Lig2**: Silphiperfol-5-ene; **Lig3**: Cameroonanol-7 α -ol; **Lig4**: Silphiperfolan-6 α -ol; **Lig5**: Presilphiperfol-7-ene; **Lig6**: Presilphiperfolan-1-ol; **Lig7**: Prenopsan-8-ol; **Lig8**: Presilphiperfolan-8-ol; **Lig9**: Temefós; **Lig10**: α -Murolene; **Lig11**: Hexanal; **Lig12**: Acetilcolina.

De acordo com o perfil de toxicidade, os valores de LD50 e toxicidade máxima tolerada em humanos (MRTD) observados para os sesquiterpenos estão numa faixa segura para a ingestão humana. Os valores de toxicidade oral crônica em ratos (LOAEL) encontrados são superiores quando comparados ao larvicida temefós, o que demonstra que os compostos naturais tem melhor faixa de segurança para uso em doses crônicas

(**Tabela 7**). Por se tratarem de estruturas químicas autênticas, os valores de Drug Likeness (DL) e Drug Score (DS) para os sesquiterpenos diferem daqueles apresentados pelo temefós, demonstrando potencial para desenvolvimento de novos compostos naturais e semissintéticos derivados de suas estruturas [61]. Os compostos naturais tiveram ausência de alertas toxicológico com exceção do hexanal que apresentou potencial atividade mutagênica, irritante e agressora do sistema reprodutivo, contudo seu potencial agressivo pode ser avaliado em cultivos celulares (*in vitro*) e modelos *in vivo* [60].

Tabela 6. Valores de Drug Likeness, Drug score e toxicidade para temefós e os componentes do OEAT.

Moléculas	DL	DS.	Mut.	Tum.	Rep.	Irrit.	LD50	LOAEL	MRTD
Lig1	0.4877	0.4877	Não	Não	Não	Não	1.639	1.428	0.07
Lig2	0.4877	0.4877	Não	Não	Não	Não	1.639	1.428	0.07
Lig3	-2.336	0.4476	Não	Não	Não	Não	1.681	1.219	-0.22
Lig4	-3.490	0.3885	Não	Não	Não	Não	1.695	1.438	0.145
Lig5	-2.922	0.3966	Não	Não	Não	Não	1.602	1.370	0.075
Lig6	-1.067	0.5206	Não	Não	Não	Não	1.771	1.473	0.236
Lig7	-2.963	0.3975	Não	Não	Não	Não	1.998	1.609	0.583
Lig8	-1.747	0.4761	Não	Não	Não	Não	1.783	1.213	0.363
Lig9	-3.942	0.0281	Baixa	Alta	Alta	Alta	3.279	0.554	0.687
Lig10	-3.433	0.3884754	Não	Não	Não	Não	1.543	1.503	0.37
Lig11	-14.29	0.1037099	Alta	Não	Alta	Alta	1.762	1.922	0.833
Lig12	-1.438	0.590093	Não	Não	Não	Não	2.313	1.922	0.345

DL: Druglikness, **DS:** Drugscore, **Mut:** Mutagenicidade, **Tum:** Tumorigenicidade, **Rep:** Efeitos no sistema reprodutor **Irrit:** Efeitos irritativos, **LD₅₀:** Toxicidade aguda oral em ratos (mol.kg-1), **LOAEL:** Toxicidade crônica oral em ratos (log mg.kg-1_bw.day-1), **MRTD:** Dose máxima tolerada recomendada (log mg/kg/dia). **Lig1:** 7-*epi*-Silphiperfol-5-ene; **Lig2:** Silphiperfol-5-ene; **Lig3:** Cameroon-7- α -ol; **Lig4:** Silphiperfolan-6 α -ol; **Lig5:** Presilphiperfol-7-ene; **Lig6:** Presilphiperfolan-1-ol; **Lig7:** Prenopsan-8-ol; **Lig8:** Presilphiperfolan-8-ol ; **Lig9:** Temefós; **Lig10:** α -Muurolene; **Lig11:** Hexanal; **Lig12:** Acetilcolina.

A redução do número de mosquitos vetores é uma estratégia comprovada para controlar a transmissão de doenças. As quatro principais classes de inseticidas mais

utilizados no controle de mosquitos vetores, são: os hidrocarbonetos clorados, organofosforados, carbamatos e piretroides [39]. A predição utilizando o software da agencia americana de proteção ambiental (EPA), mostra que os compostos sesquiterpenos triquinanos, quando comparado ao temefós (organofosforado), podem apresentar característica de menor impacto ao meio ambiente.

Tabela 7. Parâmetros de toxicidade ambiental para os sesquiterpenos obtidos do óleo essencial de *Anemia tomentosa* e temefós.

