



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS (PGMCF)

JOÃO PAULO CARVALHO DE LIMA

**Efeitos de chalconas no desenvolvimento e sistema imunológico em *Aedes aegypti* L.
(Diptera: Culicidae)**

JOÃO PESSOA
2024

JOÃO PAULO CARVALHO DE LIMA

**Efeitos de chalconas no desenvolvimento e sistema imunológico em *Aedes aegypti* L.
(Diptera: Culicidae)**

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PGMCF) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fabíola da Cruz Nunes
Coorientação: Prof.^a Dr.^a Maria Denise Leite Ferreira

JOÃO PESSOA
2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732e Lima, João Paulo Carvalho de.

Efeitos de chalconas no desenvolvimento e sistema imunológico em *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) / João Paulo Carvalho de Lima. - João Pessoa, 2024.
118 f. : il.

Orientação: Fabíola da Cruz Nunes, Coorientação: Maria Denise Leite Ferreira.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CB.

1. Chalconas. 2. Inseticida sintético. 3. Composto naturais. 4. *Aedes aegypti* L. I. Nunes, Fabíola da Cruz. II. Ferreira, Maria Denise Leite. III. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



Ata da Sessão de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Associada Universidade Federal da Paraíba, realizada em 23 de agosto de 2024.

Na data de vinte e três de agosto do ano de dois mil e vinte e quatro às 10h00 (horário local), foi realizada, por meio da Plataforma Virtual Google Meet, a defesa pública da Dissertação de Mestrado do(a) discente **João Paulo Carvalho de Lima**. O trabalho tem como título “Estudo dos efeitos de chalconas no desenvolvimento e no sistema imune de mosquitos *Aedes Aegypti* (Diptera culicidae)”. A banca examinadora foi constituída pelo(a) orientador(a) Prof.^ª Dr.^ª Fabíola da Cruz Nunes, na qualidade de presidente da banca, pelo 1º examinador (examinador externo) Prof.^ª Dr.^ª Flavia Borges Mury (UFRJ) e pelo 2º examinador (examinador interno) Prof. Dr. Luiz Henrique Agra Cavalcanti Silva (UFPB). Após a apresentação pública do trabalho, iniciou-se a arguição do(a) candidato(a) por cada membro da banca examinadora, tendo o(a) candidato(a) o mesmo tempo para responder a cada questionamento. Na sequência, a banca examinadora se reuniu em caráter sigiloso e considerou o(a) candidato(a) APROVADO(A). De acordo com o Artigo 98 §1 §2 da Resolução 35/2019 do CONSEPE, o(a) discente terá até 60 (sessenta) dias, a partir da presente data, para fazer as correções solicitadas pela banca examinadora e entregar as cópias corrigidas da dissertação à Biblioteca Central da UFPB e à secretaria deste programa, contendo obrigatoriamente a ficha catalográfica fornecida pela Biblioteca Central da UFPB.

Documento assinado digitalmente



FABIOLA DA CRUZ NUNES
Data: 02/09/2024 12:55:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^ª Dr.^ª Fabíola da Cruz Nunes

Documento assinado digitalmente



FLAVIA BORGES MURY
Data: 02/09/2024 15:37:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^ª Dr.^ª Flavia Borges Mury

Documento assinado digitalmente



LUIZ HENRIQUE AGRA CAVALCANTE SILVA
Data: 02/09/2024 14:12:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Luis Henrique Agra Cavalcanti Silva

Centro de Biotecnologia– Universidade Federal da Paraíba- Campus Universitário

CEP: 58051-900 – João Pessoa/PB

Fone: (83) 3216 7173

"And in the end, the love you take is equal to the love you make."
— The Beatles, *Abbey Road* (1969), "The End"

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as virtudes e bênçãos, sem sua presença, o caminho teria sido ainda mais difícil. A vontade de ser uma pessoa melhor é o que me impulsiona a enfrentar os desafios com fé e determinação, sabendo que cada passo dado com humildade e gratidão me aproxima da realização dos meus sonhos. Foram dias, semanas, meses e muitas horas dedicadas a um objetivo.

Agradeço a minha família, Dona Neves, Tia Ninfa, Tia Iara por toda assistência, e em especial aos meus pais, Ilca Andrade de Lima e Paulo Roberto Carvalho de Lima, por sempre acreditarem em mim e por me apoiarem na dedicação aos estudos. Agradeço por nunca terem deixado de se dedicar para que seus filhos tivessem um futuro melhor. Seguir na carreira acadêmica, especialmente mestrado e doutorado, era um sonho de Dona Ilca, que não se concretizou devido à dedicação aos filhos. Hoje, posso dedicar esta conquista a quem cuidou de mim. Agradeço ao meu irmão Paulo por todo o apoio durante esta jornada de vida e estudos, com certeza, sem você ao meu lado, eu não estaria aqui.

Gostaria de agradecer a minha companheira de vida e namorada Shayenne, por estar comigo em todos os momentos dessa trajetória, pela calma nos momentos mais difíceis, por cuidar de mim, por sempre me incentivar a conquistar os meus objetivos, e por me motivar frente as minhas próprias capacidades. Sem você para amar, conversar, acalmar, ‘acarinhar’, nada disso faria sentido. Obrigado por existir em minha vida, você me ensinou a amar e a aprender a ser amado, agradeço por se dedicar, e por fazer parte deste momento tão especial.

Agradeço à Professora Fabíola pelo acolhimento e pela oportunidade, por acreditar em mim e por sempre estar à disposição nos momentos de alegrias e adversidades. Você me acolheu e ensinou não apenas sobre a trajetória acadêmica, mas também sobre a vida. Sou imensamente grato pela oportunidade que me foi concedida. Agradeço também à minha coorientadora, Professora Denise, por ter me apoiado desde a graduação até o presente momento, sem sua contribuição, esta pesquisa não teria sido possível.

Agradeço aos amigos do mestrado, Emille, Geovane, Thalita, Fellipe, Emmily, e aos professores do PPGMCF-UEPB e nucleadoras pela caminhada, todos tiveram influência significativa neste estudo e, principalmente, na minha vida. Gostaria de agradecer a Fernando e Natália do IPEFARM pela contribuição valiosa nesta pesquisa, aos amigos do LAPAVET por se dedicarem ao laboratório e por terem me auxiliado ao longo desses dois anos de mestrado, sem vocês, nada disso seria possível.

Por fim, gostaria de dedicar este trabalho de dissertação a todas as pessoas que perderam

suas vidas em decorrência da dengue, zika, chikungunya ou febre amarela, sobretudo, àquelas que sofrem em decorrência dessas arboviroses. Que suas histórias inspirem esforços contínuos para a prevenção, tratamento e cura dessas enfermidades, e que o comprometimento com a saúde pública e a pesquisa possa transformar a luta contra essas doenças em um futuro mais saudável e promissor para todos.

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* L. é um vetor responsável por transmitir diversas arboviroses, como a dengue, zika, e chikungunya. Em um contexto global, vivencia um processo de expansão populacional, em parte devido à ineficiência dos métodos de controle utilizados. Nesse sentido, a busca de novas moléculas com atividade inseticida é de grande importância. As chalconas são compostos naturais pertencente ao grupo dos flavanoides e tornaram-se um alvo importante para a pesquisa científica atual devido a sua vasta aplicabilidade biológica. Sendo assim, os objetivos deste estudo são avaliar os efeitos de quatro tipos diferentes de chalconas (CH) na atividade *in silico*, sob o desenvolvimento e sistema imunológico em *Ae. aegypti*, e sua toxicidade em *A. salina*. Como metodologia, as CHH foram sintetizadas pelo Laboratório de Síntese Orgânica (LabSíntese)-UFPB, sendo descritas como: Chalcona Heterocíclica (CHH), Chalcona Flúor (CHF), Bromo Chalcona (BCH), e Chalcona Nitrogênio (CHN). As análises computacionais foram elaboradas através dos softwares, Molpredict X, Spartan14, ChemAxon e Molegro Virtual Docker v.6.0.1. Para análise sob as fases de desenvolvimento em *Ae. aegypti* e toxicidade em *A. salina* foram utilizadas diferentes concentrações das CHH (2,5–1000 ppm), e a mortalidade (Mt) avaliada no período de 24 e 48 horas. Utilizou-se da microscopia eletrônica de varredura (MEV) para análise morfológica dos ovos frente exposição às CHH. Para a análise imunológica das larvas (L3), foi avaliada a concentração do íon nitrito (NO^{2-}) e perfil de hemócitos totais no *pool* de hemolinfa. Nos grupos controle os insetos foram expostos a água desclorada, Tween 80 e 20 a 2%. Os experimentos foram feitos em triplicata. Como resultados, as CHH demonstraram estabilidade conformacional e menor energia as proteínas alvos do estudo (CHN: $-126.547 \text{ kcal/mol}^{-1}$), (CHH: $-128.536 \text{ kcal/mol}^{-1}$) respectivamente, quando comparada aos ligantes co-cristalizados. Na atividade larvicida, houve maior Mt no período de 48 horas, reduzindo a CL_{50} : 10,04 ppm (24h) e 6,84 ppm (48h) para CHH; CHF: 42,01 ppm (24h) e 8,46 ppm (48h); BCH: 195,6 ppm (24h) e 161,8 ppm (48h); CHN: 595,6 ppm (24h) e 553,4 ppm (48h). Nos bioensaios pupicida e adulticida, BCH e CHN induziram uma maior Mt no período de 24 horas de exposição, com CL_{50} de 562,1 e 893,7 ppm respectivamente. No ensaio de eclodibilidade, houve diminuição da eclosão em 97,4%. Na análise por MEV, as CHH ocasionaram danos visíveis ao exocório dos ovos. CHH promoveram um aumento quantitativo dos hemócitos, CH: $9,6 \pm 1,3\%$ (24h) e $10,7 \pm 8,8\%$ (48h); CHF: $10,91 \pm 1,3\%$ (24h) e $13,7 \pm 7,8\%$ (48h); CHN: $10,7 \pm 1,5\%$ (24h) e $11,1 \pm 7,8\%$ (48h). Por outro lado, a BCH promoveu uma diminuição, $22,3 \pm 1,3\%$ (24h) e $16,4 \pm 1,8\%$ (48h), porém sem significância estatística. Observou-se um aumento do NO^{2-} em todas as CHH (24h: $18,9 \pm 0,6\%$ e 48h: $20,9 \pm 0,6\%$). Nos bioensaios de toxicidade, houve Mt frente a todas as concentrações testadas, sendo a BCH ($4,85 \mu\text{M}$ [média] Mt) e CHN ($4,66 \mu\text{M}$ Mt) as que demonstraram baixa toxicidade em *Artemia*. Por fim, os resultados destacam as CHH como moléculas com atividade inseticida e imunomoduladora, promissoras para o desenvolvimento de novos produtos com potencial impacto na saúde pública. Entretanto, os bioensaios de toxicidade retratam sua atividade para organismos não alvo, o que deve ser melhor avaliado em estudos futuros.

Palavras-chave: Culicídeos; inseticida sintético; *Artemia salina*.

ABSTRACT

The mosquito *Aedes aegypti* L. is a vector responsible for transmitting several arboviruses, such as dengue, zika, and chikungunya. In a global context, there is a process of population expansion, partly due to the inefficiency of the control methods used. In this sense, the search for new molecules with insecticidal activity is of great importance. Chalcones are natural compounds belonging to the group of flavanoids and have become an important target for current scientific research due to their wide biological applicability. Therefore, the objectives of this study are to evaluate the effects of four different types of chalcones (CH) on the *in silico* activity, development, and immune system in *Ae. aegypti* and their toxicity in *A. salina*. As a methodology, the CHH were synthesized by the Organic Synthesis Laboratory (LabSíntese)-UFPB, being described as: Heterocyclic Chalcone (CHH), Chalcone Fluoride (CHF), Bromo Chalcone (BCH), and Chalcone Nitrogen (CHN). The computational analyses were performed using the software Molpredict X, Spartan14, ChemAxon, and Molegro Virtual Docker v.6.0.1. For analysis under the development phases in *Ae. aegypti* and toxicity in *A. salina*, different concentrations of CHH (2.5–1000 ppm) were used, and mortality (Mt) was evaluated in the period of 24 and 48 hours. Scanning electron microscopy (SEM) was used for morphological analysis of the eggs against exposure to CHH. For the immunological analysis of larvae (L3), the nitrite ion (NO²⁻) concentration and total hemocyte profile in the hemolymph pool were evaluated. In the control groups, the insects were exposed to dechlorinated water, Tween 80 and 20 at 2%. The experiments were performed in triplicate. As results, the CHH demonstrated conformational stability and lower energy than the target proteins of the study (CHN: -126,547 kcal/mol⁻¹), and (CHH: -128,536 kcal/mol⁻¹) respectively, when compared to the co-crystallized ligands. In the larvicidal activity, there was a higher Mt in the 48-hour period, decreasing the LC₅₀: 10.04 ppm (24h) and 6.84 ppm (48h) for CHH; CHF: 42.01 ppm (24h) and 8.46 ppm (48h); BCH: 195.6 ppm (24h) and 161.8 ppm (48h); CHN: 595.6 ppm (24h) and 553.4 ppm (48h). In the pupicidal and adulticidal bioassays, BCH and CHN induced a higher Mt in the 24-h exposure period, with LC₅₀ of 562.1 and 893.7 ppm, respectively. In the hatchability assay, there was a 97.4% decrease in hatching. In the SEM analysis, CHH caused visible damage to the exochorion of the eggs. CHH promoted a quantitative increase in hemocytes, CH: 9.6 ± 1.3% (24h) and 10.7 ± 8.8% (48h); ICC: 10.91 ± 1.3% (24h) and 13.7 ± 7.8% (48h); CHN: 10.7±1.5% (24h) and 11.1±7.8% (48h). On the other hand, BCH promoted a decrease of 22.3±1.3% (24h) and 16.4±1.8% (48h), but without statistical significance. An increase in NO²⁻ was observed in all CHH (24h: 18.9±0.6% and 48h: 20.9±0.6%). In the toxicity bioassays, Mt occurred against all concentrations tested, with BCH (4.85_M [mean] Mt) and CHN (4.66_M Mt) demonstrating low toxicity in *Artemia*. Finally, the results stand out as CHH molecules with insecticidal and immunomodulatory activity, promising for the development of new products with potential impact on public health. However, toxicity bioassays portray their activity towards non-target organisms, which should be better evaluated in future studies.

Keywords: Culicidae; synthetic insecticide; *Artemia salina*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mosquito <i>Aedes aegypti</i> adulto.....	19
Figura 2: Epidemiologia de pessoas infectadas com o vírus da dengue (2004-2024).....	20
Figura 3: Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	21
Figura 4: Distribuição do coeficiente de incidência de dengue no Brasil.....	23
Figura 5: Taxa de letalidade entre os casos graves de dengue por faixa etária.....	24
Figura 6: Distribuição do coeficiente de incidência de chikungunya no Brasil.....	24
Figura 7: Taxa de letalidade entre os casos graves de chikungunya por faixa etária.....	25
Figura 8: Distribuição do coeficiente de incidência de zika no Brasil.....	26
Figura 9: Estrutura morfológico do ovo de <i>Ae. aegypti</i>	27
Figura 10: A: Ovos de <i>Ae. aegypti</i> recém-depositados; B: Ovos de <i>Ae. aegypti</i> maturados.....	28
Figura 11: Fases de desenvolvimento larval de <i>Ae. aegypti</i> ; A: larva em estágio L1; B: larva em estágio L2; C: larva em estágio L3; D: larva em estágio L4.....	29
Figura 12: Caracterização morfológica da larva de <i>Ae. aegypti</i>	30
Figura 13: Pupa de <i>Ae. aegypti</i>	31
Figura 14: Diferenças entre fêmea e macho de <i>Ae. aegypti</i>	32
Figura 15: Fêmea de <i>Ae. aegypti</i> durante o repasto sanguíneo.....	33
Figura 16: A via de sinalização da imunidade inata em insetos.....	35
Figura 17: Controle mecânico.....	37
Figura 18: Controle biológico.....	38
Figura 19: Controle químico.....	39
Figura 20: Chalcona.....	40
Figura 21: <i>Artemia Salina</i>	41
Figura 22: Chalcona Heterocíclica (Fer 39).....	44
Figura 23: Chalcona Flúor (Fer 45).....	44
Figura 24: Bromo Chalcona (Fer 13).....	44
Figura 25: Chalcona Nitrogênio (Fer 42).....	45
Figura 26: Interações 2D e 3D entre o composto teste chalcona heterocíclica, o ligante co-cristalizado ácido palmítico e a proteína transportadora de esteróis-2.....	56
Figura 27: Interações 2D e 3D entre o composto teste chalcona heterocíclica, o ligante co-cristalizado 4'-deoxi-4'-aminopiridoxal-5'-fosfato, e a proteína quinurenina aminotransferase.....	57
Figura 28: Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura do grupo controle negativo dos	

ovos de <i>Ae. aegypti</i>	77
Figura 29: Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos ovos de <i>Ae. aegypti</i> após exposição a chalcona heterocíclica.	78
Figura 30: Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos ovos de <i>Ae. aegypti</i> após exposição a Chalcona Flúor.....	79
Figura 31: Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos ovos de <i>Ae. aegypti</i> após exposição a Bromo Chalcona.	79
Figura 32: Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos ovos de <i>Ae. aegypti</i> após exposição a Chalcona Nitrogênio.	80

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Atividade larvicida da chalcona heterocíclica em <i>Ae. aegypti</i> após 24 e 48 horas de exposição.....	60
Gráfico 2: Atividade larvicida da chalcona flúor contra <i>Ae. aegypti</i> após 24 e 48 horas de exposição.....	62
Gráfico 3: Atividade larvicida da bromo chalcona contra <i>Ae. aegypti</i> após 24 e 48 horas de exposição.....	64
Gráfico 4: Atividade larvicida da chalcona nitrogênio sobre <i>Ae. aegypti</i> após 24 e 48 horas de exposição.....	66
Gráfico 5: Atividade pupicida e CL ₅₀ dos quatro tipos diferentes de chalconas sobre <i>Ae. aegypti</i> após 24 horas de exposição.	68
Gráfico 6: Atividade adulticida dos quatro tipos diferentes de chalconas sobre <i>Ae. aegypti</i> após 24 horas de exposição.	71
Gráfico 7: Atividade dos quatro tipos diferentes de chalconas diante da eclodibilidade em <i>Ae. aegypti</i> após 10 dias de exposição.	75
Gráfico 8: Quantificação de hemócitos totais em larvas (L3) frente exposição aos quatro tipos diferentes de chalconas por 24 e 48 horas.....	83
Gráfico 9: Determinação da produção de NO ²⁻ em larvas (L3) após exposição aos quatro tipos diferentes de chalconas por 24 e 48 horas.....	87
Gráfico 10: Atividade dos quatro tipos diferentes de chalconas diante da toxicidade em <i>Artemia salina</i> após 24 horas de exposição.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações adicionais dos compostos com atividade biológica promissora.	52
Tabela 2. Valores de probabilidade de atividade dos derivados de Chalcona em estudo, segundo a inibição de acordo com a plataforma MolPredict X.....	52
Tabela 3. Valores de energia de ligação ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) e de probabilidade de atividade dos derivados de Chalcona em estudo nas enzimas <i>Aedes aegypti</i> de acordo com o algoritmo MolDock Score.	54
Tabela 4. Valores de probabilidade combinada (PComb) de atividade dos derivados de Chalcona em estudo.	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcento
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
2D	Dois dimensões
3D	Três dimensões
3-HK	3-Hidroxiquinurenina
AADAT	Amino adipate Aminotransferase
Aag-2	Linhagens Celulares de <i>Ae. aegypti</i>
ACC	Acetil-CoA Carboxilase
AG	Ácidos Graxos
Ala	Alanina
AM1	Austin Model-1
AMPs	Peptídeos Antimicrobianos
AP	Ácido Palmítico
ATP	Adenosina Trifosfato
BCH	Bromo Chalcona
BOD	Biological Oxygen Demand
Bti	<i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i>
Cactus	Proteína Inibidora Cactus
CBIOTEC	Centro de Biotecnologia
CG	Corpo Gorduroso
cGMP	Monofosfato de Guanosina Cíclico
CH	Chalconas
CHF	Chalcona Flúor
CHH	Chalcona Heterocíclica
CHIKV	Vírus da Chikungunya
CHN	Chalcona Nitrogênio
CL ₅₀	Curva de Concentração Letal
cm ³	Centímetro Cúbico
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTJ	Centro de Tecnologia
DAS	Dengue com Sinais de Alerta

Def	Defensina
DENV	Vírus da Dengue
DG	Dengue Grave
DGSS	Direcção Geral dos Serviços de Saúde de Bangladesh
Dimetilsulfóxido	DMSO),
FADD	Proteína Associada ao Domínio de Morte Fas
FADH2	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FASN	Sintase de Ácidos Graxos
g	Gramas
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
H ₂ O	Dióxido de Hidrogênio
Hop	<i>Hopscotch</i>
HSL	Lipase Hormônio-Sensível
Ile	Isoleucina
IMD	Via da Imunidade-Relacionada C-Kinase
IRAK	Cinase Associada ao Receptor de Interleucina-1
JAK-STAT	Janus Quinase - Transdutor e Ativador de Transcrição
JHANS	Antagonistas Hormonais Juvenis
Kg	Quilograma
$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	Quilojoules Por Mol
L	Litro
L1	Primeiro Instar
L2	Segundo Instar
L3	Terceiro Instar
L4	Quarto Instar
LPAVET	Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Parasitas e Vetores
LDs	Gotículas Lipídicas Intracelulares
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Lyz	Lisozima
MAPK	Cinase de Proteína Ativada por Mitógeno
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg	Miligramas

mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mRNA	RNA mensageiro
Mt	Mortalidade
MVD	Molegro Virtual Docker
MyD88	Resposta Primária à Diferenciação Mieloide 88
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NaNO ₂	Nitrito Sódico
NaOH	Hidróxido de Sódio
NF-κB	<i>Fator Nuclear kappa-light-chain-enhancer</i>
NNDSS	Sistema Nacional de Vigilância de Doenças de Notificação Obrigatória
NO	Óxido Nítrico (Símbolo)
NO ²⁻	Íon Nitrito (Símbolo)
NO ³⁻	Nitratos (Símbolo)
NOS	Óxido Nítrico Sintase
ODC	Ornitina Descarboxilase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PComb	Probabilidade Combinada
PDB	Protein Data Bank
PGRP-LC	Peptídeo de Reconhecimento de Padrão-LC
pH	Potencial de Hidrogênio
Phe	Fenilalanina
PIAS	Inibidor da Proteína STAT Ativada
PKG	Proteína Quinase G
PLP	Piridoxal-5'-Fosfato
PO	Fenoloxidase
ppm	Partes Por Milhão),
Propor	Profenoloxidases
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PT	Portugal
PTE2	Proteína transportadora de esteróis-2
QAT	Quinurenina Aminotransferase

R ²	R quadrado
Rel1	Proteína Rel1
Rel2	Proteína Rel2
RMSD	Desvio Quadrático Médio
RNS	Espécie Reativa de Nitrogênio
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa
Ser	Serina
SREBP	Proteína de Ligação ao Elemento Regulatório de Esteróis
STAT	Transdutor e Ativador de Transcrição
TAG	Triacilglicerol
Toll	Receptor Toll
Tyr	Tirosina
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFs	Unidades Federais
Upd	<i>Unpaired</i>
USA	Estados Unidos da América
Val	Valina
XA	Ácido Xanturênico
YFV	Vírus da Febre amarela
ZIKV	Vírus da Zika
α	Alfa (Símbolo)
β	Beta (Símbolo)
μL	Microlitro (Símbolo)
μmol	Micromol (Símbolo)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo geral.....	18
2.2	Objetivos específicos.....	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1	Características gerais do mosquito <i>Aedes Aegypti</i> L.....	19
3.2	Principais arboviroses e aspectos epidemiológicos.....	22
3.3	Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes Aegypti</i> L.....	26
3.3.1	Ovos.....	27
3.3.2	Larva.....	29
3.3.3	Pupa.....	30
3.3.4	Adulto.....	31
3.4	Sistema imunológico do vetor <i>Aedes Aegypti</i> L.....	33
3.5	Proteínas essenciais para o metabolismo do <i>Aedes aegypti</i> L.....	36
3.6	Métodos de controle ao vetor <i>Aedes Aegypti</i> L.....	37
3.6	Atividade e síntese de derivados de chalconas.....	39
3.7	<i>Artemia salina</i> e bioensaios de toxicidade organismo não-alvo.....	41
3.8	Integração de métodos computacionais e técnicas experimentais na descoberta de novos compostos.....	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	Substâncias teste.....	44
4.2	Química computacional.....	45
4.2.1	Modelo de predição.....	46
4.2.2	<i>Docking</i> molecular.....	46
4.2.3	Molegro virtual docker (MVD) 6.0.....	46

4.3	Bioensaios	47
4.3.1	Obtenção e manutenção do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	47
4.3.2	Ensaio da atividade larvicida	47
4.3.3	Ensaio de eclosão dos ovos.....	48
4.3.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	48
4.3.4	Ensaio da atividade pupicida.....	49
4.3.5	Ensaio da atividade adulticida.....	49
4.3.6	Determinação da produção do íon nitrito (NO^{2-}).....	50
4.3.7	Avaliação do perfil celular total no <i>pool</i> de hemolinfa	50
4.3.8	Ensaio de toxicidade com náuplios de <i>Artemia salina</i>	51
4.4	Análise estatística	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	Avaliação sobre o modelo de predição, <i>docking</i> e probabilidade combinada	52
5.1.1	Modelo de predição	52
5.1.2	<i>Docking</i> molecular.....	53
5.1.3	Cálculo de Probabilidade Combinada e Avaliação do Potencial <i>Multitarget</i>	54
5.2	Avaliação sob os ensaios da atividade larvicida.....	59
5.3	Avaliação sobre os ensaios da atividade pupicida.....	68
5.4	Avaliação sobre os ensaios da atividade adulticida.....	71
5.5	Avaliação sobre os ensaios da atividade de eclosão.....	74
5.5.1	Análise de Danos Estruturais em Ovos de <i>Ae. aegypti</i> por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	76
5.6	Avaliação sobre os ensaios de perfil celular total.....	82
5.7	Determinação da produção do íon nitrito (NO^{2-}).....	86
5.8	Avaliação sobre os ensaios de atividade toxicidade.....	90
6	CONCLUSÃO	94
7	REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) é responsável por inúmeros desafios na saúde pública, uma vez que é descrito como o principal vetor dos vírus da Febre amarela (YFV), Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) (Al yahya, Shaher, Mahyoub, 2023; Terra *et al.*, 2017). A adaptabilidade do *Ae. aegypti* a uma ampla variedade de criadouros artificiais e condições ambientais contribui significativamente para a alta prevalência destas arboviroses associadas ao vetor. Por sua vez, esta adaptabilidade confere a ele uma vantagem ecológica significativa, tornando-o um desafio contínuo para estratégias de controle vetorial, uma vez que sua capacidade de se adequar a diferentes condições ambientais e alterações climáticas, dificultam os esforços para mitigar sua proliferação, resultando em uma alta incidência destas arboviroses e configurando-se como um grave problema para a saúde pública mundial (Morais *et al.*, 2020). Globalmente, 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de alto risco, especialmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde a temperatura e a umidade promovem a sua proliferação (Fernandes *et al.*, 2020).