Molecules	Lkw.	BD.	PT	BE	Vw	HLL	TR	TB	TSa	Tair
Lig1	-4.13	0.05	Não	Não	Alta	Alta	2.003	0.695	-0.84	-0.84
Lig2	-0.92	0.22	Alta	Não	Baixa	Não	1.849	1.967	0.18	0.18
Lig3	3.04	0.90	Não	Não	Não	Não	2.384	1.006	0.465	0.465
Lig4	-25.56	0.21	Não	Não	Não	Não	1.951	3.075	-0.627	-0.627
Lig5	-25.56	0.24	Não	Não	Não	Não	1.885	2.994	-0.497	-0.497
Lig6	-28.97	0.05	Alta	Alta	Não	Alta	1.887	3.066	-0.445	-0.445
Lig7	-25.22	0.18	Não	Não	Não	Não	1.933	3.291	-0.452	-0.452
Lig8	-25.22	0.05	Alta	Alta	Não	Alta	1.888	3.138	-0.392	-0.392
Lig9	-25.22	0.23	Não	Não	Não	Não	1.869	3.062	-0.348	-0.348
Lig10	-25.22	0.09	Não	Alta	Não	Alta	1.855	2.988	-0.293	-0.293
Lig11	-25.22	0.09	Não	Alta	Não	Alta	1.855	2.988	-0.293	-0.293
Lig12	-25.22	0.09	Não	Alta	Não	Alta	1.855	2.988	-0.293	-0.293
Lig13	-25.22	0.09	Não	Alta	Não	Alta	1.855	2.988	-0.293	-0.293

Parametros descritos pela Agencia Internacional de proteção ambiental do EUA (EPA). **log kow (Lkw)**.; **fast biodegradability (BD)**: biodegradabilidade ambiente, **Persistence time (PT)**: tempo de persistência no ambiente, **Bioaccumulation estimation (BE)**: estimativa de bioacumulação no ambiente, **Volatilization from Water (Vw)**: capacidade de volatilização em água, **half-time lake model (HLL)**: tempo de meia-vida em lago, **total removal (TR)**: capacidade de remoção do ambiente, **Total biodegradation (TB)**: tempo de biodegradação no ambiente, **Total sludge adsorption (TSa)**: tempo de absorção em lodos, **Total to Air (Tair)**: tempo de acumulo de partículas no ar. **Lig1**: 7-*epi*-Silphiperfol-5-ene; **Lig2**: Silfiperfol-5-eno; **Lig3**: Cameroon-7- α -ol; **Lig4**: Silphiperfolan-6- α -ol; **Lig5**: Presilphiperfol-7-ene; **Lig6**: 9- β -presilphiperfolan-1 α -ol; **Lig7**: Prenopsan-8-ol; **Lig8**: Presilphiperfolan-8-ol ; **Lig9**: Temefós; **Lig10**: α -Muurolene; **Lig11**: Hexanal; **Lig12**: Acetylcholine; **Lig13**: 2-methyl-1-[1-(pentan-3-yl)-1H-pyrazol-4-yl]propan-1-one

Encontrar a seletividade para estes compostos em mosquitos é o desafio para desenvolvimento de novos bioinseticidas visto que a AChE de vertebrados tem similaridades com a dos mosquitos vetores (febra amarela e Aedes). Contudo, as suas

diferenças estruturais, principalmente associadas a mudança aminoácidos na entrada do sitio, tais como os resíduos de cisteína livre na entrada do canal do receptor ativo de mosquitos, que em humanos corresponde a uma Phe295, pode ser um alvo em potencial para inibidores seletivos covalentes e o alvo para desenvolvimento de novos biopesticidas mais seletivo e menos agressivos ao ser humano [52, 53]. Embora o potencial dos inibidores covalentes tenha sido investigado em vários estudos, os inibidores com um modo de ação diferente, tais como os inibidores não covalentes, são menos bem explorados [56].

4. CONCLUSÃO

Esta pesquisa possibilitou avaliar a composição química do OEAT e seu potencial de atuação como larvicida em testes *in vitro* e *in silico*. De acordo com as análises por CG-EM, CG-DIC e RMN mono e bidimensional, os triquienanos sesquiterpênicos Presilphiperfolan-1-ol, Silphiperfol-5-ene e Presilphiperfol-7-ene são os componentes majoritários do OE.

Nas análises realizadas *in vitro* com larvas de 3º e 4º ínstaes, há eliminação completa das larvas de *A. aegypti* após 48 horas do início do teste. As avaliações *in silico* mostram altas energias de ligação entre os componentes do óleo essencial e o sítio ativo da enzima AchE, superiores inclusive ao larvicida organofosforado temefós.

Os resultados encontrados indicam que o OEAT e seus constituintes isolados podem ser explorados como potenciais larvicidas seguros tanto para o ambiente quanto para os humanos. Mais investigações para o OEAT e os constituintes isolados são necessários para avaliar os efeitos em organismos não-alvo e para avaliar as concentrações efetivas na atividade larvicida. Tais resultados são importantes no objetivo de produzir novos larvicidas seguros, sustentáveis e biodegradáveis.

5. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste estudo são significativos e contribuem com informações a respeito de novas substâncias naturais com atividade larvicida. Com proposta de inclusão de estudos que possibilitem o cálculo da DL50 da ação larvicida, nos estudos *in vitro*, para além de testes *in vivo*, para caracterização das suas características farmacocinéticas.

Outras avaliações ainda podem ser realizadas: Verificação da sinergia entre óleos de diferentes espécies vegetais da região; isolamento dos componentes presentes no óleo, através de técnicas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), e avaliação de sua atividade *in vitro* e *in vivo* de forma individual; processos de síntese e modificação dos compostos com intuito de obter maior atividade/segurança são exemplos de objetivos que podem resultar em novas publicações do mesmo âmbito.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Alvarez, M. A. (2019). Puna: A Surrealistic Landscape in the Argentinean Highlands. In *Pharmacological Properties of Native Plants from Argentina* (pp. 137–166). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20198-2_6
- [2] Castilho, C. V. V., Neto, J. F. F., Leitão, S. G., Barreto, C. S., Pinto, S. C., & da Silva, N. C. B. (2018). *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* *in vitro* culture: sporophyte development and volatile compound profile of an aromatic fern. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 133(3), 311–323. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1383-z>
- [3] Heravi, M. M., & Vavsari, V. F. (2015). Recent applications of intramolecular Diels-Alder reaction in total synthesis of natural products. In *RSC Advances* (Vol. 5, Issue 63, pp. 50890–50912). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c5ra08306k>
- [4] Pinto, S. C., Leitão, G. G., de Oliveira, D. R., Bizzo, H. R., Ramos, D. F., Coelho, T. S., Silva, P. E. A., Lourenço, M. C. S., & Leitão, S. G. (2009). Chemical Composition and Antimycobacterial Activity of the Essential Oil from *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*. *Natural Product Communications*, 4(12), 1934578X0900401. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900401213>
- [5] Baptista-Silva, S., Borges, S., Ramos, O. L., Pintado, M., & Sarmento, B. (2020). The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review. In *Journal of Essential Oil Research* (Vol. 32, Issue 4, pp. 279–295). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1746698>
- [6] Chahomchuen, T., Insuan, O., & Insuan, W. (2020). Chemical profile of leaf essential oils from four Eucalyptus species from Thailand and their biological activities. *Microchemical Journal*, 158. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105248>
- [7] Zhang, L., Liang, X., Wang, B., Lin, Z., Ye, M., Ma, R., Zheng, M., Xiang, H., & Xu, P. (2020). Six herbs essential oils suppressing inflammatory responses via inhibiting COX-

2/TNF- α /IL-6/NF- κ B activation. *Microchemical Journal*, 156.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104769>

[8] Mendes, L. A., Martins, G. F., Valbon, W. R., da Silva de Souza, T., Menini, L., Ferreira, A., & da Silva Ferreira, M. F. (2017). Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *A. aegypti* L. *Industrial Crops and Products*, 108, 684–689.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.034>

[9] de Moraes, S. M., Facundo, V. A., Bertini, L. M., Cavalcanti, E. S. B., Anjos Júnior, J. F. dos, Ferreira, S. A., de Brito, E. S., & de Souza Neto, M. A. (2007). Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(10), 670–675. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.05.002>

[10] Ravi Kiran, S., Bhavani, K., Sita Devi, P., Rajeswara Rao, B. R., & Janardhan Reddy, K. (2006). Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of Chloroxylon swietenia DC against *A. aegypti* and Anopheles stephensi. *Bioresource Technology*, 97(18), 2481–2484. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.003>

[11] Magalhães, L. A. M. I., da Paz Lima, M., Marques, M. O. M., Facanali, R., da Silva Pinto, A. C., & Tadei, W. P. (2010). Chemical composition and larvicidal activity against *A. aegypti* larvae of essential oils from four Guarea species. *Molecules*, 15(8), 5734–5741.
<https://doi.org/10.3390/molecules15085734>

[12] Munusamy, R. G., Appadurai, D. R., Kuppusamy, S., Michael, G. P., & Savarimuthu, I. (2016). Ovicidal and larvicidal activities of some plant extracts against *A. aegypti* L. and Culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(6), 468–471. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(16\)61070-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(16)61070-8)

[13] Jankowska M, Justyna Rogalska, Joanna Wyszowska, Maria Stankiewicz. Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System—A Review. *Molecules* 2018, 23, 34; [doi:10.3390/molecules23010034](https://doi.org/10.3390/molecules23010034)

- [14] Balachandran C, Anbalagan S, Kandeepan C, Nagendran NA, Jayakumar M, Abd_Allah EF, Alqarawi AA, Hashem A, Baskar K. Molecular docking studies of natural alkaloids as acetylcholinesterase (AChE1) inhibitors in *A. aegypti*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2021.05.011>
- [15] Adams, R. (2005). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. *Carol Stream*, 16, 65–120.
- [16] Bienert S, Waterhouse A, DE Beer, TAP, Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L, Schwede T. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic Acids Research*, 2016, 45(D1), D313–D319. doi:10.1093/nar/gkw1132
- [17] Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2011, 27(3), 343–350. Doi: 10.1093/bioinformatics/btq662
- [18] Huey R, Morris GM, Olson AJ, Goodsell DS, A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comput. Chem.*, 28: 2007, p.1145-1152. doi:10.1002/jcc.20634
- [19] Juliani, H. R., Zygadlo, J. A., Scrivanti, R., de la Sota, E., & Simon, J. E. (2004). The essential oil of *Anemia tomentosa* (Savigny) Sw. var. *anthriscifolia* (Schrad.) Mickel. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(6), 541–543. <https://doi.org/10.1002/ffj.1341>
- [20] Santos, M. G., Fernandes, C. P., Tietbohl, L. A. C., Garrett, R., Lobo, J. F. R., Kelecom, A., & Rocha, L. (2014). Chemical composition of essential oils from two fern species of anemia. *American Fern Journal*, 103(4), 215–224. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-103.4.215>
- [21] Soni, U., Brar, S., & Gauttam, V. K. (2015). Effect of seasonal variation on secondary metabolites of medicinal plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(9), 3654. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(9\).3654-62](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(9).3654-62)