O *Ae. aegypti* é um organismo extremamente eficiente e organizado, sendo um excelente modelo para estudar os processos biológicos dos insetos. Torna-o um meio potencialmente acessível para investigação de mecanismos e aplicações sob novos compostos, frente a diferentes variáveis (Galloway; Depledge, 2001; Faraldo *et al.*, 2005). O controle vetorial é uma das formas mais importantes de impedir a propagação do vetor. A literatura científica demonstra que a aplicação contínua de agentes químicos, tem levado a resistência dos mosquitos, além disso, o uso destes produtos podem exercer efeitos nocivos sobre a saúde, e ao meio ambiente, sendo necessário buscar alternativas mais seguras e efetivas. Em resposta a este problema, os compostos sintéticos tornam-se ferramentas com grande funcionalidade, com potencial para servir como métodos paliativos e eficazes para o controle químico de vetores. (Aguiar *et al.*, 2017; Mendes *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2019).

Dessa forma, com o objetivo de explorar novas estratégias para o combate ao vetor, têm sido avaliadas, por meio da síntese orgânica, novas moléculas bioativas com potencial inseticida, como as chalconas. Essas moléculas, que são precursoras na biossíntese de flavonoides, são compostos polifenólicos com uma ampla gama de aplicações biológicas, incluindo atividades antimicrobiana, antiparasitária e inseticida, entre outras. Logo, apesar de sua ampla atividade, ainda permeia uma deficiência de informações sobre a utilização desses compostos, e como poderiam auxiliar no controle populacional de vetores (Souza *et al.*, 2019;

Gomes *et al.*, 2020).

Baseando-se neste contexto, o presente estudo justifica-se pela necessidade de desenvolver alternativas mais eficazes e seguras para o controle de *Ae. aegypti*, considerando a crescente resistência do vetor aos inseticidas convencionais e os impactos adversos associados ao uso prolongado desses produtos sobre o ambiente e a saúde humana. As chalconas, conhecidas por suas propriedades diversificadas, podem demonstrar potencial significativo nos processos biológicos do mosquito. A investigação *in silico* dessas moléculas, juntamente com a avaliação de sua toxicidade em *Artemia salina*, pode fornecer dados essenciais para o desenvolvimento de novos agentes inseticidas, atendendo aos padrões atuais de eficácia e segurança em saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos de chalconas, *in silico*, sob o desenvolvimento e sistema imunológico dos mosquitos *Aedes aegypti*, e toxicidade em *Artemia salina*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliação da atividade *in silico* sobre o *Ae. aegypti* e rastreio dos compostos sintetizados;
- Avaliar a atividade das chalconas sob o desenvolvimento em *Ae. aegypti* diante dos seus diferentes estágios de vida;
- Avaliar a caracterização morfológica em ovos de *Ae. aegypti* por MEV após exposição as chalconas.
- Investigar o efeito das chalconas sobre a produção de óxido nítrico em *Ae. aegypti*.
- Avaliar os efeitos de chalconas sobre as células do sistema imunológico de *Ae. aegypti*.
- Avaliar a atividade de toxicidade das chalconas em *Artemia salina*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Características gerais do mosquito *Aedes Aegypti* L.

O *Aedes aegypti* L., (Figura 1) é um vetor responsável pela transmissão de diversas arboviroses na nossa sociedade, como por exemplo, a zika, dengue, febre amarela e chikungunya (Matthews, 2019). Pertencente ao Filo Arthropoda, Classe Hexapoda, Ordem Diptera, Família Culicidae e Gênero *Aedes*, é originário da África e está disperso por regiões subtropicais e tropicais em várias localidades do mundo (Nunes, 2013; Silveira, 2018). Se adapta muito facilmente a diversos tipos de criadouros artificiais e é altamente antropofílico o que favorece o surgimento de epidemias transmitidas por este vetor (Morais *et al.*, 2020). A elevada incidência de doenças virais, transmitidas pelas fêmeas do mosquito tem representado um grande problema econômico, social e de saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos. A dificuldade em controlar a sua proliferação pode ser atribuída às suas características biológicas, como adaptabilidade a diferentes esferas ambientais, temperatura e sazonalidade (Morais *et al.*, 2020).

Figura 1: Mosquito *Aedes aegypti* adulto.

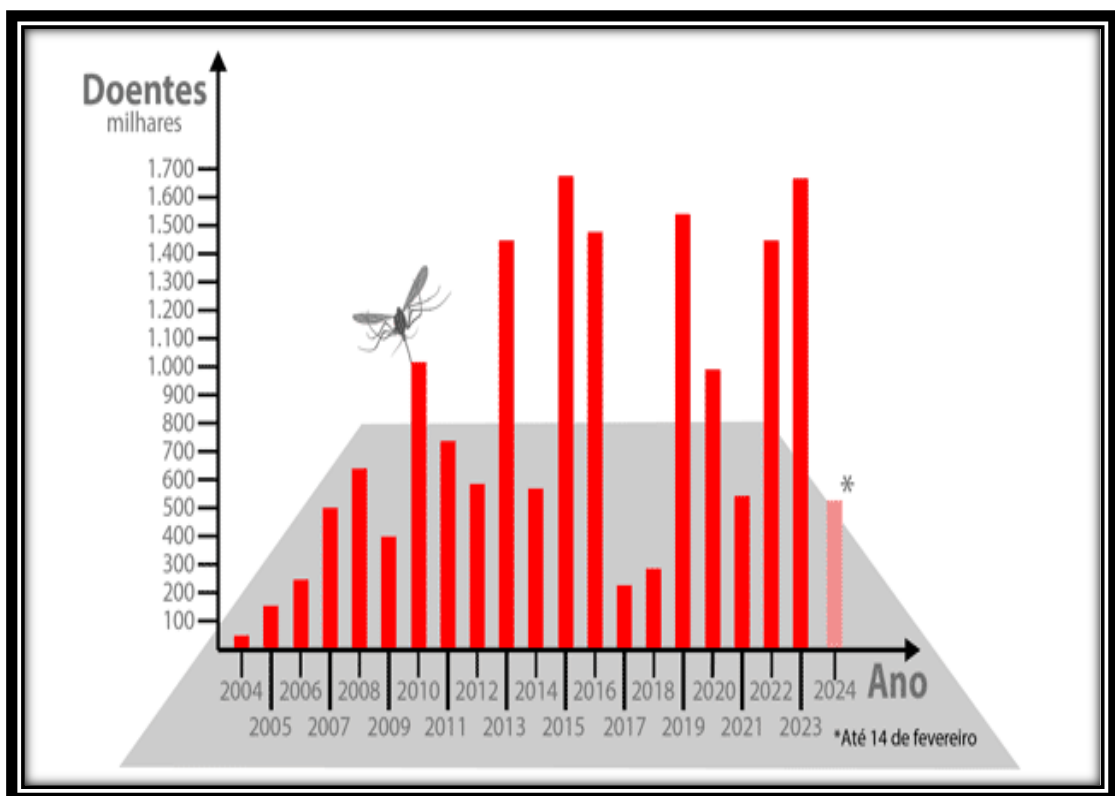


Fonte: Adaptado de <https://www.cnnbrasil.com.br/>

Fatores climáticos contribuem para que o vetor se estabeleça mais facilmente, incluindo períodos de chuva e temperaturas adequadas para o seu desenvolvimento. Outros fatores contribuem para o seu crescimento dispersivo, como a falta de saneamento básico e infra-

estrutura urbana, negligências sobre as ocupações de áreas irregulares, dificuldades diante da coleta do lixo, distribuição irregular de água, e falta de conscientização e participação da população. Esses fatores também favorecem o crescimento populacional do mosquito e comprometem os programas de controle desenvolvidos (Carvalho; Moreira, 2017; Kraemer *et al.*, 2015; David; Lourenço, Freitas, 2009).

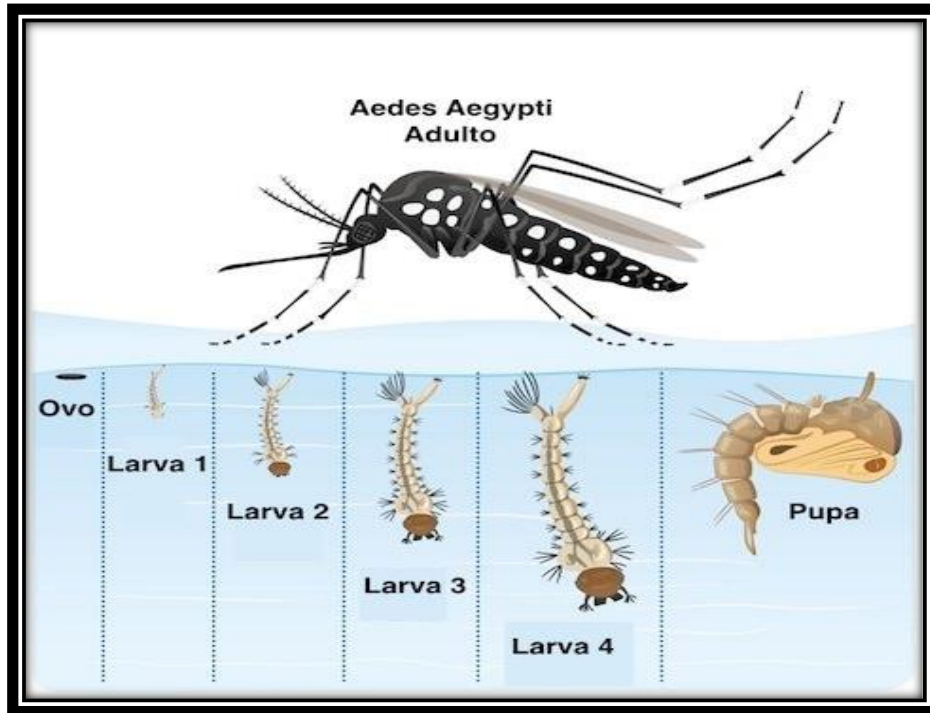
Figura 2: Epidemiologia de pessoas infectadas com o vírus da dengue (2004-2024).



Fonte: Adaptado de <https://www12.senado.leg.br>

Após a eclosão dos ovos, as larvas se desenvolvem em um período de 5-7 dias, dependendo das condições climáticas, até se tornarem pupas. As pupas se desenvolvem por 2-3 dias até se tornarem mosquitos adultos (Figura 3). As fêmeas podem produzir de 100 a 200 ovos após receberem o repasto sanguíneo. Durante o repasto sanguíneo de um ser humano infectado por DENV, CHIKV ou ZIKV, os vírus invadem as células do intestino médio dos insetos, eventualmente espalhando-se para órgãos secundários e glândulas salivares (Fernandes *et al.*, 2019)

Figura 3: Ciclo de vida do *Aedes aegypti*.



Fonte: Adaptado de <https://randolfoteixeira.blogspot.com/>

Após um segundo repasto sanguíneo, injeta o componente viral na corrente sanguínea através da saliva. Uma vez dentro do organismo do hospedeiro, induzem estresse oxidativo via fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase desencadeando uma resposta inflamatória por citocinas. Acredita-se que as citocinas pró-inflamatórias sejam responsáveis pelos sintomas comuns, como febre, fraqueza, cefaleias e mialgias, e em casos raros, aumento da permeabilidade capilar e hemorragia. O mecanismo pelo qual o ZIKV causa microcefalia ainda é desconhecido, mas acredita-se que esteja direcionado a uma resposta imune no sistema nervoso de recém-nascidos, induzindo respostas inflamatórias, apoptose neuronal e morte celular (Oliveira *et al.*, 2024; Dhenni *et al.*, 2021; Mccarthy *et al.*, 2020).

As fêmeas, além de realizarem o repasto sanguíneo, possuem um comportamento de pôr seus ovos em locais ou superfícies úmidas como pneus, plásticos e até mesmo buracos de árvores, em distâncias próximas a superfície da água. A escolha do local de oviposição pelos mosquitos é um fator importante para o seu ciclo de vida. Assim, podem potencializar o seu desenvolvimento e sobrevivência selecionando ambientes adequados para sua reprodutibilidade. Na fase adulta, o *Ae. aegypti* pode ser identificado pelas partes estruturais do mosquito. As observações mais fáceis e claras baseiam-se na parte do tórax, sendo um padrão

de linhas brancas horizontais (Gunara; Joelianto, Ahmad, 2023; Faull; Williams, 2016; Abreu *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2011).

Considerando as características gerais descritas e a dificuldade em controlar sua proliferação, é essencial aumentar a visibilidade da vigilância e do conhecimento da população sobre o problema. Nesse contexto, os métodos de vigilância e educação em saúde são ferramentas importantes no processo de controle, pois contribuem para a autonomia das pessoas, atuando de forma proativa na vigilância de proliferação do vetor. Isso permite não apenas a detecção precoce e a intervenção rápida, mas também a redução do impacto negativo na saúde pública e no meio ambiente, promovendo uma comunidade mais informada e resiliente sobre o tema (Falkenberg *et al.*, 2014; Chaves; Evangelista, Fernandes 2020).

3.2 Principais arboviroses e aspectos epidemiológicos

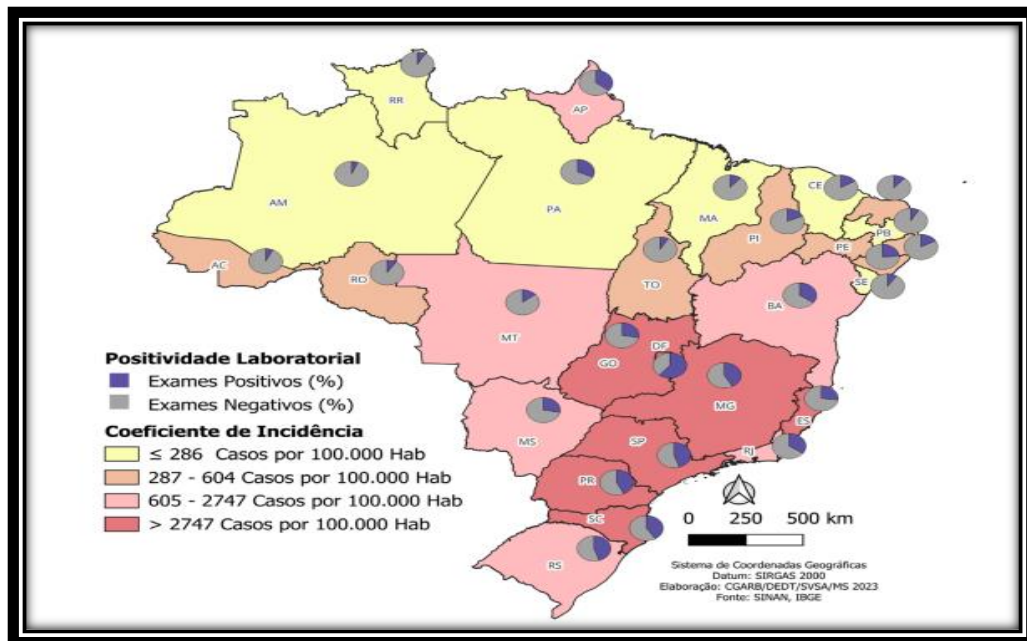
Existem centenas de vírus conhecidos e transmitidos por artrópodes (arbovírus) dos quais cerca de 30 são conhecidos por causar doenças em humanos. Apesar desta diversidade, apenas quatro arbovírus causam danos severos à população global: os vírus causadores da Febre amarela (YFV), Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV). Historicamente, o *Ae. aegypti* é o principal vetor diante das principais epidemias envolvendo estes quatro vírus. Os mesmos são vírus de RNA de fita simples, conhecidos por terem altas taxas de mutações, o que favorece sua rápida evolução e adaptação em diferentes hospedeiros. Três são flavivírus, YFV, DENV e ZIKV e um alfavírus, CHIKV. Todos causam sintomas semelhantes em humanos. No entanto, cada um dos vírus apresenta uma patologia distinta, com altas taxas de mortalidade associadas ao YFV e DENV, enquanto as infecções por CHIKV e ZIKV infreqüentemente resultam em mortalidade elevada, mas em danos semipermanentes (Souza-neto; Powell, Bonizzoni, 2019; Powell, 2018; Rückert; Ebel, 2018).

A distribuição epidemiológica do *Ae. aegypti* está mudando, impulsionada em parte pelas alterações climáticas globais. Estudos de modelagem epidemiológica indicam que a distribuição dessa espécie mude drasticamente durante o próximo século, à medida que habitats que antes eram inóspitos, se tornam favoráveis. Estas mudanças nos padrões de distribuição representarão desafios significativos para a saúde pública, uma vez que as estratégias de vigilância e controle vetorial não poderão basear-se nas tendências históricas da população (Laporta *et al.*, 2023; Bennett *et al.*, 2019; Rochlin *et al.*, 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o risco de infecção por dengue está presente em mais de 129 países, sendo 70% na Ásia. O número de casos de dengue notificados

à OMS aumentou 8 vezes nas últimas duas décadas, de 500 mil casos em 2000 para mais de 5,2 milhões em 2019 (Dos santos *et al.*, 2023). Estima-se que ocorram cerca de 4.000 mortes por ano, além de mais de 300.000 casos suspeitos de CHIKV e ZIKV relatados em todo o mundo. A maioria dos pacientes que desenvolvem ZIKV são assintomáticos. No entanto, gestantes que desenvolvem ZIKV podem dar à luz a recém-nascidos com microcefalia. Em 2016 na região Centro-Oeste, a incidência de dengue foi de 1.065,9/100 mil habitantes, a de chikungunya, de 6,6/100 mil habitantes; e a de zika foi de 189,7/100 mil habitantes. O Distrito Federal, em 2016, registrou 13.645 casos prováveis de dengue, uma incidência de 458,3/100 mil habitantes. Já a incidência de chikungunya foi de 10,4/100 mil habitantes, e a da doença aguda causada pelo vírus Zika, de 8,9/100 mil habitantes (Chaves; Evangelista, Fernandes 2020).

Figura 4: Distribuição do coeficiente de incidência de dengue no Brasil.

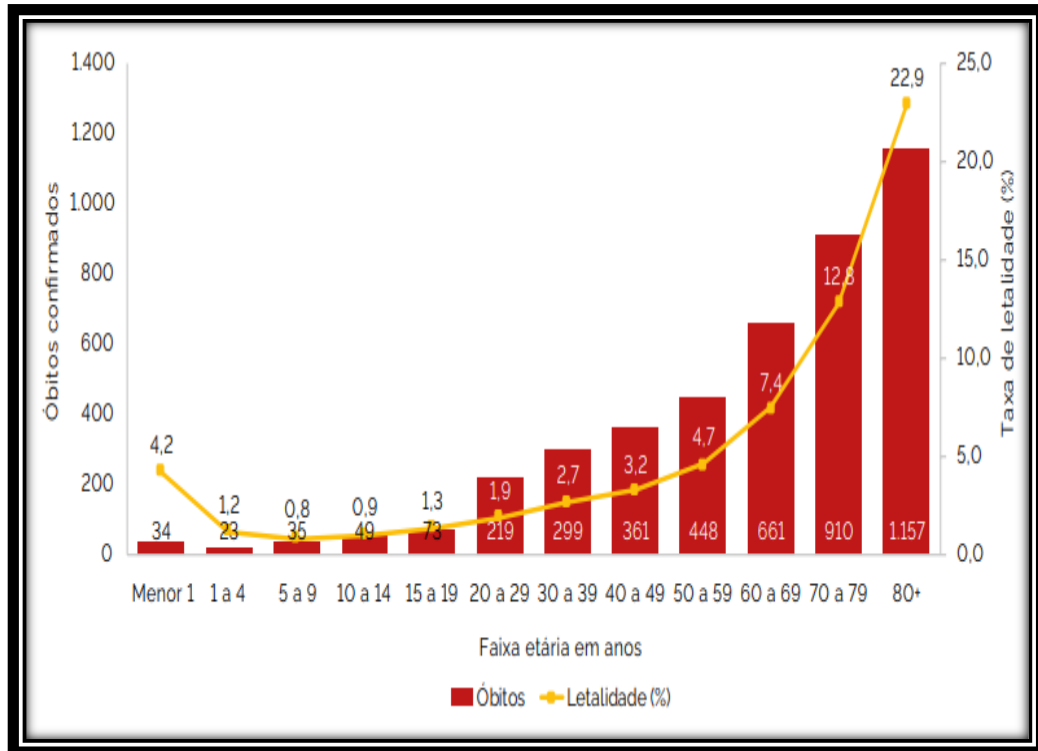


Fonte: Adaptado de Sinan Online e E-SUS VS. Dados atualizados em 1/7/2024.

Em 2024, os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 E DENV-4) foram identificados no país. Todas as Unidades Federais (UFs) apresentaram circulação concomitante de DENV-1 e DENV-2 (Figura 4). Os Estados de Roraima, Pará, Amapá, Maranhão, Piauí, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul apresentaram a circulação de três sorotipos (DENV-1, DENV-2 e DENV-3). No ano de 2024, até o mês de junho, foram confirmados 82.908 casos de dengue com sinais de alerta (DSA) e de dengue grave (DG), o que

representa aumento de 307,8% em relação ao mesmo período do ano anterior, quando foram notificados 20.332 casos de DSA e DG (Figura 5). Em relação ao perfil dos casos de DG + DSA ocorridos em 2024, houve predomínio de indivíduos do sexo feminino, com 56,2% (BRASIL, 2024).

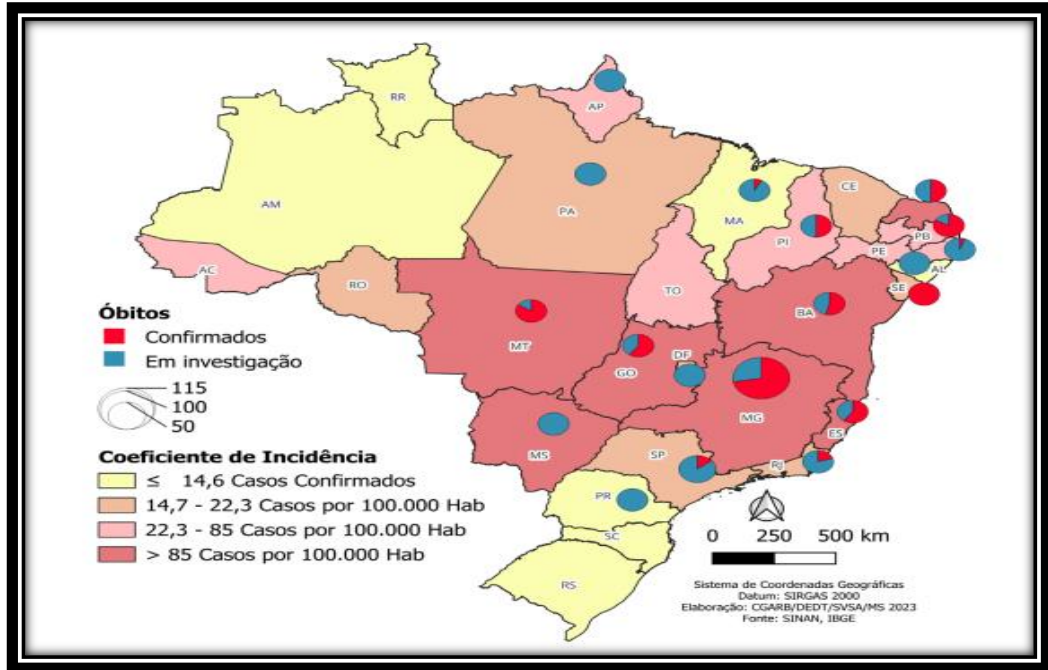
Figura 5: Taxa de letalidade entre os casos graves de dengue por faixa etária.



Fonte: Adaptado de Sinan Online e E-SUS VS. Dados atualizados em 01/07/2024.

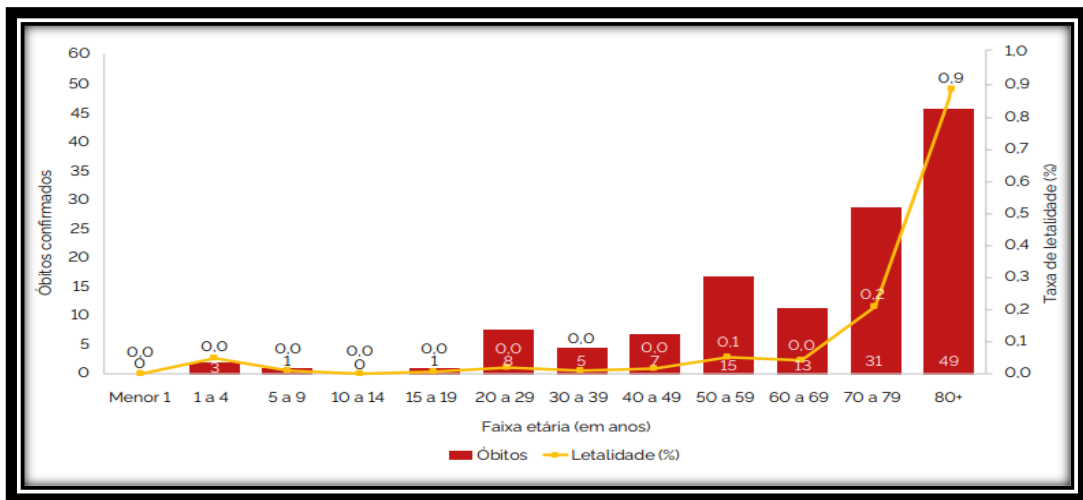
Em 2024 foram notificados 233.225 casos prováveis de chikungunya no país (taxa de incidência de 114,9 casos por 100 mil habitantes) (Figura 6). Esse número representa um aumento de 78,8% ao ser comparado com o mesmo período de 2023, quando foram notificados 130.458 casos prováveis (59,3 casos por 100 mil habitantes). Até o presente boletim, ocorreram 138 óbitos em investigação, que podem ser confirmados ou descartados. A mediana de idade dos óbitos confirmados por chikungunya foi de 73 anos, variando entre 0 e 101 anos, com predomínio do sexo masculino (55,3%) (Figura 7) (BRASIL, 2024).

Figura 6: Distribuição do coeficiente de incidência de chikungunya no Brasil.



Fonte: Adaptado de Sinan Online e E-SUS VS. Dados atualizados em 1/7/2024.

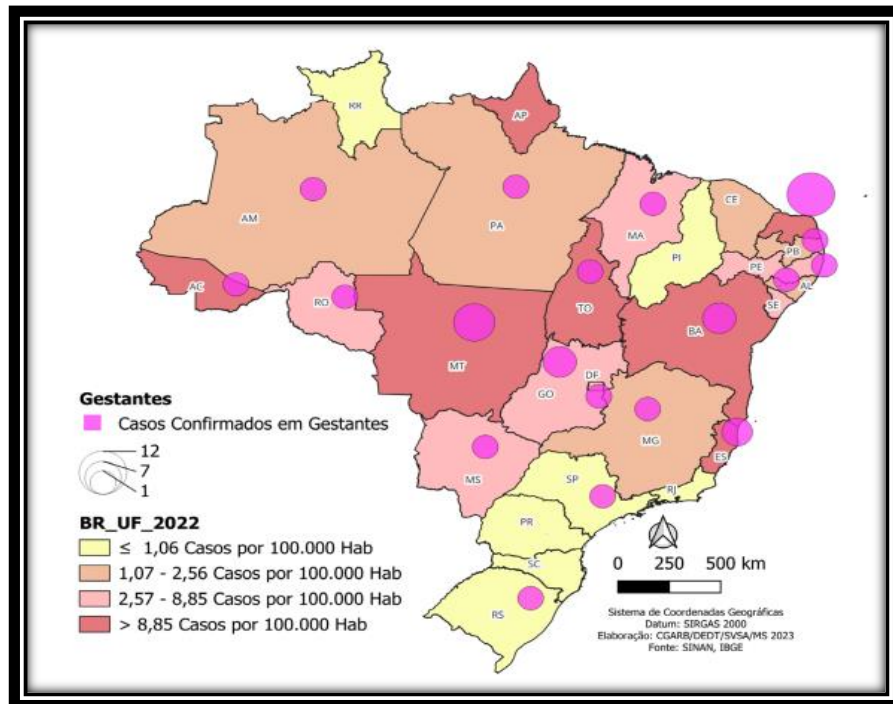
Figura 7: Taxa de letalidade entre os casos graves de chikungunya por faixa etária.



Fonte: Adaptado de Sinan Online e E-SUS VS. Dados atualizados em 01/07/2024.

No que se refere ao grupo populacional das gestantes, foram notificados 764 casos prováveis de zika, dos quais 700 (91,6%) (Figura 8) permanecem em investigação e 64 (8,4%) foram confirmados, sendo 52 (81,2%) por critério laboratorial e 12 (8,8%) por critério clínico epidemiológico. As UF's com os maiores números de casos prováveis em gestantes foram São Paulo (187 prováveis, um confirmado), Espírito Santo (104 prováveis, cinco confirmados) e Minas Gerais (95 prováveis, dois confirmados) (BRASIL, 2024).

Figura 8: Distribuição do coeficiente de incidência de zika no Brasil.



Fonte: Adaptado de Sinan Online e E-SUS VS. Dados atualizados em 1/7/2024.

Um estudo por agrupamento de domicílios entre pessoas de 1 a 50 anos de idade em um município no sul de Porto Rico, território não incorporado dos Estados Unidos da América (USA) entre 2018 a 2019, numa taxa de seroprevalência de 30%, estimou-se que, cerca de 1 milhão de pessoas tenham sido infectadas durante o surto de CHIKV (Hills, 2024). 2.170 casos prováveis de DENV foram notificados na Ilha da Madeira, Portugal (PT) desde o início do surto em 3 de outubro de 2012, dos quais 1.080 foram confirmados laboratorialmente (Rodrigues; Campino; Coelho, 2023; Alves *et al.*, 2013). Entre 1 de janeiro de 2012 a 31 de dezembro de 2022, um total de 13.343 casos de DENV na Austrália foram notificados pelo Sistema Nacional de Vigilância de Doenças de Notificação Obrigatória (NNDSS) (mediana de 1.466 casos; variação 11–2.238). Destes, 12.568 casos (94%) foram externos, 584 (4%) foram adquiridos localmente e 191 (1%) não tiveram origem registada (Sohail *et al.*, 2024).

3.3 Ciclo de vida do mosquito *Aedes Aegypti* L.

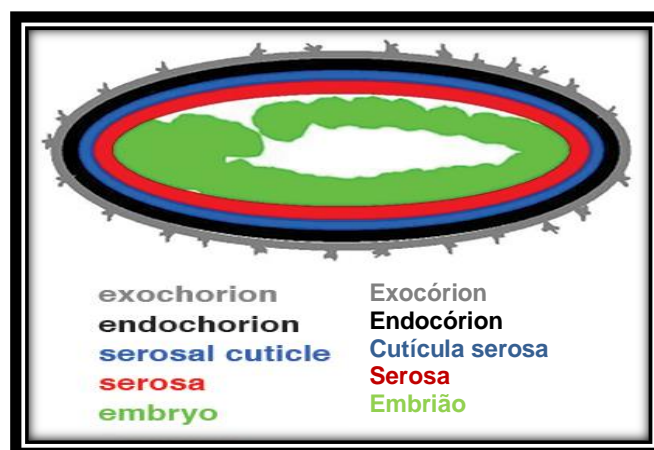
O *Ae. aegypti* (Linnaeus) pertence à família Culicidae e à ordem Diptera. A fêmea põe ovos preferencialmente em ambientes artificiais próximos a água. Após a eclosão, as larvas crescem e sofrem metamorfose. No ciclo de vida do *Ae. aegypti*, quatro estágios larvais e a fase

de pupa ocorrem em ambientes aquáticos, enquanto a fase adulta é predominantemente aérea. As larvas de *Ae. aegypti* no primeiro ínstar possuem aproximadamente 1 milímetro (mm) de comprimento, enquanto no quarto ínstar atingem cerca de 8 mm. Após a ecdise da cutícula larval do quarto ínstar, a pupa emerge contendo a maioria dos órgãos adultos formados, e após a muda da pupa, emerge o mosquito adulto alado. O ciclo de desenvolvimento completo do *Ae. aegypti* é, em média, de 10 dias, seguido por um período adicional de cerca de 30 a 40 dias até a morte do mosquito adulto. Esse período pode variar conforme condições ambientais específicas do local, como temperatura, umidade relativa e disponibilidade de recursos. Essas variáveis influenciam a taxa de desenvolvimento e os processos fisiológicos dos organismos envolvidos, resultando em flutuações no tempo necessário para a conclusão das fases do ciclo de vida. A identificação de larvas, pupas e adultos com base em suas características morfológicas logo após a coleta é crucial para determinar a prevalência do vetor (Fernandes *et al.*, 2020; Bar; Andrew, 2013; Schaper; Hernández-chavarría, 2006).

3.3.1 Ovos

A estrutura dos ovos de *Ae. aegypti* (Figura 9) é composta por quatro camadas distintas: o exocório, endocório, cutícula serosa e serosa. A camada externa, chamada exocório, é responsável por sua proteção física e química, apresentando uma superfície reticulada, com uma textura semelhante a uma rede, que ajuda na adesão às superfícies onde os ovos são depositados. Abaixo do exocório encontra-se o endocório, que possui função adicional de camada protetora, sendo resistente e impermeável, protegendo o embrião contra desidratação e outros fatores ambientais adversos (Bova; Paulson S.; Paulson G., 2016).

Figura 9: Estrutura morfológico do ovo de *Ae. aegypti*.

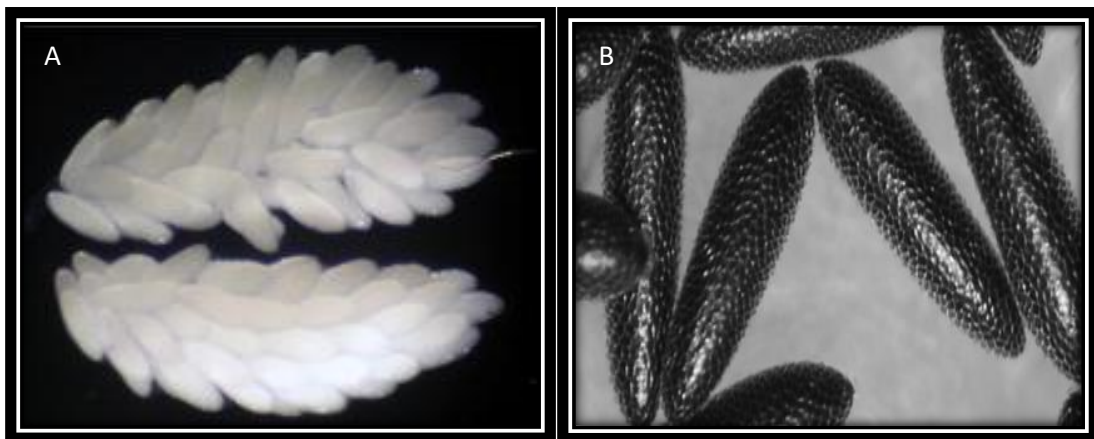


Fonte: Adaptado de <https://www.icr.org/article>

A cutícula serosa e a serosa do ovo de *Ae. aegypti* desempenham papéis fundamentais na proteção e sustentação do embrião. A cutícula serosa é a camada mais externa do ovo, composta por uma combinação de proteínas e lipídios que conferem resistência e impermeabilidade. Esta camada possui uma superfície reticulada ou granulada, o que facilita a adesão a superfícies e oferece uma barreira física contra desidratação, predadores e condições ambientais adversas. Abaixo da cutícula serosa encontra-se a serosa, uma camada interna que reveste o embrião. A serosa é constituída por células que secretam substâncias nutritivas e protetoras, fornecendo suporte essencial para o desenvolvimento embrionário. Esta camada não apenas oferece nutrientes necessários para o crescimento do embrião, mas também protege-o das condições ambientais e de possíveis danos (Rezende *et al.*, 2008; Handel *et al.*, 2000; Valle *et al.*, 1999).

Inicialmente, os ovos são brancos quando recém-postos, mas rapidamente se tornam pretos ou escuros devido a um processo conhecido como melanização, que fornece proteção adicional contra danos físicos e luz ultravioleta (Figura 10A e B) (Mundim-pombo *et al.*, 2021; Bova, Paulson S.; Paulson G., 2016).

Figura 10: A: Ovos de *Ae. aegypti* recém-depositados; B: Ovos de *Ae. aegypti* maturados.



Fonte: Adaptado de Isoe *et al.*, 2019.

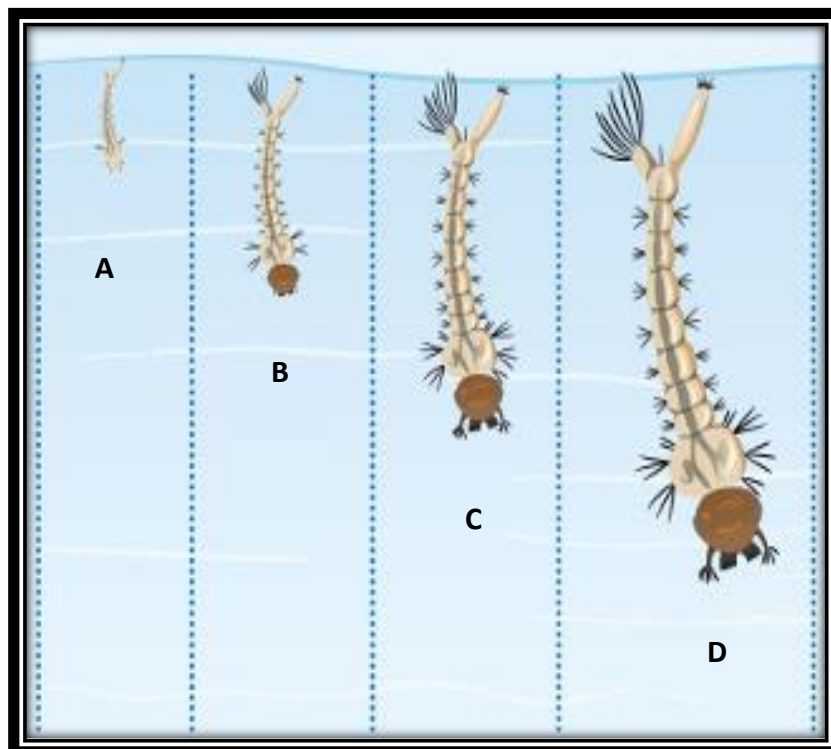
A estrutura morfológica dos ovos de *Ae. aegypti* é essencial para a sobrevivência e desenvolvimento dos embriões em ambientes desafiadores. A resistência oferecida pelo exocório e pelo cório garante que os ovos possam permanecer viáveis durante períodos secos, até que condições favoráveis de umidade permitam a eclosão das larvas (Linley, 1989).

3.3.2 Larva

A fase larval é composta por quatro estágios: L1, L2, L3 e L4 (Figura 11). Durante esse período, a alimentação ocorre por meio da ingestão de material orgânico presente no ambiente aquático, uma vez que esta fase é inteiramente aquática. Além disso, é durante esses estágios que ocorre o crescimento e a diferenciação morfológica, culminando na metamorfose para a fase pupal. As larvas de *Ae. aegypti* são encontradas em diferentes habitats aquáticos, principalmente em pequenos reservatórios de água, e são caracterizadas morfológicamente por terem segmentos como, cabeça, tórax e abdômen (Bar, 2013).

As larvas L1 são muito pequenas, geralmente medindo menos de 1 mm de comprimento, e começam a se alimentar de microrganismos e matéria orgânica presente na água. Neste estágio, as larvas têm um movimento mais lento e menos coordenado em comparação aos estágios posteriores. No estágio L2, ou segundo instar, as larvas são um pouco maiores que as L1, medindo entre 1 e 2 mm de comprimento. Elas continuam a se alimentar de matéria orgânica e microrganismos, mas com uma maior eficiência devido ao aumento do tamanho das mandíbulas. A mobilidade também aumenta, permitindo que as larvas se movimentem mais ativamente na água (Bar; Andrew, 2013; Consoli; Oliveira, 1994)

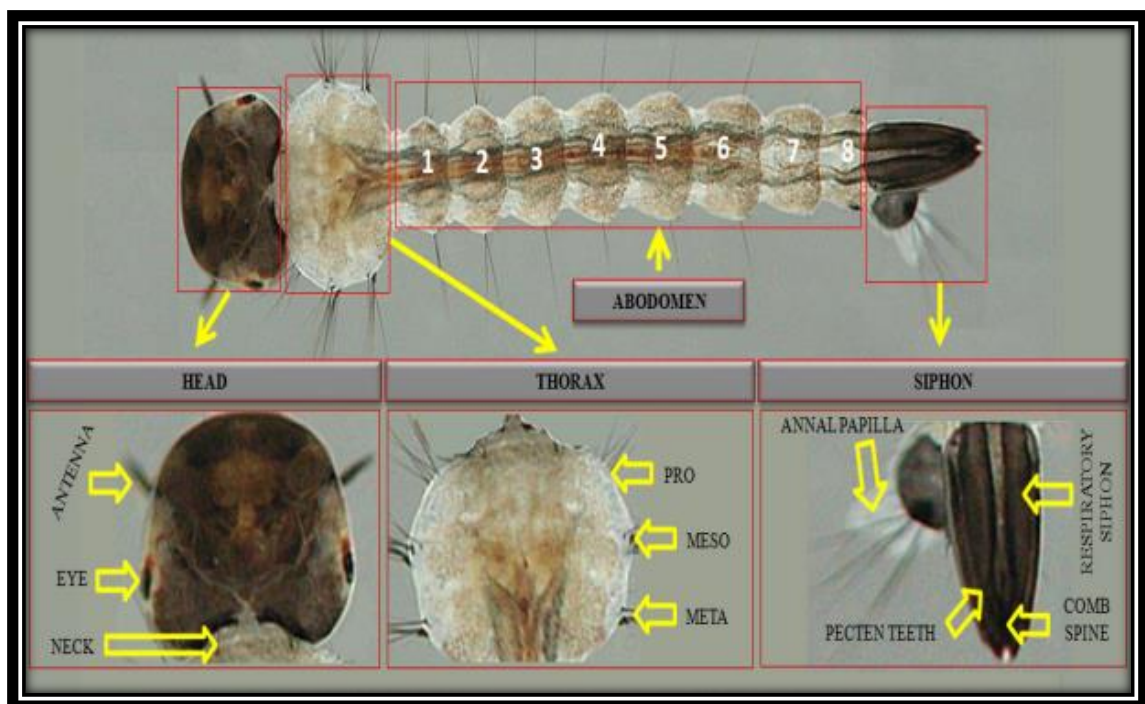
Figura 11: Fases de desenvolvimento larval de *Ae. aegypti*; **A:** larva em estágio L1; **B:** larva em estágio L2; **C:** larva em estágio L3; **D:** larva em estágio L4.



Fonte: Adaptado de Hossain *et al.*, 2022.

No estágio L3, ou terceiro instar, as larvas crescem significativamente, atingindo entre 2 e 4 mm de comprimento. As mandíbulas e outros apêndices bucais são mais desenvolvidos, permitindo uma alimentação mais eficiente. Neste estágio, as larvas exibem um comportamento aquático mais ativo e coordenado, explorando mais amplamente o ambiente em que se encontra. Por fim, no estágio L4, ou quarto instar, as larvas atingem seu maior tamanho, variando de 4 a 8 mm de comprimento. As mandíbulas e apêndices bucais são plenamente desenvolvidos, permitindo uma maior alimentação antes da transição para a fase pupal (Figura 12). As larvas L4 são muito ativas e passam a maior parte do tempo alimentando-se e crescendo rapidamente (Pombo *et al.*, 2021; Consoli; Oliveira, 1994).

Figura 12: Caracterização morfológica da larva de *Ae. aegypti*.



Fonte: Adaptado de Rao e Kumar (2020).

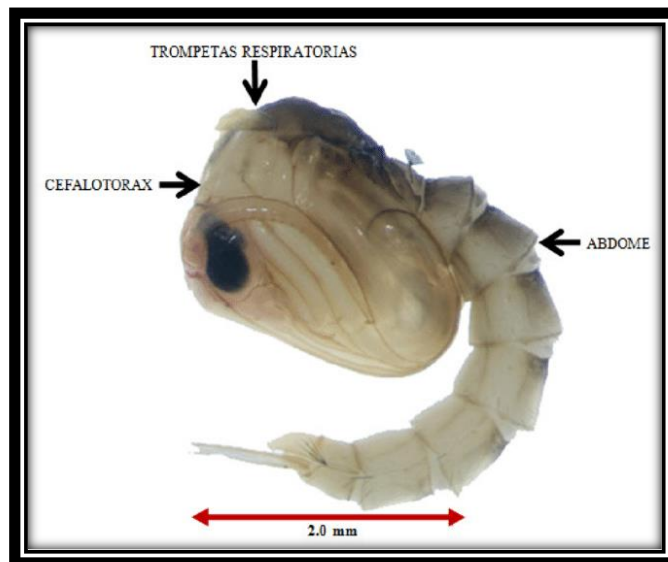
3.3.3 Pupa

A fase pupal de *Ae. aegypti* (Figura 13) é uma etapa crítica no ciclo de vida desta espécie. Após a eclosão dos ovos, as larvas passam por quatro instares larvais antes de se transformarem em pupas. Esta metamorfose representa a transição de um organismo aquático para a forma adulta alada. As pupas de *Ae. aegypti* possuem uma morfologia distinta, caracterizada por um

corpo curvado em forma de vírgula e pela presença de duas estruturas respiratórias denominadas sifões, que se projetam a partir do tórax e são utilizadas para a respiração atmosférica na interface ar-água (Rao; Kumar, 2020; Consoli; Oliveira, 1994).

Durante essa fase, a pupa não se alimenta e permanece em água parada, utilizando a energia acumulada durante as fases larvais para o desenvolvimento. O estágio pupal é relativamente curto, durando em média de 2 a 3 dias, dependendo das condições ambientais em que se encontra. Durante esse período, ocorrem mudanças drásticas internas à medida que os órgãos e estruturas do mosquito adulto se formam a partir dos tecidos larvais (Consoli; Oliveira, 1994).

Figura 13: Pupa de *Ae. aegypti*.



Fonte: Adaptado de Rao, Kumar, 2020.

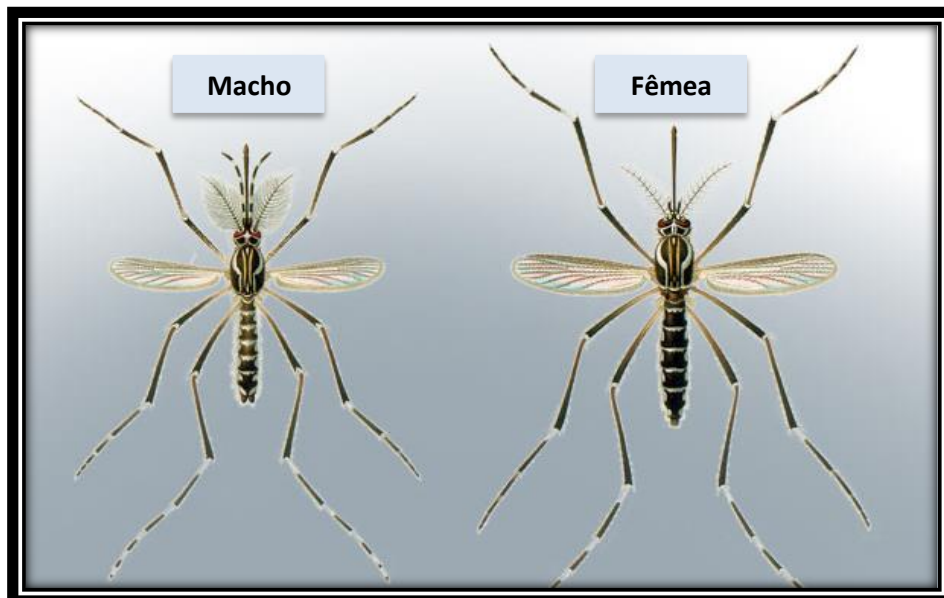
Quando a metamorfose está concluída, ocorre a ruptura da exúvia pupal, permitindo a emergência do adulto. Este processo de emergência, denominado eclosão imaginal, é caracterizado pela rápida transição do mosquito de um estágio aquático para sua fase de vida aérea. A eclosão geralmente ocorre durante as primeiras horas matutinas ou no final da tarde, períodos nos quais a umidade relativa do ar é elevada, facilitando a saída do adulto da superfície aquática e minimizando o risco de desidratação (Rao; Kumar, 2020; Bar; Andrew, 2013; Consoli; Oliveira, 1994).