- [22] Coates, R. M., Ho, Z., Klobus, M., & Wilson, S. R. (1996). Stereochemistry and Reactions of Presilphiperfolanol: A Branch Point Marker in Triquinane Sesquiterpene Biogenesis. *Journal of the American Chemical Society*, 118(39), 9249–9254. <https://doi.org/10.1021/ja961582g>
- [23] Hong, A. Y., & Stoltz, B. M. (2012). Enantioselective total synthesis of the reported structures of (-)-9-epi-presilphiperfolan-1-ol and (-)-presilphiperfolan-1-ol: Structural confirmation and reassignment and biosynthetic insights. *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(38), 9674–9678. <https://doi.org/10.1002/anie.201205276>
- [24] Hong, A. Y., & Stoltz, B. M. (2014). Biosynthesis and Chemical Synthesis of Presilphiperfolanol Natural Products. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(21), 5248–5260. <https://doi.org/10.1002/anie.201309494>
- [25] Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; Bryce, D. L.; Spectrometric identification of organic compounds, seventh ed., John Wiley & Sons, New York, 2014.
- [26] Bohlmann, F., & Jakupovic, J. (1980). Neue Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe mit anomalen Kohlenstoffgerüst aus Silphium-arten. *Phytochemistry*, 19(2), 259–265. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81970-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81970-6)
- [27] Kashman, Y., Rudi, A., & Gutman-Naveh, N. (1978). 7-hydroxy (and acetoxy)- α -mullolene from the soft-coral heteroxenia fuscescens. *Tetrahedron*, 34(8), 1227–1229. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(78\)80151-3](https://doi.org/10.1016/0040-4020(78)80151-3)
- [28] Bohlmann, F., Zdero, C., Jakupovic, J., Robinson, H., & King, R. M. (1981). Eriolanolides, eudesmanolides and a rearranged sesquiterpene from Eriophyllum species. *Phytochemistry*, 20(9), 2239–2244. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)80121-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)80121-5)
- [29] Weyerstahl, P., Marschall, H., Seelmann, I., & Jakupovic, J. (1998). Cameroonane, Prenopsane and Nopsane, Three New Tricyclic Sesquiterpene Skeletons. *European Journal of Organic Chemistry*, 1998(6), 1205–1212. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0690\(199806\)1998:6<1205::AID-EJOC1205>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0690(199806)1998:6<1205::AID-EJOC1205>3.0.CO;2-K)

- [30] Dias, C. N., & Moraes, D. F. C. (2014). Essential oils and their compounds as *A. aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. In *Parasitology Research* (Vol. 113, Issue 2, pp. 565–592). <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3687-6>
- [31] Simas, N. K., Lima, E. da C., Conceição, S. da R., Kuster, R. M., Oliveira Filho, A. M. de, & Lage, C. L. S. (2004). Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvica de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenoides e fenilpropanóides. *Química Nova*, 27(1). <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000100009>
- [32] Albuquerque, B. N. de L., da Silva, M. F. R., da Silva, P. C. B., de Lira Pimentel, C. S., Lino Da Rocha, S. K., Farias De Aguiar, J. C. R. de O., Neto, A. C. A., Paiva, P. M. G., Gomes, M. G. M., da Silva-Júnior, E. F., & Amaral Ferraz Navarro, D. M. do. (2022). Oviposition deterrence, larvicidal activity and docking of β -germacrene-D-4-ol obtained from leaves of *Piper corcovadensis* (Piperaceae) against *A. aegypti*. *Industrial Crops and Products*, 182, 114830. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114830>
- [33] Andrade-Ochoa, S., Correa-Basurto, J., Rodríguez-Valdez, L. M., Sánchez-Torres, L. E., Noguera-Torres, B., & Nevárez-Moorillón, G. v. (2018). *In vitro* and *in silico* studies of terpenes, terpenoids and related compounds with larvicidal and pupaecidal activity against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Chemistry Central Journal*, 12(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0425-2>
- [34] Marcombe, S., Chonephetsarath, S., Thammavong, P., & Brey, P. T. (2018). Alternative insecticides for larval control of the dengue vector *A. aegypti* in Lao PDR: insecticide resistance and semi-field trial study. *Parasites & Vectors*, 11(1), 616. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3187-8>
- [35] Fernandez, C. M. M., Barba, E. L., Fernandez, A. C. M., Cardoso, B. K., Borges, I. B., Takemura, O. S., Martins, L. de A., Cortez, L. E. R., Cortez, D. A. G., & Gazim, Z. C. (2014). Larvicidal Activity of Essential Oil from *Tetradenia riparia* to Control of *A. aegypti* Larvae in Function of Season Variation. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 17(5), 813–823. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.892841>