3.3.4 Adulto

O mosquito adulto de *Ae. aegypti* (Figura 14) é prontamente identificado por suas

características morfológicas específicas. Este díptero possui um corpo graciliforme e membros locomotores longos, com um comprimento corporal médio variando entre 4 e 7 milímetros. O exoesqueleto é predominantemente melanizado, apresentando escamas pretas e brancas que formam um padrão específico de marcações. No tórax, observa-se a presença de escamas prateadas organizadas em forma de lira, que são diagnósticas para a espécie. Os olhos compostos, de grande dimensão, proporcionam uma visão panorâmica essencial para a localização de hospedeiros e a evasão de predadores. As antenas, de tipo filiforme, são segmentadas e desempenham um papel crítico na quimiorrecepção, detectando sinais químicos como o dióxido de carbono (CO₂) e outros voláteis emitidos pelos hospedeiros (Andrew; Bar, 2013; Consoli; Oliveira, 1994).

Figura 14: Diferenças entre fêmea e macho de *Ae. aegypti*.



Fonte: Adaptado de <https://informativogeral.blogspot.com/>

Nas fêmeas (Figura 15), o aparelho bucal é adaptado para a hematofagia, com uma probóscide longa e afilada equipada com serrilhados que facilitam a penetração na epiderme e a subsequente ingestão sanguínea. A alimentação sanguínea é essencial para as fêmeas, pois o sangue fornece os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos ovos. Durante a alimentação, a fêmea de *Ae. aegypti* injeta saliva contendo anticoagulantes e vasodilatadores, facilitando a obtenção do sangue e podendo, concomitantemente, transmitir arboviroses. Em contraste, os machos possuem uma probóscide menos robusta, adequada para a alimentação em substâncias açucaradas,

como néctar de flores. As asas são membranosas e hialinas, sustentadas por um sistema de venação conspícuo e cobertas por escamas que auxiliam na estabilidade durante o voo. A capacidade de voo é silenciosa e altamente manobrável, permitindo ao mosquito acessar hospedeiros com eficiência e evitar predadores (Jové *et al.*, 2020; Farjana; Tuno, 2013; Harrington; Edman, Scott, 2001; Consoli; Oliveira, 1994).

Figura 15: Fêmea de *Ae. aegypti* durante o repasto sanguíneo.



Fonte: Adaptado de <https://semil.sp.gov.br/>

3.4 Sistema imunológico do vetor *Aedes Aegypti* L.

Sabe-se que os insetos apresentam mecanismos eficientes para combater patógenos, construindo respostas que apresentam desfechos efetivos, como as da imunidade inata dos vertebrados. Os sistemas circulatório e imunológico dos insetos, ambos integrados na hemolinfa, são funcionalmente interconectados. Os componentes celulares, chamados de hemócitos, conduzem a resposta celular, circulando ou fixando-se aos tecidos, fagocitando partículas exógenas, muitas vezes acompanhados por um mecanismo de melanização (Estévez-lao *et al.*, 2020; Bergmann *et al.*, 2024). A fagocitose é considerada uma barreira contra patógenos e tem sido descrita na hemolinfa de muitas espécies contra agentes biológicos e não biológicos (Faraldo *et al.*, 2006; Batista *et al.*, 2020).

Os hemócitos de mosquitos são classificados em pró-hemócito, plasmatócito, granulócitos e oenocitóide (Nunes *et al.*, 2013). Os granulócitos apresentam alta adesividade, capacidade fagocítica e a expressão de vários marcadores moleculares que facilitam sua identificação. Estes hemócitos são predominantes na espécie analisada, enquanto os oenocitóides e pró-hemócitos constituem menos de 10% da população total de hemócitos. Os oenocitóides são caracterizados por sua ausência de adesividade e são os únicos hemócitos que

mantêm a atividade de fenoloxidase (PO) de forma constitutiva. Em contraste, os granulócitos manifestam atividade de PO de maneira induzida após um desafio imunológico. A uniformidade no tamanho, a morfologia arredondada, a alta razão nuclear-citoplasmática e a ausência de marcação de diferenciação, são características que corroboram a identificação dos pró-hemócitos como células progenitoras. Adicionalmente, as células identificadas como adipo-hemócitos não pertencem ao grupo dos hemócitos, mas sim representam células do tecido adiposo que podem ser confundidas com hemócitos nas amostras de hemolinfa coletadas de *Ae. aegypti* (Stand, 2008; Castillo; Robertson, Stand, 2006; Hillyer; Christensen, 2002).

Quando um patógeno invade o organismo do *Ae. aegypti*, os hemócitos iniciam uma resposta imunológica complexa através da ativação de vias de sinalização específicas. Este processo se inicia com a detecção do patógeno por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes na superfície dos microorganismos. A interação entre PRRs e PAMPs desencadeia duas principais cascatas de eventos celulares e moleculares (Stand, 2008; Castillo; Robertson, Stand, 2006).

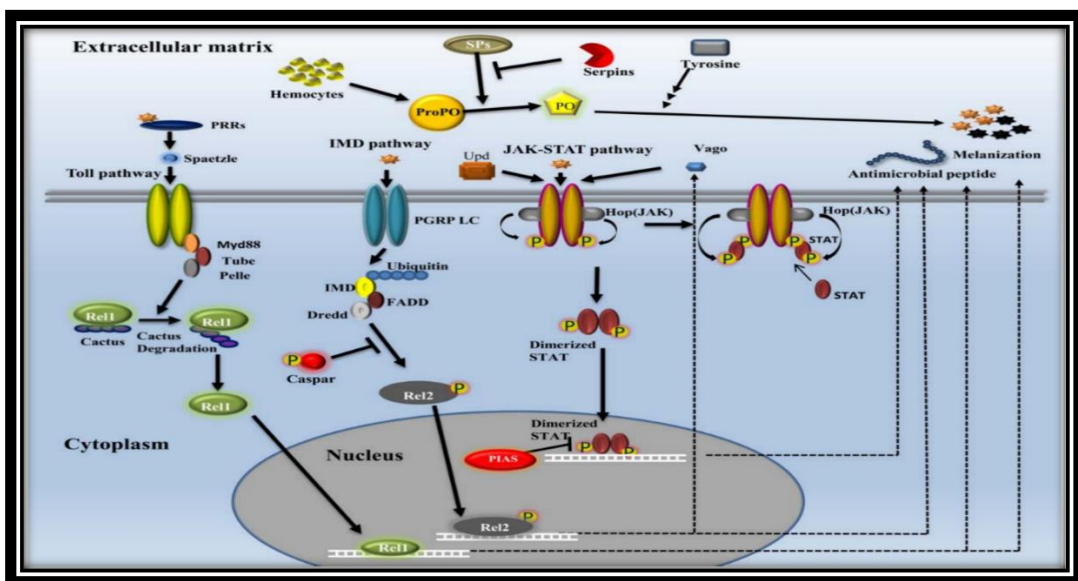
A primeira cascata envolve a ativação de proteínas adaptadoras, como a MyD88 (Resposta Primária à Diferenciação Mieloide 88), que se liga a PRRs e ativa proteínas quinases como a IRAK (Cinase Associada ao Receptor de Interleucina-1). A ativação dessas quinases resulta na fosforilação de fatores de transcrição, como o NF- κ B (*Fator Nuclear kappa-light-chain-enhancer*), que transloca para o núcleo e induz a expressão de genes responsáveis pela resposta imunológica, como *def* (defensina) e *lyz* (lisozima). Estes genes codificam proteínas anti-microbianas que desempenham papéis críticos na defesa contra patógenos (Kumar *et al.*, 2018; Stand, 2008; Hillyer; Christensen, 2002; Drif ; Brehélin, 1983).

A segunda cascata de sinalização envolve a ativação da via de síntese de proteínas de fase aguda e a ativação de vias de sinalização relacionadas ao estresse, como a via da MAPK (Cinase de Proteína Ativada por Mitógeno). Esta via é ativada por diversos estímulos, incluindo a presença de patógenos e sinais de estresse celular. As proteínas ativadas por MAPK promovem a expressão de genes que codificam enzimas digestivas, como a protease serina e a catepsina, que são essenciais para a degradação dos patógenos fagocitados e a manutenção da resposta imunológica. Os hemócitos ativados, como granulócitos, executam a fagocitose, um processo em que patógenos são engolfados e encapsulados em fagossomos. Dentro destes fagossomos, a degradação dos patógenos é facilitada por enzimas digestivas como a catepsina e a protease serina, que atuam degradando proteínas e estruturas celulares dos patógenos. Além disso, os hemócitos liberam moléculas antimicrobianas, como os peptídeos antimicrobianos

(AMPs) e a lisozima, que atuam diretamente contra agentes exógenos ao alterar a integridade da membrana microbiana, promovendo sua destruição (Kumar *et al.*, 2018; Lowenberger, 2001; Blandin; Levashina, 2007).

Outras cascatas de sinalizações (Figura 16) para detecção de patógenos, seria a via Toll (via do receptor Toll), e a via da JAK-STAT (Janus Quinase - Transdutor e Ativador de Transcrição). Essa detecção pela via Toll, leva à clivagem da proteína *spatzle*, que se liga aos receptores Toll e ativam a transcrição de genes de defesa após a degradação da proteína *Cactus* (proteína inibidora *Cactus*), que inibe Rel1 (proteína Rel1). A via IMD (via da Imunidade-Relacionada C-Kinase) é ativada quando patógenos se ligam ao PGRP-LC (Peptídeo de Reconhecimento de Padrão-LC). Isso aciona uma cascata de sinalização envolvendo IMD, e FADD (Proteína Associada ao Domínio de Morte Fas), resultando na fosforilação de Rel2 (proteína Rel2). Rel2 então entra no núcleo para ativar genes que atuam na produção de peptídeos antimicrobianos. A proteína Caspar regula negativamente essa via. A via JAK-STAT é ativada pela interação de Upd (*Unpaired*) com o receptor Dome, levando à ativação das proteínas Hop (*Hopscotch*) e à fosforilação das proteínas STAT (Transdutor e Ativador de Transcrição). O dímero STAT transloca-se para o núcleo e ativa a expressão de genes que produzem peptídeos antimicrobianos. O PIAS (Inibidor da Proteína STAT Ativada) atua como um regulador negativo, inibindo a via JAK-STAT (Kumar *et al.*, 2018; Shin *et al.*, 2005; Bian *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2003; De gregorio *et al.*, 2002).

Figura 16: A via de sinalização da imunidade inata em insetos.



Fonte: Adaptado de Kumar *et al.*, 2018.

A melanização é induzida pelos hemócitos quando eles reconhecem patógenos. Isso resulta na clivagem de profenoloxidasas (ProPO) em PO pela ação de proteases séricas. As POs ativadas, iniciam a melanização dos patógenos invasores, com a atividade das proteases reguladas por serpinas. Esses mecanismos levam à defesa eficaz contra patógenos por meio da produção de peptídeos antimicrobianos, ativação de respostas inflamatórias e de melanização, que juntos atuam na proteção dos mosquitos contra infecções e agentes exógenos, auxiliando na homeostase interna (Kumar *et al.*, 2018; Shin *et al.*, 2005)

Um fator importante para a sinalização de patógenos no sistema imunológico de insetos e vertebrados é o óxido nítrico (NO) (Herrera-ortiz *et al.*, 2011). No sistema imunológico dos mamíferos, o NO é amplamente reconhecido por seus diversos efeitos fisiológicos. Ele atua como uma molécula sinalizadora crucial, desempenhando papéis fundamentais na modulação da resposta imunológica, na regulação do fluxo sanguíneo e na comunicação neural. Em invertebrados, o NO e suas isoformas são sintetizadas por hemócitos, e por diferentes mecanismos de sinalização. A atuação do co-fator NADPH, e da enzima óxido nítrico sintase (NOS) frente a L-arginina é fundamental para o processo de síntese, produzindo quantidades equimolares de L-citrulina como subproduto (Rivero, 2006). As propriedades gasosas do NO permitem que ele permeie facilmente através das membranas, tornando-o uma eficiente molécula sinalizadora que possui função essencial sob a resposta imunológica de diferentes organismos (Bergmann *et al.*, 2023; Bergmann *et al.*, 2021; Estévez-lao *et al.*, 2020; Elphick, Williams, O'shea, 1996; Kuzin *et al.*, 1996). Por outro lado, sua reação de adição com superóxido para formar peroxinitrito (ONOO⁻), uma espécie reativa de nitrogênio (RNS), torna o NO uma molécula altamente reativa. Essas RNS podem causar danos oxidativos a proteínas, lipídios e DNA (Ácido Desoxirribonucleico) em insetos (Ghazawy *et al.*, 2021; Monaghan; Metcalfe; Torres, 2009).

3.5 Proteínas essenciais para o metabolismo do *Aedes aegypti* L.

A proteína transportadora de esteróis 2 (PTE2) é uma proteína que está envolvida no transporte de esteróis, que são moléculas essenciais para a manutenção da integridade das membranas celulares e para processos de sinalização celular. No caso de insetos vetores, como o *Ae. aegypti*, a PTE2 desempenha um papel importante na regulação de esteróis, que são fundamentais para o desenvolvimento e sobrevivência dos insetos. Ela atua tanto na via da β -oxidação quanto no ciclo do ácido cítrico. Durante a β -oxidação, os AG são catabolizados em Acetil-CoA, que é subsequentemente inserido no ciclo do ácido cítrico para continuar o

processo de produção de energia. Esse catabolismo gera cofatores redutores, como NADH e FADH₂ (flavina adenina dinucleotídeo), cruciais para a cadeia transportadora de elétrons, responsável pela produção de ATP (adenosina trifosfato) pela ATP sintase. A elevada expressão da PTE2 no intestino médio de *Ae. aegypti* sugere uma adaptação específica para otimizar o metabolismo lipídico, atendendo às altas demandas energéticas durante o desenvolvimento larval e a reprodução (Lin *et al.*, 2022; Radek; Dyer; Lan, 2010; Blitzer; Lan, 2005; Dyer *et al.*, 2003).

A quinurenina aminotransferase (QAT), por sua vez, é uma enzima que desempenha um papel fundamental no metabolismo do triptofano, um aminoácido essencial que é precursor de várias moléculas bioativas, como a quinurenina, compartilhando 45–50% de identidade de sequência com a versão humana. Esse caminho metabólico está relacionado à regulação do sistema imune e à resposta ao estresse oxidativo em insetos. Em *Ae. aegypti*, a QAT tem sua expressão elevada especialmente na cabeça das larvas, o que sugere uma função importante no sistema nervoso central (SNC) (Han *et al.*, 2005). Dependente de piridoxal-5'-fosfato (PLP), essa enzima é responsável pela conversão da substância tóxica 3-hidroxiquinurenina (3-HK) em ácido xanturênico (XA), uma forma quimicamente estável, tanto em larvas quanto em mosquitos adultos. Esta reação é parte de uma rota crucial de desintoxicação, impedindo o acúmulo de 3-HK, que pode gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) e causar danos ao SNC, levando à morte do organismo (Maciel *et al.*, 2023). Ambas essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência de *Ae. aegypti*.

3.6 Métodos de controle ao vetor *Aedes Aegypti* L.

Devido a dificuldade em controlar a proliferação do vetor e das transmissões de doenças efetivadas pelo *Ae. aegypti*, existem várias formas de combater e tentar diminuir sua população. A mesma pode sofrer declínio por meio do controle mecânico, que consiste em eliminar os depósitos de ovos e locais de desenvolvimento (Figura 17). As principais atividades de controle mecânico envolvem a proteção, a destruição ou a destinação adequada de criadouros, drenagem de reservatórios e instalação de telas em portas e janelas (Chavasse *et al.*, 1997; Zara *et al.*, 2016).

Figura 17: Controle mecânico.



Fonte: Adaptado de <https://amazonasatual.com.br/>

Pode-se utilizar do controle biológico, que por sua vez, consiste no uso de organismos e microorganismos que não são tóxicos para humanos, que não afetam o meio ambiente, diminuindo assim o processo de resistência aos inseticidas (Figura 18). O *Bacillus thuringiensis var israelensis* (Bti) é um exemplo de controle biológico, ao ser ingerido pelas larvas agem liberando endotoxinas que levam à lise do epitélio do intestino e conseqüentemente à morte da larva (Polanczyk; Garcia; Alves, 2003).

Figura 18: Controle biológico.

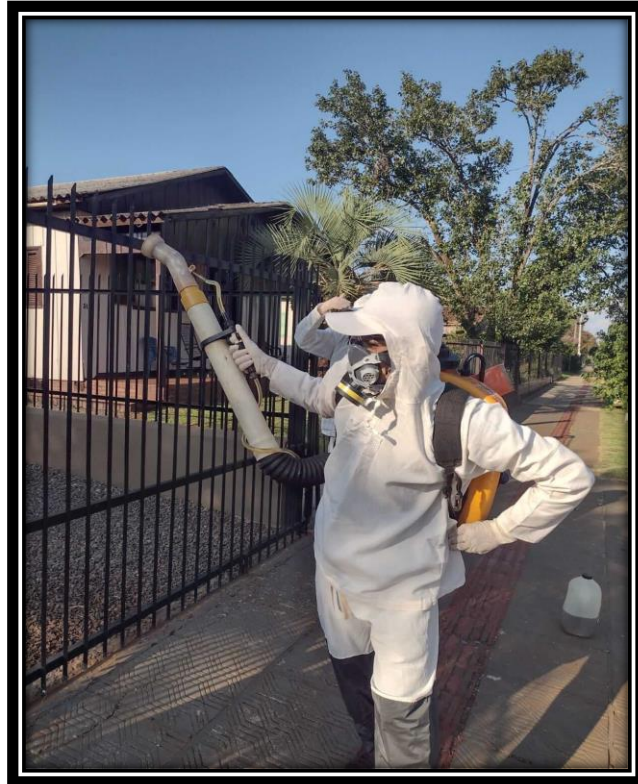


Fonte: Adaptado de <https://novabrescia.rs.gov.br/>

Todavia, a primeira linha de intervenção diante do controle populacional de vetores é o controle químico, que se destaca pelo o uso de inseticidas químicos convencionais, devido sua ação rápida e fácil aplicação, como, organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (Figura 19). Mesmo sendo um método de controle eficiente, possuem suas desvantagens associadas ao uso em longo prazo, que são, os efeitos nocivos em organismos

não-alvo, desequilíbrio ecológico e desenvolvimento de resistência. Uma alternativa ideal seria a utilização de compostos de origem natural, podendo assim, diminuir o impacto que os inseticidas já causam aos diferentes meios e ambientes (Roiz *et al.*, 2018; Zara *et al.*, 2016; Valle; Belinato; Martins, 2015; Braga; Valle, 2007).

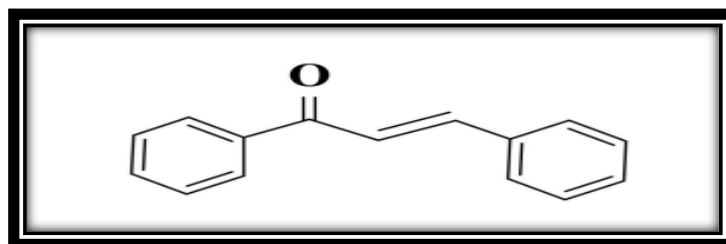
Figura 19: Controle químico.



Fonte: Adaptado de <https://www.pdrmcad.com.br/>

3.6 Atividade e síntese de derivados de chalconas

Os flavonóides são compostos polifenólicos e representam uma classe de metabólitos secundários biologicamente ativos em plantas e que possuem baixo peso molecular. As chalconas (1,3-difenil-2-propen-1-ona) são uma das classes mais importantes de compostos flavonóides presentes em frutas, vegetais e até mesmo em chás, se caracterizam por serem precursores de flavonóides e isoflavonóides. Eles são fitoquímicos lipofílicos, composto por dois resíduos aromáticos (um aldeído e uma acetofenona) unidos por uma cadeia α , e uma carbonila β -insaturada de três átomos de carbono (Constantinescu; Lungu, 2021).

Figura 20: Chalcona.

Fonte: Adaptado de Constantinescu; Lungu, 2021.

O sistema α (alfa), β (beta)-insaturado nas chalconas refere-se à presença de uma dupla ligação entre os carbonos α e β em relação ao grupo cetona. Esse sistema conjugado é crucial para a reatividade das chalconas, influenciando sua capacidade de formar ligações com outras biomoléculas e contribuindo para suas atividades biológicas. Dentro da estrutura das chalconas, os grupos funcionais desempenham papéis importantes. O grupo fenila, representado pelos dois anéis fenólicos, é essencial para a absorção de luz e para a interação com alvos biológicos. Já o grupo cetona (C=O), presente no esqueleto de 1,3-difenil-2-propen-1-ona citado anteriormente, é fundamental para a reatividade química da molécula e sua capacidade de formar interações com outros compostos. Além disso, as chalconas podem apresentar isomeria cis-trans devido à dupla ligação na cadeia de propenona. A conformação cis ou trans pode afetar as suas propriedades e atividades biológicas, destacando a importância da estrutura espacial para suas funções terapêuticas e químicas (Zhuang *et al.*, 2017; Singh; Kaur; Silakari, 2014; Elias; Beazely; Kandepu, 1999).

As chalconas são destacadas por suas diversas propriedades biológicas e potencial terapêutico. Elas são notórias por suas atividades antioxidantes significativas, que ajudam a neutralizar radicais livres e reduzir o estresse oxidativo, contribuindo para a proteção celular e a prevenção de doenças associadas. Além disso, demonstram eficácia antimicrobiana contra diversos patógenos, incluindo bactérias e fungos. Outro aspecto relevante é sua ação anti-neoplásica, induzindo apoptose (morte celular programada) em células tumorais e inibindo o crescimento de tumores. Possuem propriedades anti-inflamatórias, sendo potencialmente úteis no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes. Adicionalmente, as chalconas têm demonstrado potencial na modulação de diversas enzimas, como as quinases, influenciando a sinalização celular e contribuindo para seus efeitos terapêuticos (Mantzanidou; Pontiki; Hadjipavlou-litina, 2021; Mohamed; Abu-rahma, 2020; Rozmer; Perjési, 2016; Mahapatra; Bharti; Asati, 2015; Fang *et al.*, 2014; Prasad; Rao; Rambabu, 2008; Nowkowska, 2007).

Compostos sintéticos baseados em moléculas naturais, como as chalconas, com baixa

ou nenhuma toxicidade para organismos não-alvo, podem ser uma alternativa adjuvante para controlar o crescimento de larvas e a proliferação do vetor (Targanski *et al.*, 2021; Gross *et al.*, 2017).

3.7 *Artemia salina* e bioensaios de toxidade organismo não-alvo

Artemia salina (L.) é uma espécie de crustáceos primitiva encontrada em lagos com certo grau de salinidade, da família Artemiidae, com cerca de 100 milhões de anos. Linné (1758) descreveu-o como *Cýncer salinus*, mas 61 anos depois, Leach (1819) transferiu-o para *Artemia salina*. Foi relatado pela primeira vez em Urmia Lago em 982 por um geógrafo iraniano. A *Artemia* vive apenas em lagos e lagoas com alta salinidade, que varia entre 60-300 pontos. É uma espécie endêmica do mediterrâneo, mas é encontrado em todos os continentes. Pode tolerar grandes quantidades de sal (até 300 gramas de sal por litro de água) e pode se ambientar em soluções bastante diferentes da água do mar. Além disso, esta espécie pode sobreviver em água com alta deficiência de oxigênio. A mínima concentração de oxigênio para um adulto é muito baixo, cerca de 0,5 mg (miligramas)/L, e para náuplios ainda menos de 0,3 mg/L (Munteanu; Dumitrașcu; Biosafety, 2011; Abatzopoulos *et al.*, 2013).

Figura 21: *Artemia Salina*.



Fonte: Adaptado de (Munteanu; Dumitrașcu; Biosafety, 2011).

Indivíduos da espécie *Artemia salina*, especialmente no estágio náuplio, são usados em aquicultura como alimento vivo para crescimento comercial (em incubadoras) de muitas espécies de peixes e mariscos. A *Artemia salina*, é amplamente utilizada em ensaios de toxicidade devido a diversas vantagens metodológicas e científicas. A *Artemia* pode ser facilmente cultivada em condições laboratoriais, apresentando um ciclo de vida curto e alta taxa

reprodutiva, o que permite a realização de testes rápidos e válidos. Além disso, o cultivo e a manutenção de *Artemias* são economicamente viáveis, tornando-as uma opção custo-efetiva para estudos de toxicidade em comparação com outros modelos animais. A simplicidade de seu sistema biológico facilita a interpretação dos dados de toxicidade, proporcionando um organismo importante e amplamente aceito na pesquisa científica (Veeramani *et al.*, 2019; Criel, 2018).