- [36] Pavela, R., Maggi, F., Mbuntcha, H., Woguem, V., Fogang, H. P. D., Womeni, H. M., Tapondjou, L. A., Barboni, L., Nicoletti, M., Canale, A., & Benelli, G. (2016). Traditional herbal remedies and dietary spices from Cameroon as novel sources of larvicides against filariasis mosquitoes? *Parasitology Research*, 115(12), 4617–4626. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5254-4>
- [37] Fraga, B. M. (2011). Natural sesquiterpenoids. In *Natural Product Reports* (Vol. 28, Issue 9, pp. 1580–1610). <https://doi.org/10.1039/c1np00046b>
- [38] Reegan, A. D., Stalin, A., Paulraj, M. G., Balakrishna, K., Ignacimuthu, S., & Al-Dhabi, N. A. (2016). *In silico* molecular docking of niloticin with acetylcholinesterase 1 (AChE1) of *A. aegypti* L. (Diptera: Culicidae): a promising molecular target. *Medicinal Chemistry Research*, 25(7), 1411–1419. <https://doi.org/10.1007/s00044-016-1579-x>
- [39] Engdahl, C., Knutsson, S., Fredriksson, S.-Å., Linusson, A., Bucht, G., & Ekström, F. (2015). Acetylcholinesterases from the Disease Vectors *A. aegypti* and *Anopheles gambiae*: Functional Characterization and Comparisons with Vertebrate Orthologues. *PLOS ONE*, 10(10), e0138598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138598>
- [40] Cheung, J., Mahmood, A., Kalathur, R., Liu, L., & Carlier, P. R. (2018). Structure of the G119S Mutant Acetylcholinesterase of the Malaria Vector *Anopheles gambiae* Reveals Basis of Insecticide Resistance. *Structure*, 26(1), 130-136.e2. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.11.021>
- [41] Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315–335. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>
- [42] Huy Hung, N., Ngoc Dai, D., Satyal, P., Thi Huong, L., Thi Chinh, B., Quang Hung, D., Anh Tai, T., & Setzer, W. N. (2021). *Lantana camara* Essential Oils from Vietnam: Chemical Composition, Molluscicidal, and Mosquito Larvicidal Activity. *Chemistry & Biodiversity*, 18(5). <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100145>

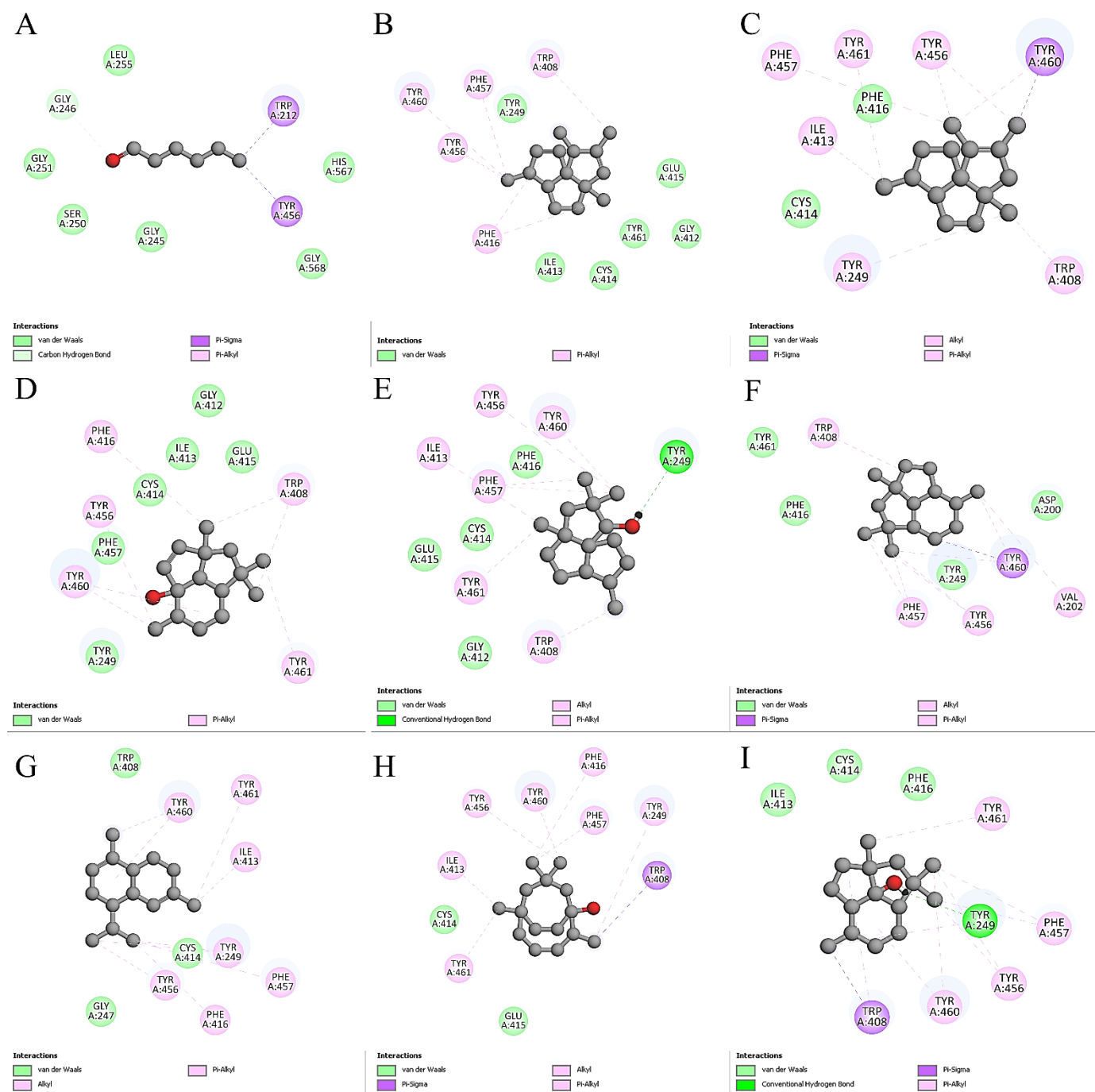
- [43] Vargas, L. D. L., Ferreira, S. M. B., Souza, M. D., Silva, C. A. L. da, & Shimoya-bittencourt, W. (2022). Resistência das populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Insecta, Diptera, Culicidae) aos inseticidas utilizados para o controle. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 21(1), 98–116. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v21i1.44458>
- [44] Casida, J. E., & Quistad, G. B. (1998). Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future? *Annual Review of Entomology*, 43(1), 1–16. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.1>
- [45] Zara, A. L. D. S. A., Santos, S. M. D., Fernandes-Oliveira, E. S., Carvalho, R. G., & Coelho, G. E. (2016). Estratégias de controle do *A. aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25, 391-404. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000200017>
- [46] Raghavendra, K., Barik, T. K., Reddy, B. P. N., Sharma, P., & Dash, A. P. (2011). Malaria vector control: from past to future. *Parasitology Research*, 108(4), 757–779. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2232-0>
- [47] Shafferman, A., Kronman, C., Flashner, Y., Leitner, M., Grosfeld, H., Ordentlich, A., Gozes, Y., Cohen, S., Ariel, N., & Barak, D. (1992). Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(25), 17640–17648.
- [48] Jukic, M., Politeo, O., Maksimovic, M., Milos, M., & Milos, M. (2007). *In vitro* acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytotherapy Research*, 21(3), 259–261. <https://doi.org/10.1002/ptr.2063>
- [49] López, M. D., Campoy, F. J., Pascual-Villalobos, M. J., Muñoz-Delgado, E., & Vidal, C. J. (2015). Acetylcholinesterase activity of electric eel is increased or decreased by selected monoterpenoids and phenylpropanoids in a concentration-dependent manner. *Chemico-Biological Interactions*, 229, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.006>

- [50] Dambolena, J. S., Zunino, M. P., Herrera, J. M., Pizzolitto, R. P., Areco, V. A., & Zygadlo, J. A. (2016). Terpenes: Natural Products for Controlling Insects of Importance to Human Health—A Structure-Activity Relationship Study. *Psyche: A Journal of Entomology*, 2016, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2016/4595823>
- [51] Anderson, J. A., & Coats, J. R. (2012). Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102(2), 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.12.002>
- [52] Pang, Y.-P. (2007). Species marker for developing novel and safe pesticides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(1), 197–199. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.09.073>
- [53] Pezzementi, L., Rowland, M., Wolfe, M., & Tsigelny, I. (2006). Inactivation of an invertebrate acetylcholinesterase by sulfhydryl reagents: the roles of two cysteines in the catalytic gorge of the enzyme. *Invertebrate Neuroscience*, 6(2), 47–55. <https://doi.org/10.1007/s10158-006-0017-z>
- [54] Hartsel, J. A., Wong, D. M., Mutunga, J. M., Ma, M., Anderson, T. D., Wysinski, A., Islam, R., Wong, E. A., Paulson, S. L., Li, J., Lam, P. C. H., Totrov, M. M., Bloomquist, J. R., & Carlier, P. R. (2012). Re-engineering aryl methylcarbamates to confer high selectivity for inhibition of *Anopheles gambiae* versus human acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(14), 4593–4598. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.05.103>
- [55] Dou, D., Park, J. G., Rana, S., Madden, B. J., Jiang, H., & Pang, Y.-P. (2013). Novel Selective and Irreversible Mosquito Acetylcholinesterase Inhibitors for Controlling Malaria and Other Mosquito-Borne Diseases. *Scientific Reports*, 3(1), 1068. <https://doi.org/10.1038/srep01068>
- [56] Alout, H., Labbé, P., Berthomieu, A., Djogbénou, L., Leonetti, J.-P., Fort, P., & Weill, M. (2012). Novel AChE Inhibitors for Sustainable Insecticide Resistance Management. *PLoS ONE*, 7(10), e47125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047125>