3.8 Integração de métodos computacionais e técnicas experimentais na descoberta de novos compostos

Recentemente, abordagens na descoberta de novos compostos auxiliados por análises computacionais estão atraindo cada vez mais atenção, pois podem ajudar a mitigar a escala, o tempo, e questões de custo enfrentadas por abordagens experimentais convencionais. As análises incluem, identificação computacional de potenciais alvos de drogas, triagem de substâncias químicas, otimização adicional dos compostos e avaliação *in silico* de seu potencial efeito ou toxicidade. Após esses processos serem conduzidos computacionalmente, os compostos candidatos são submetidos a experimentos *in vitro/in vivo* para confirmação. Assim, as abordagens podem reduzir o número de compostos químicos que devem ser avaliados experimentalmente, aumentando a taxa de sucesso através da remoção de compostos ineficientes e tóxicos (Shaker *et al.*, 2021; Segall; Barber, 2014; Tatum *et al.*, 2017; Talele; Khedkar; Rigby, 2010).

Os métodos computacionais (*in silico*) assumem um papel fundamental ao possibilitar a modelagem detalhada, previsão das interações moleculares, otimização das estruturas químicas e a simulação das propriedades biológicas dos compostos. Utilizando métodos avançados de simulação, como *docking* molecular, e modelagem molecular, facilitando a triagem de candidatos com potencial inseticida, oferecendo informações importantes sobre a eficácia e a toxicidade desses compostos. A integração da química computacional com técnicas experimentais, permite a identificação e o desenvolvimento mais preciso de novas estratégias para o controle de vetores, reduzindo o número de experimentos laboratoriais necessários e potencializando o impacto das pesquisas no combate ao vetor (Devillers *et al.*, 2014; Gharaghani; Khayamian; Ebrahimi, 2013).

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma das ferramentas mais versáteis disponíveis para a observação e análise das características microestruturais de materiais sólidos. Com uma resolução de aproximadamente 10 nanômetros, o MEV é essencial em diversas

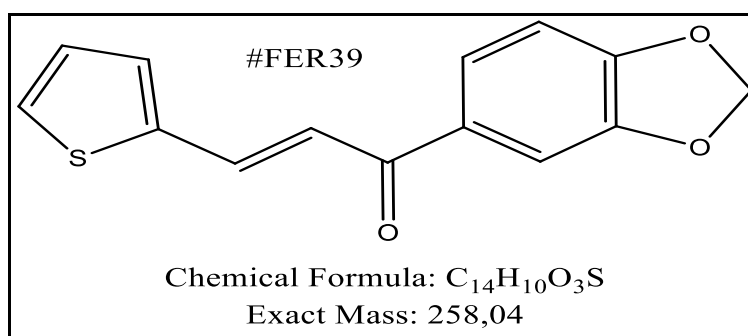
atividades de pesquisa, proporcionando uma ferramenta indispensável para a análise de detalhes morfológicos e estruturais que não são visíveis a microscópios ópticos convencionais. As aplicações do MEV abrangem desde o estudo de organismos inteiros, tecidos e órgãos, até, em certos casos, a visualização *in situ* de organelas subcelulares. O princípio de funcionamento do MEV baseia-se na utilização de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro, que explora a superfície da amostra ponto a ponto, por linhas sucessivas. O sinal gerado pelo detector é transmitido para uma tela catódica, cuja varredura está perfeitamente sincronizada com a do feixe incidente. O MEV utiliza o feixe de elétrons para criar imagens de alta resolução, que facilita a caracterização morfológica, e a observação dos estágios de desenvolvimento embrionário e a investigação de alterações estruturais, como por exemplo em *Ae. aegypti* (Goldstein *et al.*, 2017; Dedavid; Gomes; Machado, 2007; Castro, 2002; Watt, 1997).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Substâncias teste

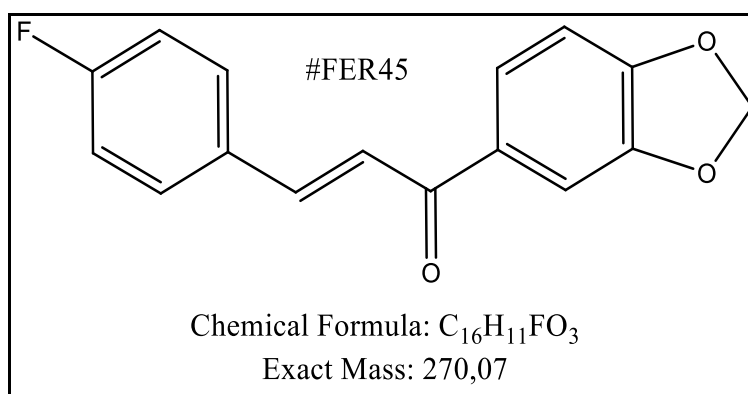
Foram utilizadas chalconas sintéticas cedidas pelo Prof. Dr. Francisco Jaime do Laboratório de Síntese Orgânica (LabSíntese) - UFPB: Chalcona Heterocíclica ($C_{14}H_{10}O_3S$ [massa: 258,04]), Chalcona Flúor ($C_{16}H_{11}FO_3$ [massa: 270,07]), Bromo Chalcona ($C_{18}H_{15}BrO_5$ [massa: 390,01]) e Chalcona Nitrogênio ($C_{18}H_{17}NO_3$ [massa: 295,12]).

Figura 22: Chalcona Heterocíclica (Fer 39).



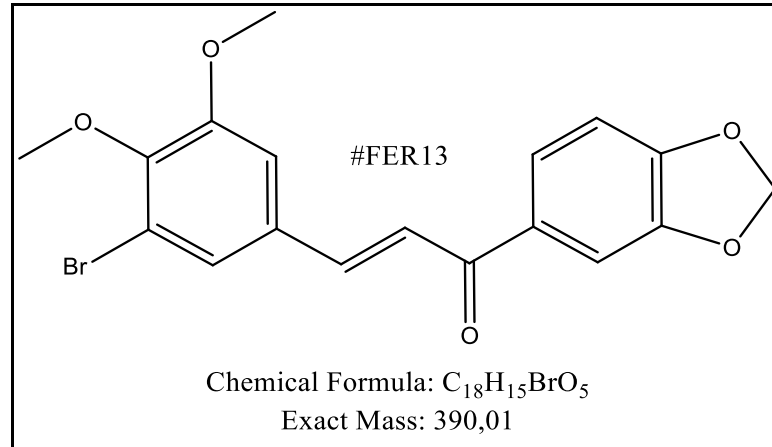
Fonte: Lima, 2024.

Figura 23: Chalcona Flúor (Fer 45).



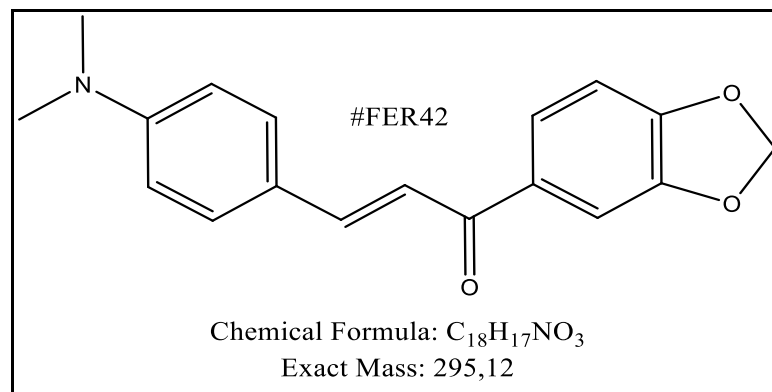
Fonte: Lima, 2024.

Figura 24: Bromo Chalcona (Fer 13).



Fonte: Lima, 2024.

Figura 25: Chalcona Nitrogênio (Fer 42).



Fonte: Lima, 2024.

As chalconas foram obtidas através de métodos de adição e condensação de Claisen Schmidt, havendo precipitação de sólidos de cores variadas. Para solução trabalho, as mesmas foram condicionadas em temperaturas ideais de $3^{\circ}C$ (graus Celsius) $\pm 1^{\circ}C$, pesadas (0,1g), e diluídas em água desclorada, utilizando Tween 80 e 20 (2%) como diluentes no processo de solubilização, totalizando uma solução final de 10 mL. Diante da solução final, foram utilizadas diferentes concentrações, mediante as fases de desenvolvimento do *Ae. Aegypti* e *Artemia Salina*.

4.2 Química computacional

4.2.1 Modelo de predição

A partir da base de dados Molpredict X (<https://www.molpredictx.ufpb.br/home/>) (SCOTTI *et al.*, 2022) foi realizada a avaliação do potencial larvicida das chalconas em estudo. O referido modelo de predição foi construído por meio de descritores RDKit do tipo *fingerprint*, sendo considerados como ativos os compostos que apresentarem valor de (concentração inibitória logarítmica) $pIC_{50} \geq 4.05$ e validação global determinada pelo Coeficiente de Correlação Mathews de 0.68, indicando uma boa predição. O modelo mencionado apresenta validação experimental descrita na pesquisa de Fernandes *et al.*, (2019).

4.2.2 Docking molecular

A simulação de *docking* molecular foi utilizada para investigar o mecanismo dos compostos sintéticos (chalconas), através da afinidade de ligação dos mesmos aos respectivos alvos, a Proteína transportadora de esteróis-2 (PTE2) complexada ao ácido palmítico (AP) (PDB: 1PZ4), com resolução de 1.35 Å (*ångström*), e a Quinurenina aminotransferase (QAT) de *Ae. aegypti* (PDB: 1YIY), com resolução de 1.90 Å. A triagem feita a partir dos estudos de Fernandes *et al.*, 2021. As estruturas 3D das proteínas em estudo foram obtidas através do *Protein Data Bank* (PDB). Previamente ao início da simulação computacional, foi realizado o desenho das estruturas químicas dos compostos no Software Marvin Sketch, ChemAxon e em seguida foi realizada a padronização das estruturas químicas em 2D (dois dimensões) e 3D (três dimensões) e minimização da energia dos compostos pelos métodos de mecânica molecular, e pelo método semi-empírico Austin Model-1 (AM1) por meio do software Spartan 14, WaveFunction. Todas as moléculas de água foram removidas da estrutura cristalina, em seguida foi criado um “*template*” entre a enzima e o ligante co-cristalizado, com a finalidade de demarcar o sítio ativo da macromolécula, em seguida, foi realizado o procedimento com a inserção dos compostos designados no presente estudo, e por fim realizada a simulação de *docking* molecular. O desvio quadrático médio (RMSD) foi calculado a partir das poses, indicando o grau de confiabilidade do ajuste. O RMSD fornece o modo de conexão próximo à estrutura experimental e é considerado bem-sucedido se o valor for inferior a 2,0 Å.

4.2.3 Molegro virtual docker (MVD) 6.0

O software Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) foi utilizado para análise de *docking*, permitindo a visualização e avaliação das interações entre os ligantes e o alvo protéico, bem como a determinação das afinidades de ligação e a previsão da atividade biológica dos

compostos. O ligante complexado foi utilizado para definir o sítio ativo. Em seguida, os compostos foram inseridos, para analisar a estabilidade do sistema através das interações identificadas com o sítio ativo da enzima, tomando como referência o valor energético do MolDock Score (Azevedo; Walter, 2010; Thomsen; Christensen, 2006). O algoritmo MolDock SE (Simplex Evolution) foi utilizado com os seguintes parâmetros, um total de 10 execuções com um máximo de 1.500 interações utilizando uma população de 50 indivíduos, 2.000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2.000 etapas de minimização global por simulação. A função da pontuação MolDock Score (GRID) foi utilizada para calcular os valores de energia de encaixe. Um GRID foi fixado em 0,3 Å e a esfera de busca foi fixada em 15 Å de raio. Para a análise da energia do ligante, foram avaliadas as interações eletrostáticas internas, ligações de hidrogênio internas e torções sp²-sp² (Thomsen; Christensen, 2006).

4.3 Bioensaios

Os bioensaios com o *Ae. aegypti* foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Parasitas e Vetores (LAPAVET), no Centro de Biotecnologia (CBIOTEC) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.3.1 Obtenção e manutenção do ciclo de vida do *Aedes aegypti*

Foram utilizados *Ae. aegypti* da linhagem Lapavet-SD, obtidos de uma colônia cíclica mantida no LAPAVET. Foram mantidos dentro de uma câmara climatizada do tipo *Biological Oxygen Demand* (BOD), sob condições de temperatura controlada de 28°C ± 2°C, umidade relativa do ar 75% ± 5% e fotoperíodo de 12 horas de claro e escuro (WHO, 2015; Imam *et al.* 2014; Nunes *et al.* 2015). A utilização de condições normalizadas de manutenção do ciclo de vida do mosquito para ensaios laboratoriais é essencial para garantir a confiabilidade e reprodutibilidade dos dados (WHO, 2015). Diante disto, utilizou-se nos experimentos: ovos, larvas no terceiro estágio de desenvolvimento (L3), pupas e mosquitos adultos de *Ae. aegypti*.

4.3.2 Ensaio da atividade larvicida

Papeis filtros contendo ovos de *Ae. aegypti* foram imersos em uma bandeja plástica, com cerca de um litro de água destilada, a qual foi acrescentada 0,5g de ração triturada para auxiliar no desenvolvimento das larvas, que se alimentam de constituintes orgânicos presentes

no meio aquático. Após a eclosão, as larvas foram acompanhadas até atingirem o terceiro estágio de desenvolvimento (L3). A atividade larvicida frente ao *Ae. aegypti* foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por WHO (2005). Vinte e cinco larvas de *Ae. aegypti* foram transferidas do insetário, com auxílio de pipetas Pasteur de plástico, para recipientes contendo as substâncias teste em diferentes concentrações (2,5-1000 ppm), totalizando um volume final de 10 mL de solução. As substâncias foram diluídas em água, Tween 80 e 20 (2%), sendo a mortalidade analisada após 24 e 48 horas.

Para o controle negativo as larvas foram expostas a água desclorada, Tween 80 e 20 (2%). Já para o controle positivo utilizou-se um inseticida comercial (SBP) com composição Imiprotrina 0,02%, Permetrina 0,05% e Esbiotrina 0,1% (Nunes *et al.* 2015). As larvas permaneceram em condições ideais de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo. Os testes foram realizados em triplicata.

Foi construída uma curva de concentração letal (CL₅₀) com o auxílio do programa Graph Pad Prism. Como a fase larvar é considerada um alvo preferencial na fase de vida do mosquito para o controle do vetor, por ser geralmente mais susceptível a ação dos inseticidas, os resultados obtidos nestes ensaios serviu de base para definir as concentrações utilizadas nos demais bioensaios.

4.3.3 Ensaio de eclosão dos ovos

Para avaliar a taxa de eclosão, discos de papel filtro contendo 30 ovos recém-coletados do insetário, foram expostos a menor concentração das substâncias teste que causaram mortalidade de 100% das larvas. Os ovos foram mantidos nas condições ideais de desenvolvimento e observados ao longo de 10 dias para contagem de ovos eclodidos, considerando como inviáveis os ovos que após 10 dias não eclodirem. Para o controle negativo os ovos foram expostos a água desclorada, Tween 80 e 20 (2%). Já para o controle positivo utilizou-se de um inseticida comercial (SBP) com composição Imiprotrina 0,02%, Permetrina 0,05% e Esbiotrina 0,1% (Nunes *et al.* 2015). Os testes foram realizados em triplicata.

4.3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram utilizados ovos que após exposição aos quatro tipos diferentes de chalconas foram submetidos à fixação em glutaraldeído (C₅H₈O₂) (2,5%) e tetróxido de ósmio (OsO₄)

(1%), ambos em tampão cacodilato de sódio ($((\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O})$) 0.1M e pH (potencial de hidrogênio) 7,2. Após a lavagem no mesmo tampão, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol (50, 75, 90 e 100%). Após passar o ponto crítico, foi realizada a montagem do material sobre *Stubs* utilizando-se fita adesiva dupla face de carbono seguida da cobertura com banho de ouro, usando o sistema de *sputtering*. Nos grupos controle negativo, foram expostos a água desclorada, Tween 80 e 20. Para análise do material, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV) FEI Quanta 250, no Centro de Tecnologia (CT) pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (Alencar *et al.*, 2003; Mundim, 2016).

4.3.4 Ensaio da atividade pupicida

Para o teste de atividade pupicida seguiu-se as recomendações da WHO (2015). Foram utilizadas 25 pupas de *Ae. aegypti* recém-emergidas, com, no máximo, 24 horas de vida, para cada grupo experimental. As pupas foram transferidas para um recipiente contendo 10 mL de água desclorada, juntamente com as substâncias teste em diferentes concentrações. A mortalidade das pupas foi avaliada em um período de 24 horas. Para o controle negativo as pupas foram expostas a água desclorada, Tween 80 e 20 (2%). Já para o controle positivo as pupas foram expostas a um inseticida comercial (SBP) com composição Imiprotrina 0,02%, Permetrina 0,05% e Esbiotrina 0,1% (Nunes *et al.*, 2015). Os testes foram realizados em triplicata.

4.3.5 Ensaio da atividade adulticida

A atividade adulticida foi realizada através de testes de contato tarsal e corporal (Nunes *et al.*, 2019). Para o contato tarsal, a solução teste foi embebida em algodão e distribuída por toda a parede de um Becker de 250 mL, simulando a aplicação intradomiciliar de inseticidas e seu poder residual nas paredes. Dez mosquitos adultos (5 machos e 5 fêmeas) de *Ae. aegypti* (5-6 dias de idade), foram transferidos para os recipientes descritos, previamente tratados com as substâncias teste e observados por 24 horas. Para o teste de contato corporal, dez mosquitos adultos (5 machos e 5 fêmeas) previamente anestesiados pelo frio receberam uma aplicação direta ao corpo de 10 μL da substância teste na menor concentração que matou 100% das larvas. As substâncias teste foram aplicadas com uma pipeta automática no corpo dos mosquitos, para simular a aplicação direta de inseticidas. Após o contato com as substâncias teste, os insetos foram colocados em um Becker de 250 mL cobertos e observados por 24 horas. Foram considerados mortos os mosquitos que não apresentaram nenhum sinal de movimento, deitados

no fundo do recipiente plástico e não respondendo à estimulação mecânica. Nos grupos controle negativo, para as paredes do copo e a aplicação direta utilizou-se água desclorada, Tween 80 e 20 (2%). No controle positivo os mosquitos foram expostos ao inseticida (SBP) com composição Imiprotrina 0,02%, Permetrina 0,05% e Esbiotrina 0,1%. Os testes foram realizados em triplicata.

4.3.6 Determinação da produção do íon nitrito (NO^{2-})

A produção de NO^{2-} pelas larvas expostas as substâncias teste foi determinada com base no reagente de Griess. Foram realizadas análises das concentrações de NO^{2-} no *pool* de hemolinfa coletada após tratamento com a CL_{50} das substâncias em estudo. Nos grupos controle negativo, as larvas foram expostas a água desclorada e Tween 80 e 20 (2%). Os ensaios foram realizados em triplicata. Cada amostra foi composta pela hemolinfa de 25 larvas (L4) colocadas sob refrigeração (1-2 minutos) para imobilização, e diluída em 1,5 mL de tampão PBS. As larvas foram dispostas em uma placa de Petri e examinadas sob uma lupa estereoscópica. A decapitação da cabeça das larvas foi realizada com uma lâmina de bisturi. Subsequentemente, a hemolinfa foi coletada utilizando um microcapilar de vidro e transferida para um tubo de Eppendorf contendo 1,5 mL de tampão PBS. Após centrifugação em microcentrífuga durante 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para cubetas de quartzo contendo uma solução de PBS e reagente de Griess (naftilenamida 0,1 % p/v, em ácido ortofosfórico 5% v/v, e 10 μL sulfanilamida 1%) na proporção 1:1. Para determinar as concentrações de NO^{2-} (mg/mL), uma alíquota de cada amostra foi analisada através da espectrofotometria. A absorbância foi medida analisando-se os comprimentos de onda individuais de cada substância teste, com varredura de 190 a 562 nm. O NO^{2-} foi quantificado usando uma curva padrão de nitrito sódico (NaNO_2) como referência (Green *et al.*, 1981).

4.3.7 Avaliação do perfil celular total no *pool* de hemolinfa

A avaliação do perfil celular na hemolinfa de larvas de *Ae. aegypti* se deu a partir do processo de coleta da hemolinfa descrito anteriormente, seguido do desprezo do sobrenadante oriundo do processo de centrifugação das amostras. O botão de células formado ao fundo do recipiente utilizado foi ressuspensionado e, então, foram utilizados 10 μL do *pool* de células para observação na câmara de Neubauer e identificação e contagem das células presentes nas amostras dos grupos teste e controle. No grupo teste as larvas foram expostas a CL_{50} das

substâncias teste. No controle negativo as larvas foram expostas a água desclorada, Tween 80 e 20 (2%).

4.3.8 Ensaio de toxicidade com náuplios de *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade foi realizado com náuplios de *Artemia salina*, através da adaptação da metodologia de Meyer (1982), preparando-se uma solução com sal marinho na concentração de 30g para 1L de água desclorada. O pH foi ajustado entre 8,0 e 9,0, por meio de solução 0,1 mol/L⁻¹ de hidróxido de sódio (NaOH). Esta solução foi utilizada para eclosão dos ovos de *Artemia salina* e no preparo das demais diluições. Os ovos foram dispostos para eclosão em uma solução salina por 48 horas, com aeração constante a 25°C. Dez náuplios de *Artemia salina* foram transferidos para tubos de ensaio contendo concentrações que variaram de 2,5 a 1000 ppm das chalconas. Para o controle negativo, foram utilizados dez náuplios, juntamente com 10 mL da solução salina que os mesmos eclodiram, sendo expostos a Tween 80 e 20 (2%). Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo a contagem da mortalidade e sobrevivência realizada no período de 24 horas.

4.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m). Realizou-se análise de variância “one-way”, e o pós teste de Tukey de acordo com os experimentos. Foi considerado p<0,05 para significância estatística das análises obtidas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os resultados, foram realizadas análises sobre a utilização de quatro tipos diferentes de chalconas (Tabela 1), (Chalcona Heterocíclica [Fer 39; CH], Chalcona Flúor [Fer 45; CF], Bromo Chalcona [Fer 13; BC] e Chalcona Nitrogênio [Fer 42; CN]) *in silico*, sobre as fases de desenvolvimento do *Ae. Aegypti* (ovo, larva, pupa e mosquito adulto), e toxicidade em *Artemia Salina*.

Tabela 1. Informações adicionais dos compostos com atividade biológica promissora.

	Fórmula Molecular	
Composto		Massa Molar
Fer39	C₁₄H₁₀O₃S	258,04 g/mol
Fer45	C₁₆H₁₁FO₃	270,07 g/mol
Fer13	C₁₉H₁₇BrO₅	390,01 g/mol
Fer42	C₁₈H₁₇NO₃	295,12 g/mol

Legenda: Em negrito encontra-se os compostos utilizados: FER13 = Bromo chalcona (Bromo); FER45 = Chalcona flúor (Flúor); FER42 = Chalcona nitrogênio (Nitrogênio); FER39 = Chalcona heterocíclica (Enxofre); C = Carbono; H = Hidrogênio; N = Nitrogênio; O = Oxigênio; Br = Bromo; S = Enxofre; F = Flúor.

5.1 Avaliação sobre o modelo de predição, *docking* molecular e probabilidade combinada

5.1.1 Modelo de predição

Diante do potencial larvicida dos flavonoides e de estudos recentes que avaliam a relação estrutura atividade de chalconas obtidas por síntese, foi realizado um estudo computacional com quatro derivados sintéticos de chalconas: BC (FER 13), CF (FER 45), CN (FER 42) e CH (FER 39). Frente aos estudos conduzidos por Fernandes *et al.*, 2021, o estudo *in silico* realizado objetivou analisar o perfil larvicida desses derivados em função dos valores de probabilidade de atividade em *Ae. aegypti*, como também pela avaliação da afinidade aos alvos: Proteína Transportadora de Esterol-2 (PTE2) (PDB: 1PZ4) e Quinurenina Aminotransferase (QAT) (PDB: 1YIY). Os resultados referentes ao modelo de predição dos compostos frente a probabilidade de inibição do *Ae. aegypti* segundo a plataforma MolPredict X é demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de probabilidade de atividade dos derivados de Chalcona em estudo, de acordo com a plataforma MolPredict X.

Composto	Probabilidade de Atividade (p)
FER 13	0.6

FER 45	0.6
FER 42	0.6
FER 39	1

Legenda: Em negrito encontram-se destacado o composto de maior valor de probabilidade. FER13 = Bromo chalcona (Bromo); FER45 = Chalcona flúor (Flúor); FER42 = Chalcona nitrogênio (Nitrogênio); FER39 = Chalcona heterocíclica (Enxofre).

O modelo de predição desenvolvido para compostos com atividade larvicida previamente relatada e validada experimentalmente demonstrou que os derivados de chalconas em estudo apresentaram valores de probabilidade de atividade superiores a 0,6. Destaca-se o composto CH (FER 39), que exibiu o valor mais elevado de probabilidade de atividade, igual a 1. Este valor indica uma alta probabilidade de atividade larvicida, considerando que os compostos são classificados em uma escala de 0 a 1.