- [57] Muangphrom, P., Misaki, M., Suzuki, M., Shimomura, M., Suzuki, H., Seki, H., & Muranaka, T. (2019). Identification and characterization of (+)- α -bisabolol and 7-epi-silphiperfol-5-ene synthases from *Artemisia abrotanum*. *Phytochemistry*, 164, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.05.010>
- [58] Verdín-Betancourt, F. A., Figueroa, M., Soto-Ramos, A. G., de Lourdes López-González, Ma., Castañeda-Hernández, G., Bernal-Hernández, Y. Y., Rojas-García, A. E., & Sierra-Santoyo, A. (2021). Toxicokinetics of temephos after oral administration to adult male rats. *Archives of Toxicology*, 95(3), 935–947. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-02975-8>
- [59] Zárýbnický, T., Boušová, I., Ambrož, M., & Skálová, L. (2018). Hepatotoxicity of monoterpenes and sesquiterpenes. *Archives of Toxicology*, 92(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2062-2>
- [60] 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. *Planta*, 250(1), 59–68. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03147-w>
- [61] Luz, T. R. S. A., de Mesquita, L. S. S., Amaral, F. M. M. do, & Coutinho, D. F. (2020). Essential oils and their chemical constituents against *A. aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae. *Acta Tropica*, 212, 105705. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105705>

APÊNDICES

APÊNDICE A - Mapa 2D das interações dos aminoácidos do bolso de ligação do canal da AChE do mosquito *Aedes aegypti*.



PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO

Durante o período de Mestrado acadêmico participei como co-autor de algumas colaborações em outros trabalhos sob orientação dos professores Djalma Menezes de Oliveira e Rosane Moura Aguiar que geraram publicações em artigos científicos na Química e em capítulos de livros, conforme apresentado nas próximas páginas. Além disso, os resultados obtidos neste estudo foram submetidos para publicação na revista *Microchemical Journal*. Todas as sugestões da banca serão adicionadas ao corpo do trabalho, durante o processo de resposta aos revisores da revista, além de que, sem dúvida, serão agregadas aos próximos manuscritos.

Microchemical Journal

Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Anemia tomentosa* (SAV.) Sw: an in vitro and in silico study

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Chromatography and separation techniques
Keywords:	Anemiaceae; <i>Anemia tomentosa</i> ; <i>Aedes aegypti</i> ; Molecular docking; Acetylcholinesterase Inhibitors; Sesquiterpens
Corresponding Author:	Rosane Moura Aguiar, Ph.D Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Campus de Jequié Jequie, BA BRAZIL
First Author:	Rosane Moura Aguiar, Ph.D
Order of Authors:	Rosane Moura Aguiar, Ph.D Vilisaímon da Silva de Jesus Juliana Lago Leite Jailan Souza Santos Fabricio Santos Barbosa Djalma Menezes de Oliveira Rubens Santos Barreto Wagner Rodrigues de Assis Soares Simone Andrade Gualberto Débora Cardoso da Silva Isabelly Domiciano Santos Guimarães Luiza Fonseca Silva
Abstract:	<i>Anemia tomentosa</i> (SAV.) Sw. is an important specie from Anemiaceae family with the occurrence mostly of Brazilian states. This plant is used in traditional medicine for treatment of different diseases, but the chemistry studies with the species from the genus are scarce yet. This work was to carry out a chemical study on the essential oil of <i>A. tomentosa</i> (EOAT) aiming to know its chemical composition and larvicidal potential on <i>Aedes aegypti</i>, through in vitro and in silico methods. The specimen was collected in the municipality of Jequié, Bahia, Brazil and the essential oil (EO) was obtained by hydrodistillation using a Clevenger apparatus. Chromatographic and spectrometric techniques were used (CG-MS, CG-FID and mono and bidimensional NMR), being characterized from the 10 components of EO. The chemical composition of EOAT consisted of 87.51% of sesquiterpenes, highlighting Presilphiperfolan-1-ol (42.13%) and Silphiperfol-5-ene (19.47%). In vitro larvicidal assay with the EOAT demonstrated citotoxicity potential activity up to 48h with 100% of larval deaths of <i>A. aegypti</i>. The in silico study with the chemical compounds from this species showed potential for inhibition of Acetylcholinesterase (AChE) of <i>A. aegypti</i>, with the sesquiterpenes triquinanes activity between -6,8 and -8,2 kcal/mol standing out when compared to Temephos (-7,5 kcal/mol). Hexanal presents similar affinity energy to the acetylcholine (-4,3 kcal/mol and -4,0 kcal/mol respectively). The chemical compounds identified in the EOAT have pharmacokinetic potential for the development of larvicidal pharmaceutical formulations, in addition to low human and environmental toxicity, as observed in the ADMETox predictions. The EOAT showed potential for the development of phytochemicals and semisynthetic analogues with larvicidal action against the <i>A. aegypti</i>.