5.1.2 *Docking* molecular

Os derivados de chalconas em estudo foram submetidas a simulações de *Docking* molecular nas seguintes proteínas: PTE2 complexada ao ácido palmítico (AP) (PDB: 1PZ4) e QAT do *Ae. aegypti* (PDB: 1YIY). Os resultados foram gerados usando a função de pontuação MolDock Score. Valores mais negativos indicaram uma maior afinidade ao alvo em estudo, em seguida foi realizada uma normalização que consistiu na padronização dos resultados dos compostos em função dos valores de energia de ligação do composto de menor energia gerando um valor de probabilidade (p).

Antes da realização da simulação de *docking* molecular, foi prosseguida a validação do composto em estudo por meio do re-*docking* entre o ligante e a proteína co-cristalizada. O valor do RMSD indica a distância média quadrática entre os átomos do ligante na estrutura cristalina e os átomos correspondentes na pose ancorada. A observação do valor (melhor pontuação) de RMSD é uma boa forma para avaliação da capacidade de um método em encontrar o modo de ligação de um ligante em um conjunto de posições. Para que um *docking* seja considerado confiável, é necessário que o valor de RMSD seja igual ou inferior a 2.0 Å. O valor de RMSD correspondeu a 0.8037 para o ligante co-cristalizado AP da PTE2 (PDB: 1PZ4) e a 0.1256 para o ligante 4'-deoxi-4'-aminopiridoxal-5'-fosfato (4DAF) da proteína QAT (PDB: 1YIY), indicando que as poses geradas posicionaram o ligante corretamente no local ativo e que o programa forneceu valores considerados satisfatórios para a validação do *docking*. A Tabela 3 demonstra os valores de energia de ligação e de probabilidade de atividade, respectivamente

para as duas proteínas em estudo:

Tabela 3. Valores de energia de ligação ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) e de probabilidade de atividade dos derivados de Chalcona em estudo nas enzimas *Aedes aegypti* de acordo com o algoritmo MolDock Score.

Composto	Proteína transportadora de esteróis-2 (PDB: 1PZ4)		Quinurenina aminotransferase (PDB: 1YIY)	
	MolDock Score	(p)	MolDock Score	(p)
FER 13	-120.924	0.955	-121.356	0.944
FER 45	-119.587	0.945	-126.935	0.987
FER 42	-126.547	1	-127.136	0.989
FER 39	-117.151	0.925	-128.536	1
Lig PDB	-116.139	0.917	-114.713	0.892

Legenda: Em negrito encontram-se destacado o composto de maior afinidade. FER13 = Bromo chalcona (Bromo); FER45 = Chalcona flúor (Flúor); FER42 = Chalcona nitrogênio (Nitrogênio); FER39 = Chalcona heterocíclica (Enxofre); Ligante PDB (controle); Valores de probabilidade de atividade dos derivados de Chalcona em estudo nas enzimas *Aedes aegypti* (0 a 1).

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 3, pode-se observar que as chalconas apresentaram valores de energia de ligação mais negativos em todas as proteínas em estudo, indicando prováveis interações ao sítio alvo. Além disso, é importante mencionar que nas duas proteínas alvos os compostos teste apresentaram valores de probabilidade (p) superiores aos ligantes PDB, indicando dessa forma uma maior afinidade. Para a PTE2 (PDB: 1PZ4) foi observado que os compostos em estudo apresentaram valores de probabilidade acima de 0.92, sendo o composto CN (FER 42) de maior afinidade ($p=1$), enquanto que o ligante PDB apresentou valores de probabilidade correspondentes a 0.917. Enquanto na proteína QAT (PDB: 1YIY), foi observado que os compostos teste apresentaram valores de probabilidade de atividade acima de 0.94, sendo o composto CH (FER 39) o de maior afinidade ($p=1$), enquanto que o ligante do PDB apresentou valores de probabilidade correspondentes a 0.892.

5.1.3 Cálculo de Probabilidade Combinada e Avaliação do Potencial *Multitarget*

Uma segunda análise de consenso foi realizada para identificar potenciais multialvos sob os derivados de chalconas, que demonstram as probabilidades de serem potenciais ativos para mais de uma proteína, com base no modelo de predição e nas simulações de *docking* molecular. Nesse estudo, foram utilizados todos os resultados da previsão da atividade biológica dos derivados de chalconas, sendo estes combinados aos resultados do *docking*. Essa análise combinada, além de selecionar os compostos ativos, é capaz de selecionar os compostos mais

potentes combinando duas importantes metodologias, baseadas no ligante e na estrutura. Para esta análise, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$Prob_{Comb} = \frac{(ProbDc + (1 + ESP) \times P_{Activity})}{2 + ESP}, \text{ Se } Prob_{Comb} > 0.5$$

Onde ProbDc é a probabilidade de um composto estar ativo na análise da interação molecular, ESP é o valor da especificidade do modelo de RF (*Random forest*) e PActivity é o valor de probabilidade de um composto estar ativo no modelo de RF. A probabilidade combinada (Probcomb), baseada no ligante e na estrutura, pode aumentar o poder preditivo dos modelos e diminuir o número de falsos positivos. Para que as moléculas sejam consideradas potencialmente ativas, os valores de probabilidade devem ser iguais ou superiores a 0,5. Quanto maior o valor de probabilidade combinada, maior o potencial da molécula. Os valores de probabilidade combinada foram calculados para todas as chalconas e para cada proteína alvo, e em seguida foi realizada a análise de quais moléculas eram multialvos. Os resultados de probabilidade combinada encontram-se demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de probabilidade combinada (PComb) de atividade dos derivados de Chalcona em estudo.

Composto	Proteína transportadora de esteróis-2 (PDB: 1PZ4)	Quinurenina aminotransferase (PDB: 1YIY)
FER 13	0.590	0.588
FER 45	0.583	0.596
FER 42	0.6	0.596
FER 39	0.962	1

Legenda: Em negrito encontram-se destacado o composto de maior valor de probabilidade. FER13 = Bromo chalcona (Bromo); FER45 = Chalcona flúor (Flúor); FER42 = Chalcona nitrogênio (Nitrogênio); FER39 = Chalcona heterocíclica (Enxofre); Valores de PComb (0 a 1).

Após realizar a análise combinada, com base no ligante e estrutura, e utilizando a fórmula para identificar moléculas potencialmente ativas e multialvos, foi observado que todos os compostos teste apresentaram potencial *multitarget*, visto que estes apresentaram valores de probabilidade combinada (PComb) acima de 0.5 nos dois alvos em estudo. Para a PTE2 (PDB: 1PZ4) foi observado que o composto de maior valor de PComb correspondeu a CH (FER 39) (PComb = 0.962), como também este composto apresentou o maior valor de PComb no alvo QAT (PDB: 1YIY), correspondendo a valores de PComb correspondentes a (PComb = 1). A

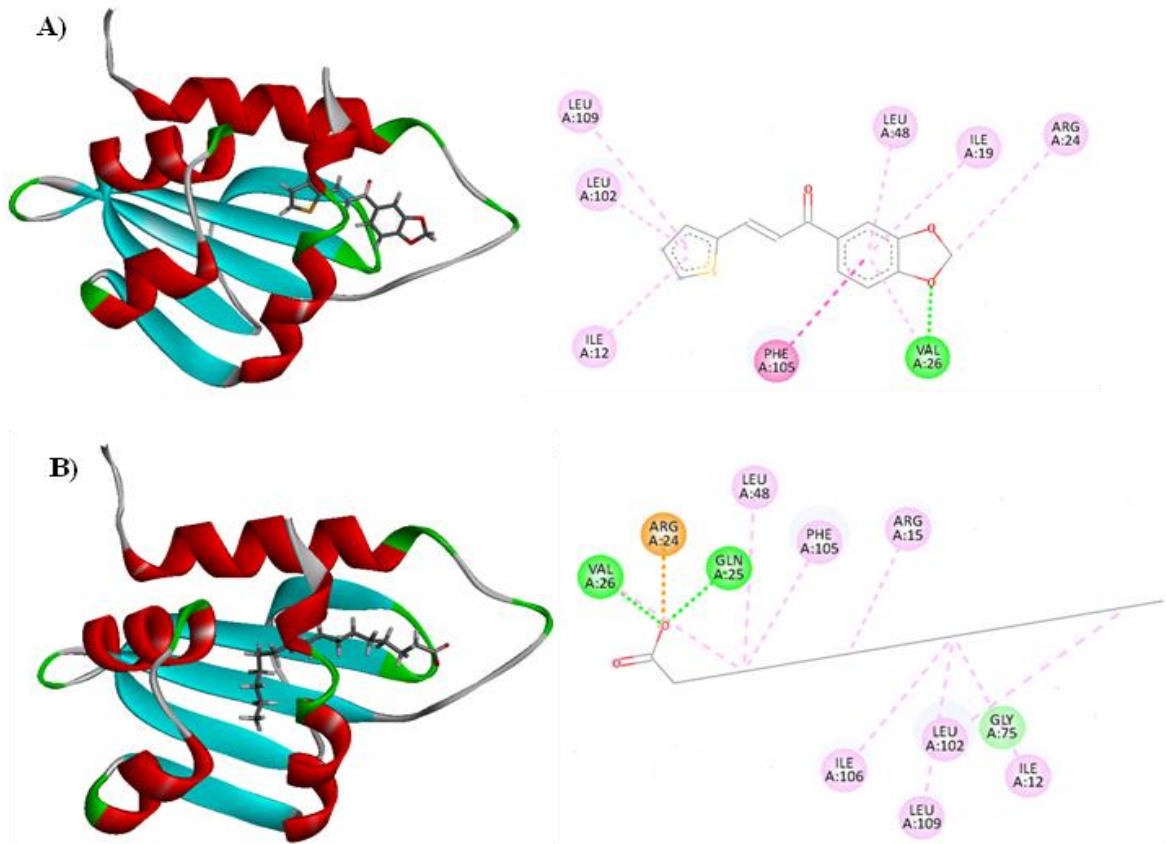
interação do composto CH (FER 39) com os alvos, PTE2 (PDB: 1PZ4) e QAT (PDB: 1YIY), pode ser visualizada nas Figuras 26 e 27 respectivamente.

De acordo com a Figura 26 observa-se que as interações estabelecidas pela CH (FER 39) com a PTE2 complexada ao AP (PDB: 1PZ4) são do tipo interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa) e interações do tipo ligações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde). As interações hidrofóbicas foram as mais prevalentes sendo observadas principalmente nos grupos cíclicos da estrutura química dos compostos, tendo como destaque o anel tiofeno. Os resíduos observados corresponderam a: Ile 12 (1 interação), Leu 102 (1 interação), Leu 109 (1 interação), Leu 48 (1 interação), Ile 19 (1 interação), Arg 24 (1 interação), Val 26 (1 interação) e Phe 105 (1 interação). Apenas uma interação do tipo ligação de hidrogênio foi observada, correspondendo respectivamente ao resíduo de Val 26. Vale destacar que o resíduo Leu 102 é um resíduo chave na manutenção da cadeia hidrofóbica da proteína em estudo.

O ligante co-cristalizado AP apresentou interações do tipo estéricas (linhas tracejadas em laranja), interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa) e interações do tipo ligações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde). O grupo éster estabeleceu interações estéricas por meio do resíduo Arg 24 (1 interação) e interações do tipo ligações de hidrogênio por meio dos resíduos Gln 25 (1 interação) e Val 26 (1 interação). A longa cadeia hidrocarbonada do ácido graxo ficou responsável pelos estabelecimentos das demais interações que corresponderam aos resíduos Val 26 (1 interação), Leu 48 (1 interação), Phe 105 (1 interação), Arg 15 (1 interação), Ile 106 (1 interação), Leu 102 (1 interação), Leu 109 (1 interação) e Ile 12 (1 interação), sendo estes do tipo interações hidrofóbicas, e o resíduo Gly 75 das interações do tipo ligação de hidrogênio. Foram observadas semelhanças entre os resíduos estabelecidos pelo CH (FER 39) e o ligante co-cristalizado AP que corresponderam as interações hidrofóbicas dos resíduos: Leu 109, Leu 102, Ile 12, Leu 48, Val 26 e Phe 105, indicando dessa forma que os compostos podem compartilhar o mesmo sítio de ação. A lipofilicidade desempenha um papel crucial na interação com a PTE2. No estudo conduzido por Cruz-Castillo *et al.* (2023), as substâncias carvacrol, limoneno e γ -terpineno apresentaram interações significativas com os resíduos Leu 48 e Leu 102, resultando em altos valores de afinidade. Esses resultados são consistentes com os dados obtidos no presente estudo.

Figura 26: Interações 2D e 3D entre o composto teste chalcona heterocíclica, o ligante co-cristalizado ácido

palmítico e a proteína transportadora de esteróis-2.

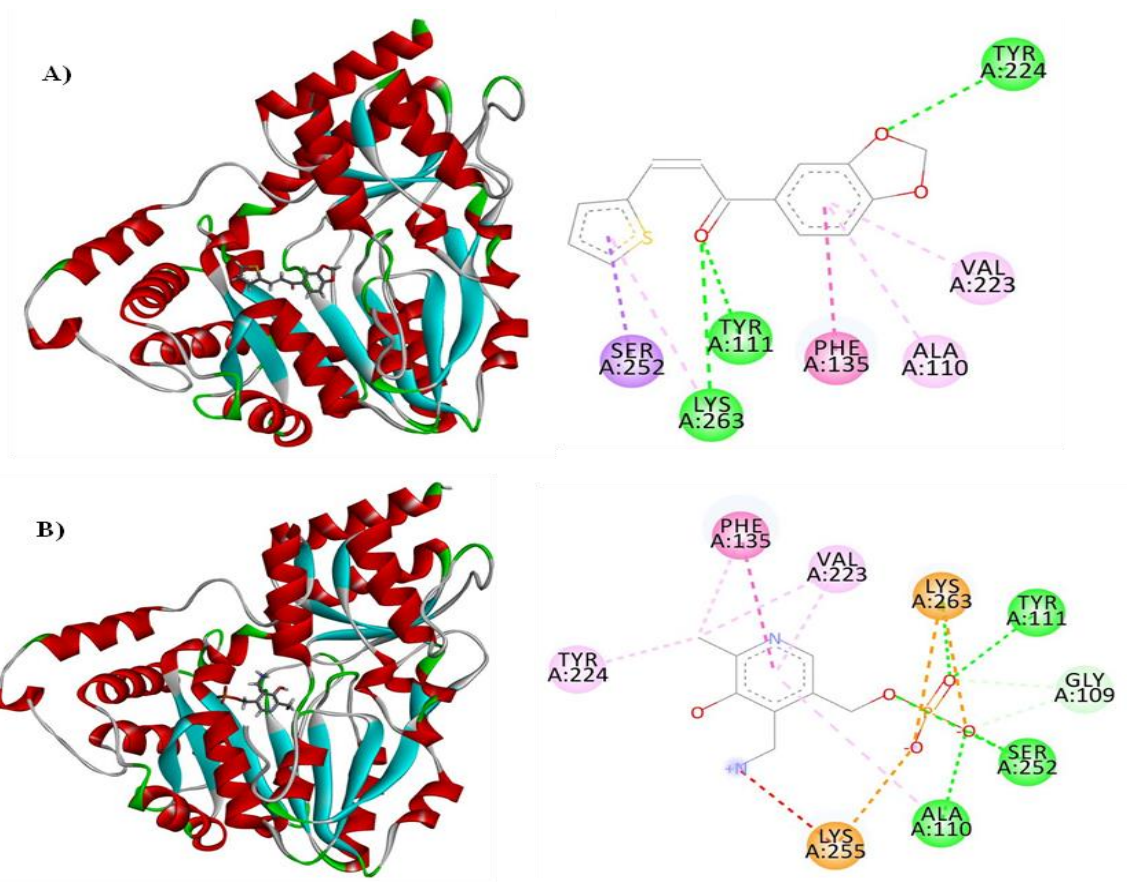


Legenda: Elaborado pelo autor (2024); A) Chalcona Heterocíclica; B) o ligante co-cristalizado Ácido Palmítico; A e B) Proteína Transportadora de Esteróis-2 (PDB: 1PZ4). As ligações de hidrogênio são destacadas em verde, as interações estéricas são destacadas em laranja e as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa; Resíduos: Leu (Leucina), Ile (Isoleucina), Phe (Fenilalanina), Arg (Arginina), Val (Valina), Gly (Glicina) e Gln (Glutamina).

A Figura 27 demonstra a interação do composto CH (FER 39), o ligante PDB e o alvo QTA (PDB: 1YIY). Foram observadas interações do tipo ligação de hidrogênio (linha tracejada em verde), interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em lilás e em rosa) e interações estéricas (linhas tracejadas em laranja e em vermelho). Para o composto CH (FER 39) as interações do tipo ligação de hidrogênio foram observadas nos átomos de oxigênio dos grupos cíclicos, como também nos átomos de oxigênio dos grupos carbonila por meio dos resíduos Tyr 224 (1 interação), Tyr 111 (1 interação) e Lys 263 (1 interação). Já as interações hidrofóbicas foram observadas nos anéis aromáticos por meio dos resíduos Val 223 (1 interação), Ala 110 (1 interação), Phe 135 (1 interação), Lys 263 (1 interação) e Ser 252 (1 interação).

Figura 27: Interações 2D e 3D entre o composto teste chalcona heterocíclica, o ligante co-cristalizado 4'-deoxi-

4'-aminopiridoxal-5'-fosfato, e a proteína quinurenina aminotransferase.



Legenda: A) Chalcona Heterocíclica; B) o ligante co-cristalizado 4'-deoxi-4'-aminopiridoxal-5'-fosfato; A e B) Proteína Quinurenina Aminotransferase (PDB: 1YIY). As ligações de hidrogênio são destacadas em verde, as interações estéricas são destacadas em laranja e em vermelho e as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa e em lilás; Resíduos: Ser (Serina), Lys (Lisina), Tyr (Tirosina), Phe (Fenilalanina), Ala (Alanina), Val (Valina) e Gly (Glicina).

Com relação ao ligante PDB foram observadas interações do tipo ligação de hidrogênio com os átomos de oxigênio do grupo fosfato por meio dos resíduos Tyr 111 (1 interação), Gly 109 (2 interações), Ser 252 (1 interação), Ala 110 (1 interação) e Lys 263 (1 interação). As interações hidrofóbicas foram observadas nos anéis aromáticos por meio dos resíduos Val 223 (2 interações), Phe 135 (2 interações) e Tyr 224 (1 interação). As ligações de hidrogênio foram destacadas por sua importância, pois, em termos de energia, são as interações mais significativas após as ligações covalentes nos sistemas biológicos. Além disso, as interações hidrofóbicas, embora individualmente fracas são resultantes da interação entre subunidades pouco polares, desempenhando um papel crucial nas ligações entre átomos (Guerra, 2019; Oliveira; Araújo, 2012; Barreiro; Fraga, 2001).

Em um estudo conduzido por Maciel *et al.* (2021), foi evidenciado a síntese de novos propanoatos de sódio 4-[3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il] e sua avaliação inibitória *in silico* frente

a QAT. Além disso, foram realizadas simulações de *docking* para os derivados da 4-[3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il] de sódio previamente sintetizados. A grande parte dos derivados de 1,2,4-oxadiazol demonstraram ligações semelhantes a QAT, quando comparado ao ligante co-cristalizado. Estes compostos se ancoram ao resíduo Arg 356 e posicionam o anel aromático e seus substituintes na entrada do sítio ativo da proteína, não indicando semelhança aos resíduos observados no presente estudo. Já o estudo de SÁ *et al.*, (2023) relata uma potente atividade larvicida *in silico* de chalconas contra *Ae. aegypti*, anteriormente extraídas por uma triagem virtual por cálculos de *docking* molecular na proteína 3-hidroxiquinurenina transaminase (PDB ID: 6MFB), que está envolvida no crescimento das larvas. Estruturalmente, os compostos melhor classificados para a proteína 3-hidroxiquinurenina transaminase foram os 3'-metoxi-3,4-dihidroxicalcona; 3,5-bis-(aminometil)-6-(4-metoxifenoxi)-piridin-2-amina; e (2E)-1-(2,4-dihidroxi-6-metoxifenil)-3- fenilprop-2-en-1-ona.

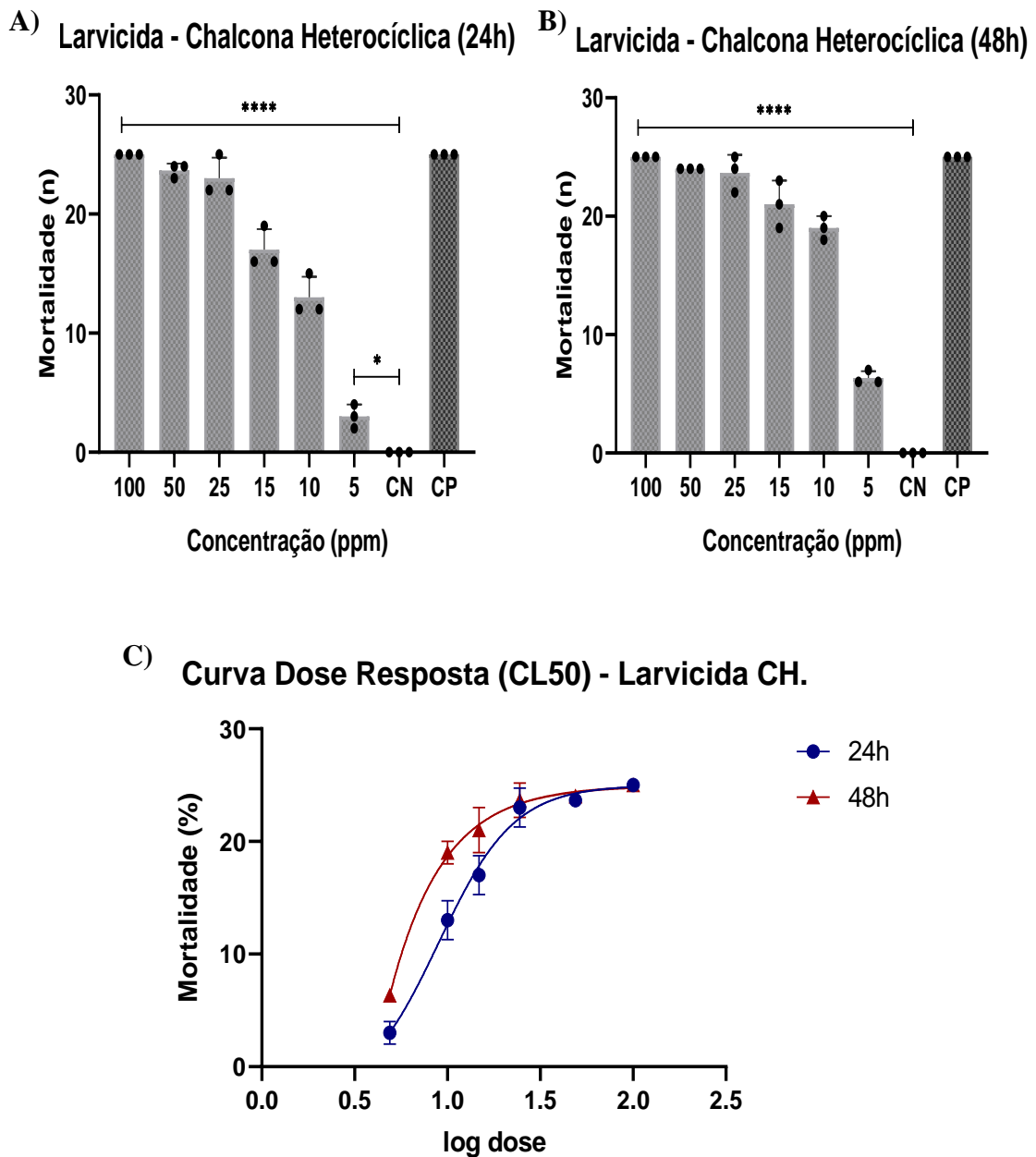
5.2 Avaliação sob os ensaios da atividade larvicida

Nos gráficos 1A-1B-1C são demonstrados os dados decorrentes da atividade larvicida em exposição a CH. De acordo com os parâmetros estabelecidos, foram utilizadas concentrações que variaram de 5 a 100 ppm, sendo a concentração de 100 ppm ($p < 0,0001$), a menor capaz de evidenciar maior mortalidade frente a fase de desenvolvimento larval no período de 24 e 48 horas de exposição. As concentrações de 100 ($p < 0,0001$), 50 ($p < 0,0001$), 25 ($p < 0,0001$), 15 ($p < 0,0001$), 10 ($p < 0,0001$) e 5 ppm ($p = 0,0273$ [24 horas] e $p < 0,0001$ [48 horas]) apresentaram maior significância estatística nos períodos de exposição estabelecidos, quando comparada ao controle negativo. No período de 48 horas de exposição da CH, observamos um incremento de 65% na mortalidade frente ao *Ae. Aegypti* diante de todas as concentrações em porcentagem somadas. Como podemos observar nos gráficos 1A-1B-1C, a CH apresentou uma atividade promissora mesmo em concentrações baixas, com valores de CL_{50} de 10,04 ppm (R^2 [R quadrado] = 0,9740) em 24 horas, e 6,84 ppm ($R^2 = 0,9707$) em 48 horas de exposição.

Um estudo designado por Lee *et al.* (2018) retratou a utilizações de chalconas que possuíam atividade como antagonistas hormonais juvenis (JHANS) frente a larvas de *Ae. albopictus*. Com concentrações estabelecidas por 5 ppm em cada composto, a 20-hidroxicalcona e a cardamonina apresentaram uma alta atividade larvicida. As chalconas utilizadas neste estudo demonstraram maior atividade larvicida com mortalidades entre 50 a 80%. Já no estudo de Kuttithodi *et al.* (2022) foi avaliado seis bis-chalconas sintéticas que eram diferentes em termos de núcleos aromáticos, grupo funcional e posição de substituições. Os

resultados indicaram uma forte propriedade antioxidante e propriedades de redução férrica. Além de suas propriedades antioxidantes, também foi observado que as bis-chalconas exibiram propriedades larvicidas. A propriedade larvicida das bis-chalconas sintéticas revelaram atividade mais evidente frente ao composto 1 ($45,27 \pm 2,34 \mu\text{g/mL}$), composto 2 ($59,81 \pm 2,09 \mu\text{g/mL}$) e composto 4 ($56,46 \pm 3,07 \mu\text{g/mL}$).

Gráfico 1: Atividade larvicida da chalcona heterocíclica em *Ae. aegypti* após 24 e 48 horas de exposição.



Legenda: Chalcona Heterocíclica (CH); concentrações de (5-100 ppm); A) atividade larvicida no período de 24 horas; B) atividade larvicida no período de 48 horas; C) CL₅₀ no período de 24 e 48 horas; CN = controle negativo;

CP = controle positivo; * ($p < 0,05$) e **** ($p < 0,0001$) resultados que diferem significativamente do controle negativo.

Os gráficos 2A-2B-2C apresentam os dados dos ensaios decorrentes da atividade larvicida em exposição a CF. Diferente dos parâmetros vistos com a CH, foram utilizadas concentrações que variaram de 2,5 a 100 ppm, sendo a concentração de 100 ppm ($p < 0,0001$), a maior capaz de demonstrar mortalidade frente a fase de desenvolvimento larval no período de 24 e 48 horas de exposição. As concentrações de 100 ($p < 0,0001$), 50 ($p < 0,0001$), 25 ($p < 0,0001$), 15 ($p < 0,0001$) e 10 ppm ($p = 0,003$) apresentaram significância estatística no período de 24 horas, enquanto que nas concentrações de 5 ($p < 0,0001$) e 2,5 ppm ($p = 0,013$) apresentaram maior significância no período de 48 horas de exposição, quando comparada ao controle negativo.

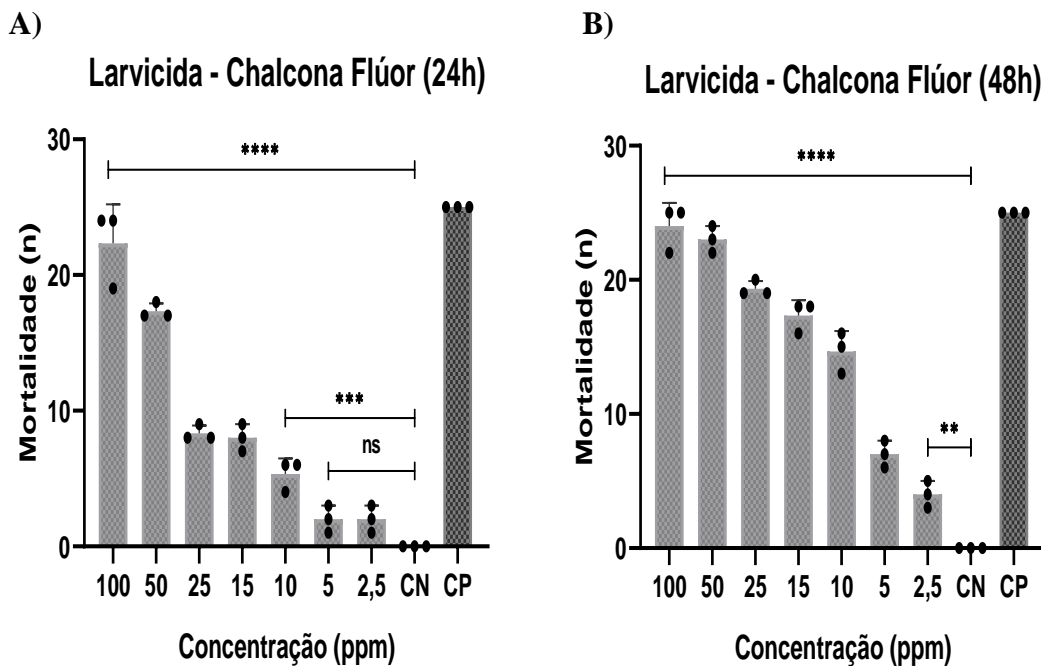
No período de 48 horas de exposição da CF, observamos um incremento na mortalidade ainda maior quando comparado com a CH evidenciada nos gráficos 1A-1B-1C. Como podemos observar nos gráficos 2A-2B-2C, a CF demonstrou uma atividade efetiva mesmo em concentrações baixas, com um aumento bastante significativo da mortalidade nas larvas de *Ae. aegypti* quando observado o período de 48 horas, com valores de CL_{50} de 42,01 ppm ($R^2 = 0,9150$) em 24 horas, e 8,46 ppm ($R^2 = 0,9747$) em 48 horas.

Em um estudo designado por Begum *et al.* (2011), uma série de análogos de chalcona e alguns de seus derivados foram sintetizados por métodos de substituição nos anéis aromáticos, conjugação da cetona α , β -insaturada e bloqueio da cetona α , β -insaturada da chalcona por derivatização, sendo submetidos posteriormente a bioensaios frente as larvas (L3) de *Culex quinquefasciatus*. Um total de 28 compostos (chalconas juntamente com alguns dos produtos derivados) foram sintetizados. Os resultados demonstraram que os análogos de chalcona possuem uma potente atividade larvicida em concentrações de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, após um período de 24 horas de exposição, com diferentes variações na porcentagem de mortalidade. A grande parte das hidroxí-chalconas apresentaram toxicidade frente as larvas de terceiro ínstar de *Culex quinquefasciatus*.

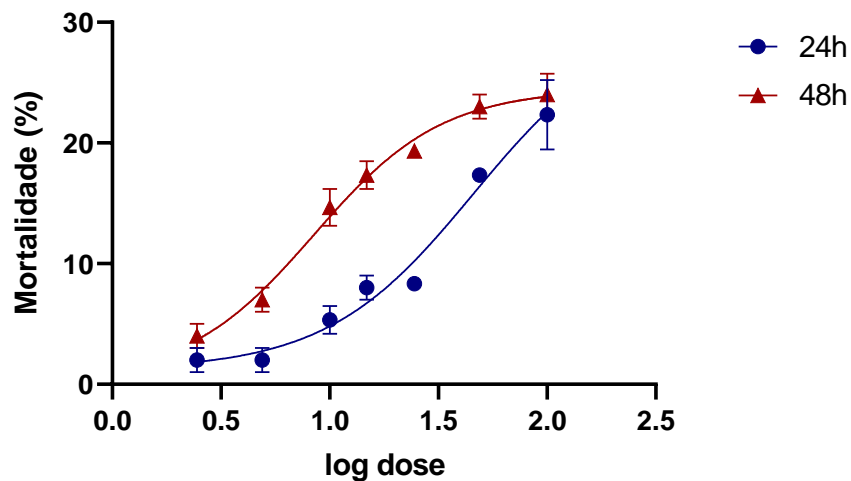
Já no estudo de Satyavani *et al.* (2015), uma série de furanoflavonoides análogos à karanjina foram sintetizados a partir da resacetofenona. Esses compostos foram condensados com aldeídos arílicos substituídos para produzir furanochalconas. Os compostos sintetizados foram testados quanto à atividade larvicida frente ao *Culex quinquefasciatus* em larvas no quarto instar (L4). A atividade foi expressa com CL_{50} e CL_{90} representando a concentração em ppm necessária para matar 50 e 90% da população larval. Os resultados demonstraram que as

furanochalconas angulares sem substituintes correspondentes foram as mais tóxicas, superando a karanjina. As furanochalconas angulares exibiram maior atividade do que suas contrapartes lineares e, em muitos casos, foram mais tóxicas que as furanoflavonoides, apresentando variação na CL_{50} e CL_{90} de 1.3 – 809.4 ppm. Porém, só dois compostos apresentaram significância estatística (6A e 6B) $p = 0,0224$ quando comparado ao controle negativo.

Gráfico 2: Atividade larvicida da chalcona flúor contra *Ae. aegypti* após 24 e 48 horas de exposição.



C) Curva Dose Resposta (CL_{50}) - Larvicida CF.



Legenda: Chalcona Flúor (CF); concentrações de (2,5-100 ppm); A) atividade larvicida no período de 24 horas; B) atividade larvicida no período de 48 horas; C) CL₅₀ no período de 24 e 48 horas; CN = controle negativo; CP = controle positivo; ** (p<0,005), *** (p<0,0005), **** (p<0,0001) resultados que diferem significativamente do controle negativo; ns = sem significância estatística.

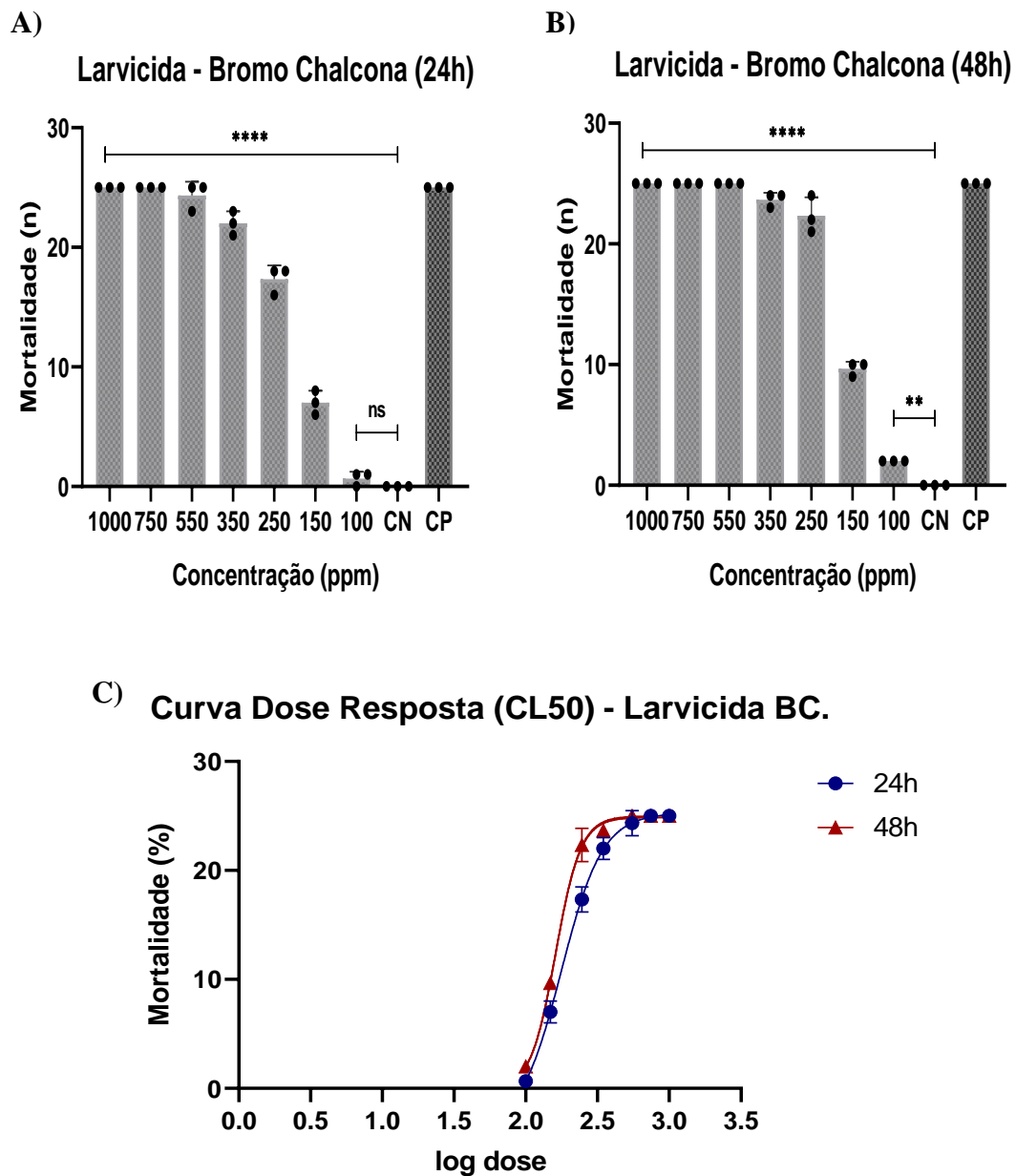
Já nos gráficos 3A-3B-3C, estabelecem os dados dos ensaios da atividade larvicida em exposição a BC. Diferente da CH (Gráfico 1A-1B) e CF (Gráfico 2A-2B), foram utilizadas concentrações mais altas do composto, pois em concentrações baixas, não se observou mortalidade significativa. As concentrações variaram de 100 a 1000 ppm, sendo a concentração de 550 ppm (p<0,0001), a menor capaz de demonstrar maior mortalidade frente a fase de desenvolvimento larval no período de 24 e 48 horas de exposição. As concentrações de 1000 (p<0,0001), 750 (p<0,0001), 550 (p<0,0001), 350 (p<0,0001), 250 ppm (p<0,0001) e 150 ppm (p<0,0001), apresentaram significância estatística no período de 24 horas, enquanto que a concentração de 100 ppm (p=0,0032) apresentou maior significância no período de 48 horas de exposição, quando comparada ao controle negativo. Semelhante a CH (Gráfico 1A-1B) e CF (Gráfico 2A-2B), a BC promoveu maior mortalidade no período de 48 horas, demonstrando uma atividade significativa em concentrações mais altas quando comparada as chalconas destacadas anteriormente. Com valores de CL₅₀ de 195,6 ppm (R² = 0,9908) em 24 horas, e uma diminuição para 161,8 ppm (R² = 0,9951) em 48 horas.

Um estudo de Firmino *et al.* (2022) visando obter um molécula sintética derivada da chalcona que possuísse uma alta atividade larvicida, projetou, sintetizou e caracterizou extensivamente um derivado da BC para avaliação de sua atividade biológica frente ao *Ae. aegypti*. De acordo com os resultados, o derivado da BC foi eficaz frente as larvas do terceiro ínstar (L3), apresentando CL₅₀ (48h) = 46 mg/L⁻¹. Além disso, os resultados demonstraram que, mesmo com a letalidade diante das larvas de *Ae. aegypti*, houve um desenvolvimento anormal da espécie quando expostas as concentrações abaixo de 20 mg/L⁻¹. Embora não haja letalidade nessas concentrações, as larvas expostas ao derivado da BC por um período de 48 horas, apresentaram redução gradual em sua mobilidade e letargia em comparação ao grupo controle.

No estudo conduzido por Kalirajan *et al.* (2015) com derivados da BC, demonstrou uma maior atividade larvicida frente a *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles stephensi*. Uma série de novas 9-anilinoacridinas substituídas por chalcona e isoxazol foram sintetizadas a partir de 9-cloroacridina pelo método de irradiação por micro-ondas. Os compostos demonstraram atividade larvicida com valores de CL₅₀ de 22,91- 64,8 ppm em larvas (L3) em *Culex quinquefasciatus*, e boa atividade larvicida em larvas (L3) com valores de CL₅₀ de 22,42- 64,81 ppm no vetor da malária *Anopheles stephensi*. O *Culex quinquefasciatus* pertence à mesma ordem e família do

mosquito *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae), ambos são responsáveis por transmitir doenças através de suas fêmeas hematófagas, que afetam de forma preocupante a saúde pública de países tropicais e subtropicais (Bergmann *et al.*, 2024). Os dados se mostram semelhantes aos descritos nesta pesquisa, mesmo com diferentes compostos. Isso valida os resultados obtidos e reforça a compreensão do objetivo estabelecido.

Gráfico 3: Atividade larvicida da bromo chalcona contra *Ae. aegypti* após 24 e 48 horas de exposição.



Legenda: Bromo Chalcona (BC); concentrações de (100-1000 ppm); A) atividade larvicida no período de 24 horas; B) atividade larvicida no período de 48 horas; C) CL₅₀ no período de 24 e 48 horas; CN = controle negativo, CP = controle positivo; ** (p<0,005), **** (p<0,0001) resultados que diferem significativamente do controle negativo; ns = sem significância estatística.

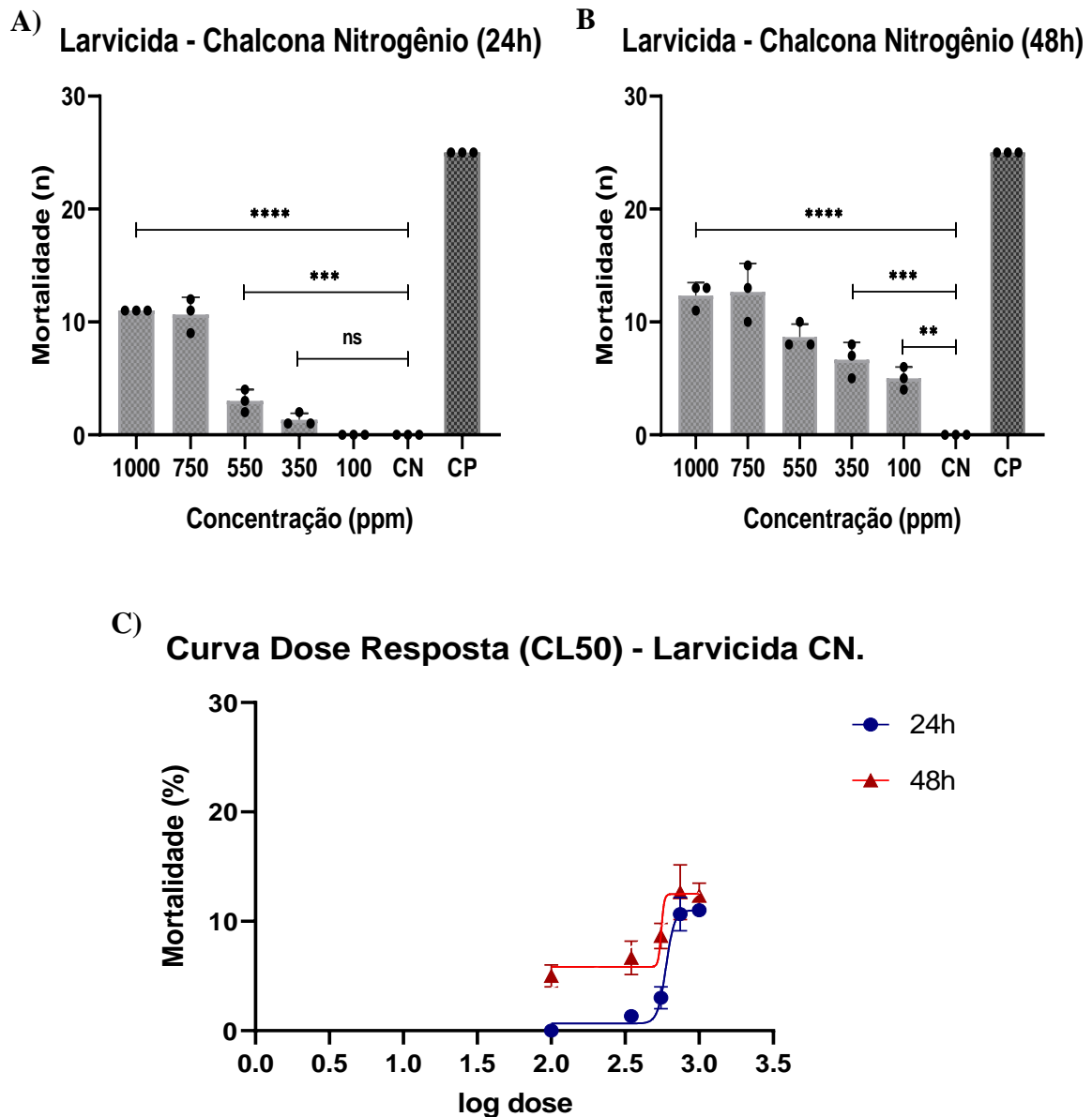
Os gráficos 4A-4B-4C diz em respeito a atividade larvicida em exposição a CN. Ao observar os dados estabelecidos, diferente da CH (Gráfico 1A-1B), CF (Gráfico 2A-2B) e BC (Gráfico 3A-3B), não foi observado uma mortalidade elevada referente a fase larval. Utilizou-se de concentrações mais altas do composto, visto que, em concentrações mais baixas não foram evidenciadas uma mortalidade significante durante os ensaios designados. As concentrações variaram de 100 a 1000 ppm, sendo a concentração de 550 ppm (p<0,0001), a menor capaz de demonstrar maior mortalidade no período de 48 horas de exposição. Concentrações de 1000 (p<0,0001), 750 (p<0,0001), e 550 (p=0,0009), apresentaram significância estatística no período de 24 horas, enquanto que as concentrações 350 (p=0,0002), e 100 ppm (p=0,002) apresentaram maior significância no período de 48 horas, quando comparada ao controle negativo. Semelhante a CH (Gráfico 1A-1B), CF (Gráfico 2A-2B) e BC (Gráfico 3A-3B), a CN apresentou um aumento na mortalidade das larvas no período de 48 horas de exposição, com valores de CL₅₀ de 595,6 ppm (R² = 0,9705) em 24 horas, e uma diminuição da CL₅₀ para 553,4 ppm (R² = 0,8220) em 48 horas.

O estudo conduzido Targanski *et al.* (2020), em uma análise sobre a atividade larvicida mediada por tipos diferentes de chalconas. Observou-se que as mesmas dependiam da posição, tipo, e propriedades físico-químicas de substituintes nos seus anéis aromáticos. Em contraste, chalconas que tiveram como substituição os seguintes grupos: Br (Bromo) e F (Flúor), tiveram maior mortalidade frente ao vetor, mesmo em concentrações baixas. Com valores de CL₅₀ de 24,02 µmol/L⁻¹ (Br) e 42,06 µmol/L⁻¹ (F) respectivamente, em um período de 24 horas de exposição. Utilizando larvas no estágio de desenvolvimento L3, e para o controle negativo, dimetilsulfóxido (1,5%) (DMSO), e água destilada. Já Sá *et al.* (2023) investigou a atividade de quatro tipos diferentes de chalconas, sendo duas delas com Br, e F. Utilizando concentrações baixas, que variaram de 0,1 a 20 ppm, e utilizando para o controle negativo, DMSO e água destilada. As duas apresentaram quase nenhuma atividade frente as larvas de *Ae. Aegypti* no estágio de desenvolvimento L4.

Retratando que apesar do bom perfil de atividade e afinidade *in silico*, a dificuldade de solubilização em meio aquoso dessas substâncias é um fator importante, sendo um provável motivo para a atividade inerte evidenciada frente as larvas. Os estudos destacam a variabilidade na eficácia das chalconas como agentes larvicidas, dependendo das suas estruturas químicas e

das propriedades físico-químicas dos substituintes. Enquanto alguns compostos mostraram alta eficácia em baixas concentrações, outros tiveram desempenho limitado devido a problemas de solubilidade.

Gráfico 4: Atividade larvicida da chalcona nitrogênio sobre *Ae. aegypti* após 24 e 48 horas de exposição.



Legenda: Chalcona Nitrogênio (CN); concentrações de (100-1000 ppm); A) atividade larvicida no período de 24 horas; B) atividade larvicida no período de 48 horas; C) CL₅₀ no período de 24 e 48 horas; CN = controle negativo; CP = controle positivo; ** (p<0,005), *** (p<0,0005), **** (p<0,0001) resultados que diferem significativamente do controle negativo; ns = sem significância estatística.

Diante dos dados expostos, podemos observar que a medida em que ocorre um aumento

da exposição aos compostos designados no estudo, há um aumento substancial na mortalidade em larvas do mosquito. Esse fenômeno pode ser atribuído a um possível mecanismo de ação envolvendo a ligação frente a PTE2 e QTA evidenciada na análise *in silico* diante das chalconas. A PTE2 é uma proteína transportadora intracelular de lipídios não específica, altamente expressa no intestino médio de *Ae. aegypti*. Sua função principal é o transporte de lipídios, facilitando sua degradação por vias metabólicas alternativas para a geração de ATP. A PTE2 desempenha um papel essencial no transporte e metabolismo dos ácidos graxos (AG) dentro das mitocôndrias e peroxissomos. Através da β -oxidação e do ciclo do ácido cítrico, os AG são catabolizados em Acetil-CoA, resultando na produção de NADH e FADH₂. Esses cofatores reduzem a cadeia transportadora de elétrons, promovendo a transferência de elétrons e subsequente síntese de ATP. A redução da expressão da PTE2 em larvas L4 resulta em uma diminuição no nível de captação de colesterol, maior mortalidade, e uma redução na fecundidade (Radek; Dyer; Lan, 2010; Blitzer; Vyazunova; Lan, 2005). Em um estudo de Kim e Lan (2010), observaram genes (MsPTE-2-x/PTE-2) da PTE2 em *Manduca sexta*, em diferentes contextos. Os perfis de transcrição de MsSCP-2 em diferentes tecidos e estágios foram determinados por RT-PCR semi-quantitativo. O nível de mRNA do MsSCP-2 foi significativamente maior no intestino médio e no corpo gorduroso na alimentação de larvas. MsSCP-2 foi fortemente expresso em todos os estágios larvais avaliados.