CAPÍTULO 15

ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DA *SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* (ANACARDEACEAE)

Data de aceite: 01/07/2021

Data de submissão: 19/04/2021

Djalma Menezes de Oliveira

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia,
Departamento de Ciências e Tecnologia - DCT
Campus Jequié-Bahia
<http://lattes.cnpq.br/4074274322996454>

Juliana Lago Leite

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia,
Departamento de Ciências e Tecnologia - DCT
Campus Jequié-Bahia
<http://lattes.cnpq.br/8057951144499042>

Rosane Moura Aguiar

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia,
Departamento de Ciências e Tecnologia - DCT
Campus Jequié-Bahia
<http://lattes.cnpq.br/9786102954711387>

Vilisaimon da Silva de Jesus

Programa de Pós-graduação em Química da
UESB – PGQUI/UESB
Campus Jequié-Bahia
<http://lattes.cnpq.br/3876468517506662>

RESUMO: *Schinus terebinthifolius* pertence à família Anacardiaceae, uma planta endêmica da América do Sul. Muito utilizada como espécie ornamental de ruas e praças, cresce espontaneamente em terrenos baldios, beiras de rios e em áreas litorâneas, é conhecida popularmente como «aroeira-vermelha», “aroeira da praia”, “pimenta rosa” e “pimenta vermelha

do Brasil”. Seus frutos são muito procurados como temperos em alimentos e bebidas; frutos maduros doces e aromáticos produzem óleo essencial de composição química variada, predominantemente rico em compostos monoterpênicos e poucos sesquiterpenos. Os óleos essenciais de *S. terebinthifolius* obtidos neste estudo mostraram constituições que combinam α -pineno (2,8-22,0%), β -pineno (0,3-31,4%), β -ocimeno (0,0-35,0 %), β -mirceno (0,70-13,3%), δ -careno (3,0-83,4%), óxido de β -cariofileno (2,6-6,8%) e limoneno (3,2-5,9%) como os principais constituintes. A partir de acessos de frutos de *S. terebinthifolius* em três períodos de frutificação anual, foram obtidas amostras de óleos essenciais distintos, as quais foram identificadas e semiquantificadas por GC-MS. O óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* obtido no mês de novembro, rico em α -pineno (22,0%), β -pineno (31,4%), óxido de cariofileno (6,8%) e limoneno (4,5%), apresentou expressiva atividade antifúngica contra linhagens dos fungos *Cryptococcus gatti* e *C. neoformans*, bem como revelou moderadas atividades contra cinco espécies de *Candida spp.* Este trabalho descreve a obtenção do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius*, seu estudo químico por cromatografia gasosa e a avaliação de suas ações antifúngicas contra várias espécies de fungos patógenos.

PALAVRAS - CHAVE: *Schinus terebinthifolius*, óleo essencial, monoterpênicos, ação antifúngica.

CAPÍTULO 16

AVALIAÇÃO SAZONAL DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E INIBIÇÃO DE ACETILCOLINESTERASE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ALOYSIA GRATISSIMA*

Data de aceite: 01/11/2020

Data de submissão: 03/09/2020

Adílio Macedo Santos

Programa de Pós-graduação em Química –
PGQUI, Universidade Estadual do Sudoeste da
Bahia - Campus Jequié.
<http://lattes.cnpq.br/3042342259649782>

Adonias de Oliveira Teixeira

Programa de Pós-graduação em Química –
PGQUI, Universidade Estadual do Sudoeste da
Bahia - Campus Jequié.
<http://lattes.cnpq.br/3042342259649782>

Vilisaimon da Silva de Jesus

Programa de Pós-graduação em Química –
PGQUI, Universidade Estadual do Sudoeste da
Bahia - Campus Jequié.
<http://lattes.cnpq.br/3876468517506662>

Luan Souza Santos

Bacharelado em Farmácia, Universidade
Estadual do Sudoeste da Bahia - Campus
Jequié.
<http://lattes.cnpq.br/8871668985489454>

Moacy Selis Santos

Bacharel em Farmácia, Colégio Estadual de
Jequié – Cursos Técnicos em Saúde Bucal,
Enfermagem e Análises Clínicas.
<http://lattes.cnpq.br/9401657639471923>

Clayton Queiroz Alves

Programa de Pós-graduação em Recursos
Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de
Feira de Santana.
<https://orcid.org/0000-0002-3242-3230>

Djalma Menezes de Oliveira

Programa de Pós-graduação em Química –
PGQUI, Universidade Estadual do Sudoeste da
Bahia - Campus Jequié.
<https://orcid.org/0000-0002-7765-9853>

Rosane Moura Aguiar

Programa de Pós-graduação em Química –
PGQUI, Universidade Estadual do Sudoeste da
Bahia - Campus Jequié.
<https://orcid.org/0000-0002-9803-8183>

RESUMO: *Aloysia gratissima* (Verbenaceae) conhecida na medicina popular como “Mimo do Brasil”, é amplamente empregada e pesquisada por atividades antivirais, antioxidante, antisséptica, em tratamentos de doenças respiratórias e digestivas, entre outras. Estudos apontam alto rendimento de óleo essencial, com grande diversidade de compostos e a existência de quimiotipos diferentes em suas espécies devido influências externas, tais como geográficas e climáticas. O presente trabalho visa determinar a composição do óleo essencial das partes aéreas de *A. gratissima*, observando a influência da sazonalidade em seu rendimento e composição, além de avaliar seu potencial em inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Os espécimes foram coletados no Poço Dantas, região do município de Jequié, na Bahia, num período entre outubro de 2015 e agosto de 2017 e tiveram identificação pelo HUESB. A extração dos óleos essenciais se deu por destilação de arraste à vapor com auxílio de aparelho tipo Clevenger. Os compostos foram identificados por meio de Cromatografia Gasosa acoplada a