Na alimentação por matéria orgânica pelas larvas, é possível encontrar a presença do aminoácido triptofano. No seu metabolismo, a QTA atua na catalisação da transaminação de 3-HK (composto altamente tóxico ao SNC em mosquitos) em XA, bastante essencial para as funções metabólicas e fisiológicas em *Ae. aegypti*. Se ocorrer uma interferência na via das quinureninas, frente a QTA, será observado uma concentração específica de 3-HK, ocasionando danos neuronais e possível morte ao organismo (Maciel *et al.*, 2023; Han *et al.*, 2008). A interferência das chalconas nesses processos pode justificar o aumento da mortalidade nos organismos expostos a essas substâncias. Um aumento no consumo de lipídeos e triptofano em matéria orgânica pode estar correlacionado com essa maior interferência, possivelmente modulando a atividade metabólica e dificultando a função biológica das proteínas envolvidas. Em um estudo conduzido por Li e Guoyu (1997), baixas concentrações de XA foram detectadas em larvas recém-eclodidas de *Ae. aegypti*, sendo observado um acúmulo progressivo desse composto em larvas de 1 a 5 dias de idade. O XA atingiu seu nível mais alto em larvas de 5 dias, e sua concentração diminuiu posteriormente. A quantidade total de XA em larvas de 4 e 5 dias foi aproximadamente 1,2 a 1,5 vezes maior do que em larvas de 3 dias, considerando-se a base de uma única larva, devido ao fato de que as larvas de 4 e 5 dias eram significativamente

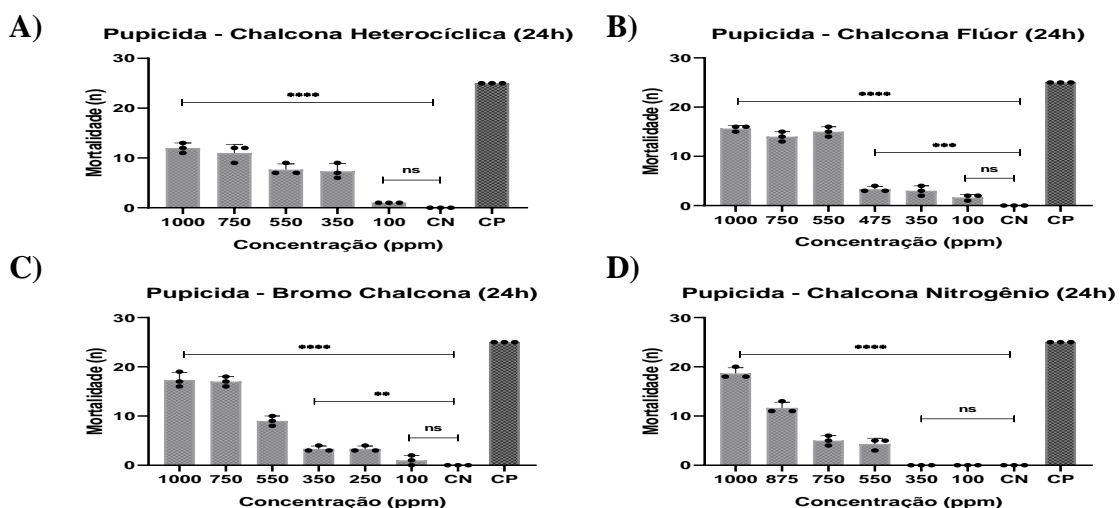
maiores que as de 3 dias.

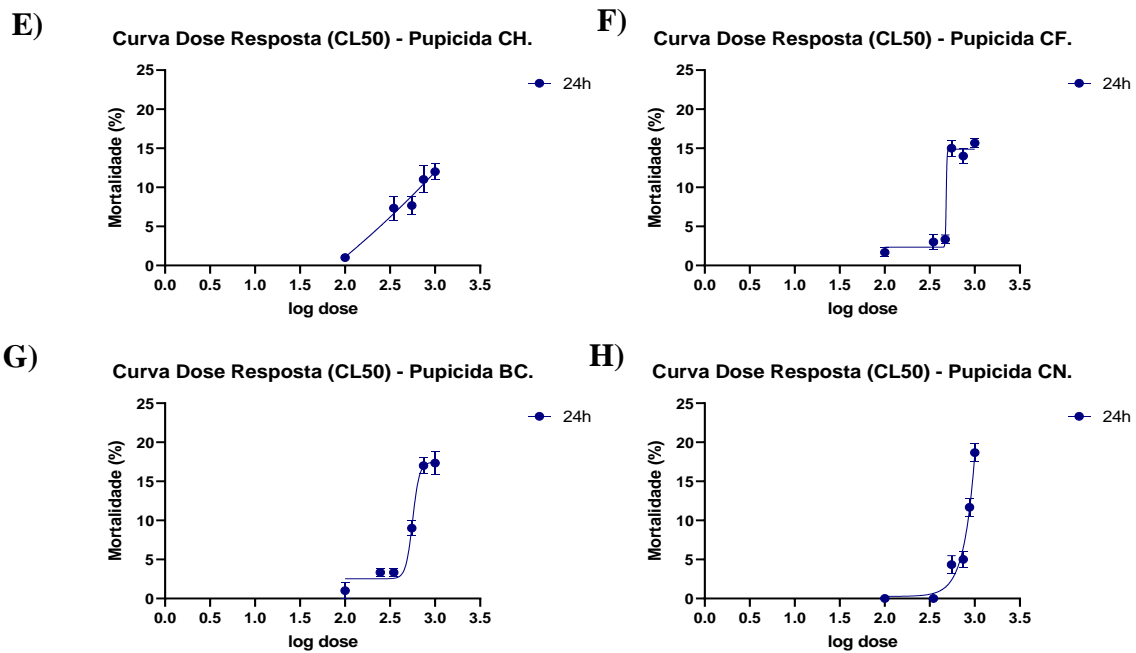
5.3 Avaliação sobre os ensaios da atividade pupicida

Nos gráficos 5A-5B-5C-5D, observamos a atividade dos quatro tipos de chalconas referentes a exposição sobre a fase de desenvolvimento de pupa. Diferente da fase larval, conforme destacado nos gráficos 1, 2, 3 e 4, a fase de pupa apresenta características distintas, como a formação de um exoesqueleto de quitina que, embora presente também nas larvas e adultos, assume um papel específico durante a metamorfose ao fornecer suporte estrutural e proteção adicional aos artrópodes nesta fase de desenvolvimento. Durante essa fase de desenvolvimento, não ocorre o processo de alimentação, e o exoesqueleto de quitina permite um melhor desempenho sobre o crescimento, e reorganização metabólica, mas também se mostra flexível e resistente o suficiente para proteger o inseto. Uma vez completa esta fase, o mosquito adulto emerge do exoesqueleto da pupa (Bar; Andrew, 2013; Consoli; Oliveira, 1994).

Ao observar os dados estabelecidos nos gráficos 5A-5B-5C-5D, foram utilizadas concentrações mais altas, pois em concentrações baixas, não se observou uma mortalidade significativa sobre as pupas. As concentrações variaram de 100 a 1000 ppm, sendo a concentração de 1000 ppm ($p < 0,0001$) da CH (gráfico 5A), CF (gráfico 5B), BC (gráfico 5C) e CN (gráfico 5D) respectivamente, a maior capaz de demonstrar mortalidade frente a fase de desenvolvimento de pupa no período de 24 horas de exposição.

Gráfico 5: Atividade pupicida e CL₅₀ dos quatro tipos diferentes de chalconas sobre *Ae. aegypti* após 24 horas de exposição.





Legenda: A e B) Chalcona Heterocíclica (CH); C e D) Chalcona Flúor (CF); E e F) Bromo Chalcona (BC); G e H) Chalcona Nitrogênio (CN); concentrações de (100-1000 ppm); CL₅₀ no período de 24 e 48 horas (E, F, G e H); CN = controle negativo; CP = controle positivo; ** (p<0,005), *** (p<0,0005), **** (p<0,0001) resultados que diferem significativamente do controle negativo; ns = sem significância estatística.

As concentrações de 1000 (p<0,0001), 750 (p<0,0001), 550 (p<0,0001), e 350 (p<0,0001) da CH (gráfico 5A), apresentaram significância estatística no período de 24 horas, enquanto que a concentração de 100 ppm (p=0,7116) não apresentou significância no mesmo período de exposição estabelecido, quando comparada ao controle negativo, com valores de CL₅₀ de 433,9 ppm (R² = 0,8962) em 24 horas de exposição. Já com a CF (gráfico 5B), observou-se uma maior mortalidade nas concentrações de 1000 (p<0,0001), 750 (p<0,0001), 550 (p<0,0001), 475 (p=0,002), e 350 (p=0,005) quando comparada a CH (gráfico 5A), e significância estatística quando comparada ao controle negativo. Sendo a concentração de 100 ppm (p=0,0537) a que não demonstrou significância no bioensaio designado. Estabelecendo uma CL₅₀ de 480,2 ppm (R² = 0,9784) em 24 horas. A BC (gráfico 5C) apresentou maior mortalidade na fase de desenvolvimento de pupa, quando comparada com a CH (gráfico 5A) e CF (gráfico 5B) descritas anteriormente. Sendo as concentrações de 1000 (p<0,0001), 750 (p<0,0001), 550 (p<0,0001), 350 (p=0,0014), e 250 ppm (p=0,0014) as que apresentaram significância estatística, quando comparada ao controle negativo. A concentração de 100 (p=0,5865) não demonstrou significância, com valores de CL₅₀ de 562,1 ppm (R² = 0,9713) no período de 24 horas.

Por fim, a CN (gráfico 5D) demonstrou ter uma maior atividade sobre a fase de desenvolvimento de pupa, quando comparada a CH (gráfico 5A), CF (gráfico 5B) e BC (gráfico 5C). Observou-se uma maior mortalidade, e significância estatística nas concentrações de 1000 ($p < 0,0001$), 875 ($p < 0,0001$), 750 ($p < 0,0001$), e 550 ($p < 0,0001$) respectivamente. Sendo a concentração de 1000 ppm ($p < 0,0001$) da CN (gráfico 5D), a capaz de demonstrar maior mortalidade no período de 24 horas de exposição. As concentrações de 350 e 100 ppm não apresentaram significância estatística. Com valores de CL_{50} de 893,7 ppm ($R^2 = 0,9482$) em 24 horas.

Diante dos dados expostos, podemos observar que a medida em que ocorre um aumento da concentração dos compostos designados no estudo, há um aumento substancial na mortalidade. Esse fenômeno pode sugerir um possível mecanismo de ação envolvendo a PTE2 e a QTA, como evidenciados anteriormente na atividade larvicida e na análise *in silico*. Em um estudo de Kim e Lan (2010), observaram genes (MsPTE-2-x/PTE-2) da PTE2 em *Manduca sexta*. Como citado anteriormente, MsSCP-2 foi fortemente expresso em todos os estágios larvais avaliados, porém houve uma diminuição em sua expressão frente aos estágios de pupa. No estudo de Li e Guoyu (1997), como descrito anteriormente, foram evidenciados baixos níveis de XA em estágios de pupa em *Ae. aegypti*. O XA é um metabólito do triptofano, e a L-quinurenina e a QAT são os principais intermediários para a produção de XA. A concentração de triptofano em larvas e pupas varia durante o desenvolvimento, mas em termos gerais é observado mais triptofano livre em pupas do que em larvas.

As larvas se alimentam de matéria orgânica, como descrito nos protocolos de criação e manutenção das bandejas. As pupas, por sua vez, não se alimentam, dependem do metabolismo nutricional proveniente das fases anteriores, sendo atribuída para si uma possível diminuição na carga energética devido a sua restrição metabólica (Consoli; Oliveira, 1994). Além disso, por possuírem um exoesqueleto de quitina, que fornece suporte estrutural e proteção contra agentes externos (Bar; Andrew, 2013), é possível destacar uma possível diminuição da permeabilização das substâncias ao organismo alvo, mesmo estabelecendo concentrações mais elevadas, variando de 100 a 1000 ppm. A hipótese de interferência das chalconas nesse processo pode se dar, pela diminuição da carga metabólica energética frente as proteínas PTE2 e QTA. Diante de uma menor atividade biológica das mesmas, a interferência das chalconas seria de maior dificuldade, justificando o aumento da taxa de mortalidade quando expostas as substâncias em concentrações mais elevadas.

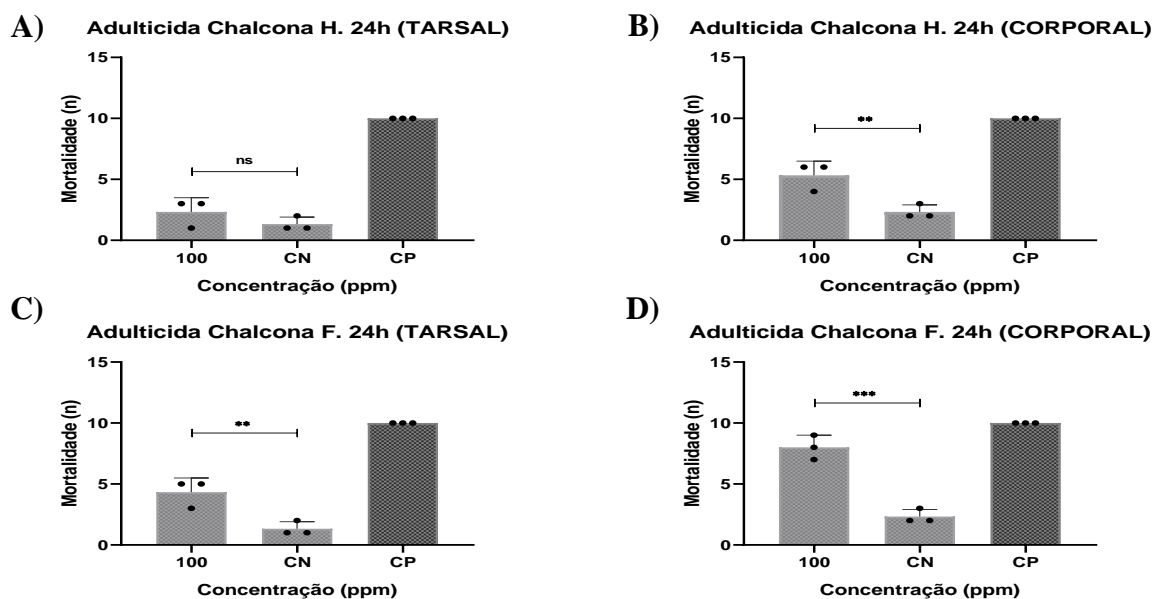
Devi *et al.* (2021), evidenciou taxas de mortalidade frente a utilização de chalconas bis-monosubstituídas (100 $\mu\text{g/mL}$) frente as larvas e pupas de *Spodoptera frugiperda*, mais

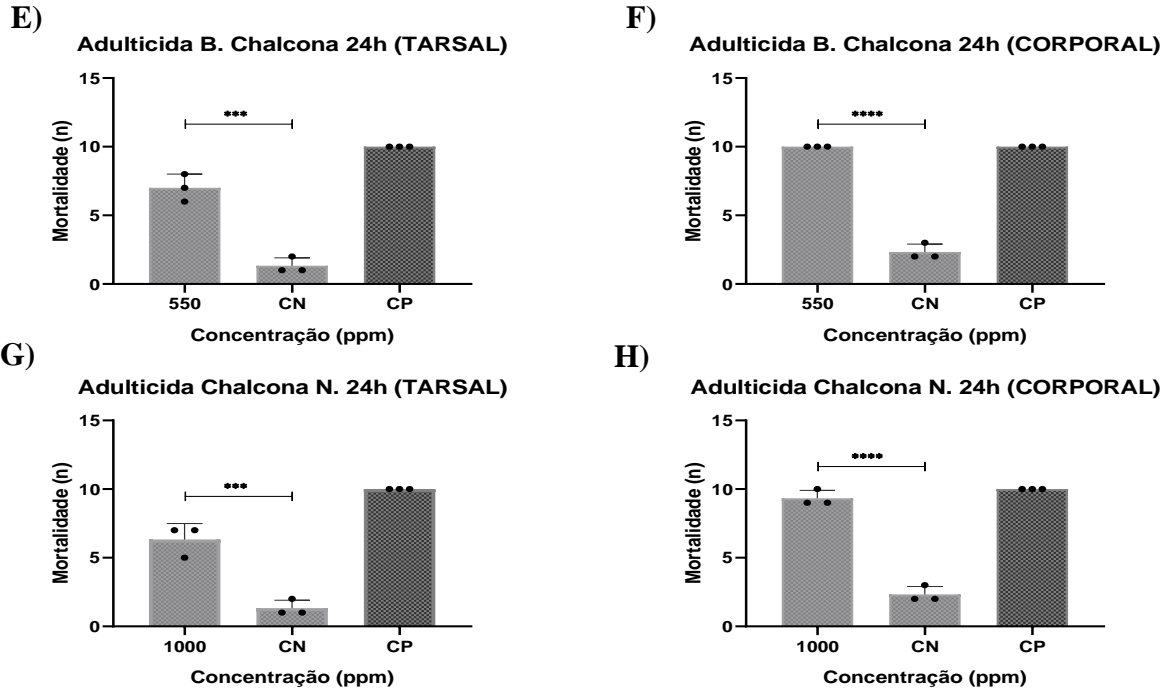
conhecida como ‘largata-do-cartuxo’. Observou-se um maior impacto na mortalidade de larvas, e pupas (20% de mortalidade) e má formação em adultos, proporcionando efeitos anti-alimentares nas larvas deste organismo. Já Hidalgo *et al.* (2020), também retrata da utilização de chalconas bis-monossubstituídas (100 µg/mL) sobre as fases de desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda*. Os resultados obtidos nos testes de atividade para cada uma das chalconas sintéticas mostram que as monochalconas possuem efeito letal sobre os estágios de pupa de *Spodoptera frugiperda*. Os adultos que sobrevivem apresentaram malformações e diminuição do tamanho, o que os levou à morte antes da postura dos ovos. As chalconas bis-monossubstituídas demonstraram ser eficazes em causar mortalidade e malformações em diferentes fases de desenvolvimento da *Spodoptera frugiperda*, comprometendo tanto a sobrevivência quanto a capacidade reprodutiva dos insetos. Os dados descritos corroboram com os achados dos estudos de Devi *et al.* (2021) e Hidalgo *et al.* (2020) indicando que chalconas têm impacto significativo sobre diferentes espécies, quando utilizadas em concentrações adequadas. As diferenças nas concentrações e valores de CL₅₀ destacam variações na eficácia dos compostos e reforçam a importância no ajuste de doses para obter os melhores resultados.

5.4 Avaliação sobre os ensaios da atividade aduítica

Os gráficos 6A,B,C,D,E,F,G,H retratam os dados dos ensaios da atividade sobre a fase de desenvolvimento dos mosquitos adultos expostos as chalconas designadas no estudo.

Gráfico 6: Atividade aduítica dos quatro tipos diferentes de chalconas sobre *Ae. aegypti* após 24 horas de exposição.





Legenda: A e B) Chalcona Heterocíclica (CH); C E D) Chalcona Flúor (CF); E e F) Bromo Chalcona (BC); G e H) Chalcona Nitrogênio (CN); A, C, E e F (contato tarsal); B, D, F e H (contato corporal); concentrações de (100, 550 e 1000 ppm); CN = controle negativo; CP = controle positivo; ** ($p < 0,005$), *** ($p < 0,0005$), **** ($p < 0,0001$) resultados que diferem significativamente do controle negativo; ns = sem significância estatística.

Ao observar os dados estabelecidos nos gráficos 6A-6B-6C-6D-6E-6F-6G-6H, foram utilizados de concentrações fixas, aquelas com menor concentração que foram capaz de ocasionar maior mortalidade frente as larvas de *Ae. Aegypti*. As concentrações variaram de 100 a 1000 ppm. Para a CH (Gráficos 6A-6B), foi estabelecido a concentração de 100 ppm ($p=0,3000$ [tarsal] e $p=0,0063$ [corporal]) em ambos os testes, sendo evidenciado significância estatística só no teste de contato corporal, quando comparado ao grupo controle negativo.

Ao observar a atividade de exposição sobre a CF (Gráficos 6C-6D), diferente da CH (Gráficos 6A-6B), houve maior mortalidade, e significância estatística em ambos os testes com a concentração de 100 ppm ($p=0,0063$ [tarsal] e $p=0,0001$ [corporal]) quando comparado ao controle negativo. Já a BC (Gráficos 6E-6F) e CN (Gráficos 6G-6H), também apresentaram um maior aumento da mortalidade em ambos os testes na concentração de 550 ppm ($p=0,0001$ [tarsal] e $p < 0,0001$ [corporal]) da BC, e 1000 ppm ($p=0,0004$ [tarsal] e $p < 0,0001$ [corporal]) da CN (Gráficos 6G-6H), quando comparado a CH (Gráficos 6A-6B) e CF (Gráficos 6C-6D), sendo a concentração de 1000 ppm no teste de contato corporal com a CN (Gráficos 6G-6H), que causou 100% de mortalidade dos mosquitos adultos. Evidenciando assim, significância

estatística em ambos os testes com a BC (Gráficos 6E-6F) e CN (Gráficos 6G-6H), quando comparados com o controle negativo.

Sinjari *et al.* (2019) observou a atividade aduicida de 2-hidroxi chalconas sobre a porcentagem de mortalidade em adultos de *Tribolium confusum* (besouro-da-farinha). Foram utilizados 10 adultos, e a mortalidade avaliada no período de 24 horas de exposição. Estabelecendo concentrações de 0,01, 0,02 e 0,04 ppm. Para controle negativo, foi utilizado 5µL de etanol 50%. Evidenciou mortalidade, e significância estatística ($p < 0,05$) em todas as 3 concentrações testadas frente ao *T. Confusum*, quando comparado com o grupo controle negativo. Com valores de CL_{50} de 0,07 ppm no composto 1 e 0,10 ppm no composto 2, no período de 24 horas.

Já o estudo de Gross *et al.* (2017) utilizou-se de uma triagem de 31 análogos de chalcona com o intuito de analisar a toxicidade sob a alimentação oral dessas chalconas, frente a adultos de *Drosophila melanogaster* (1mg/mL) e estudos de sinergismo, que foram realizados aplicando topicamente os análogos de chalconas sob os mosquitos adultos (fêmeas) de *Ae. aegypti* (2µL). Examinando seu impacto de maneira isolada, e/ou sinérgica com o carbaril (500ng por mosquito), um agente inseticida bastante utilizado para o controle de pragas. A toxicidade e mortalidade dos análogos da chalcona frente aos adultos de *Drosophila melanogaster* e *Ae. aegypti* foram avaliadas nos períodos de 1 e 24 horas. Quatorze análogos de chalconas tiveram valores de CL_{50} na faixa de 0,4 a 38 ppm contra larvas de *Ae. aegypti*, três chalconas apresentaram toxicidade contra *D. melanogaster* via alimentação (valores de CL_{50} variaram de 146 a 214 µg/ml), e duas chalconas apresentaram atividade sinérgica juntamente com o carbaril diante de adultos em *Ae. aegypti* ($p < 0,05$). Por fim, também foram evidenciados resultados sobre o comportamento anormal de voo de fêmeas de *Ae. aegypti* após aplicação tópica dos análogos, 3-(4-Dietilaminofenil)-1-(tiofen-2-il)prop-2-en-1-ona, e 3-(3,4-diclorofenil)-1-(furan-2-il)prop-2-en-1-ona.

No estudo de Yücepepe *et al.* (2024) novos derivados de chalconas foram sintetizados a partir de 4-aminoacetofenona, confirmados por métodos espectroscópicos. Para a atividade inseticida tópica, fêmeas adultas da mosca-das-frutas tefritídeos, *Anastrepha suspensa*, foram designadas para o estudo em questão. Os resultados dos testes de atividade aduicida demonstraram que os derivados de chalcona são eficazes contra a fêmea de *A. suspensa*. Entre as chalconas sintetizadas, a 1-(4-cinamoilfenil)-3-(p-tolil)ureia, exibiu uma maior atividade inseticida, resultando em 73% de mortalidade a 100 µg/mL em um período de 24 horas de exposição, enquanto outros derivados demonstraram menos de 30% de mortalidade. Os resultados demonstram que a atividade inseticida pode ser modulada pela presença de um anel

fenil na estrutura do derivado 2, sendo um potencial design para novos agentes químicos frente a mosca-das-frutas tefritídeos. Os estudos demonstram que as chalconas e seus derivados podem ser altamente eficazes como agentes inseticidas contra diferentes espécies de insetos. A sua eficácia varia com uma estrutura química específica, a concentração utilizada e a espécie-alvo.

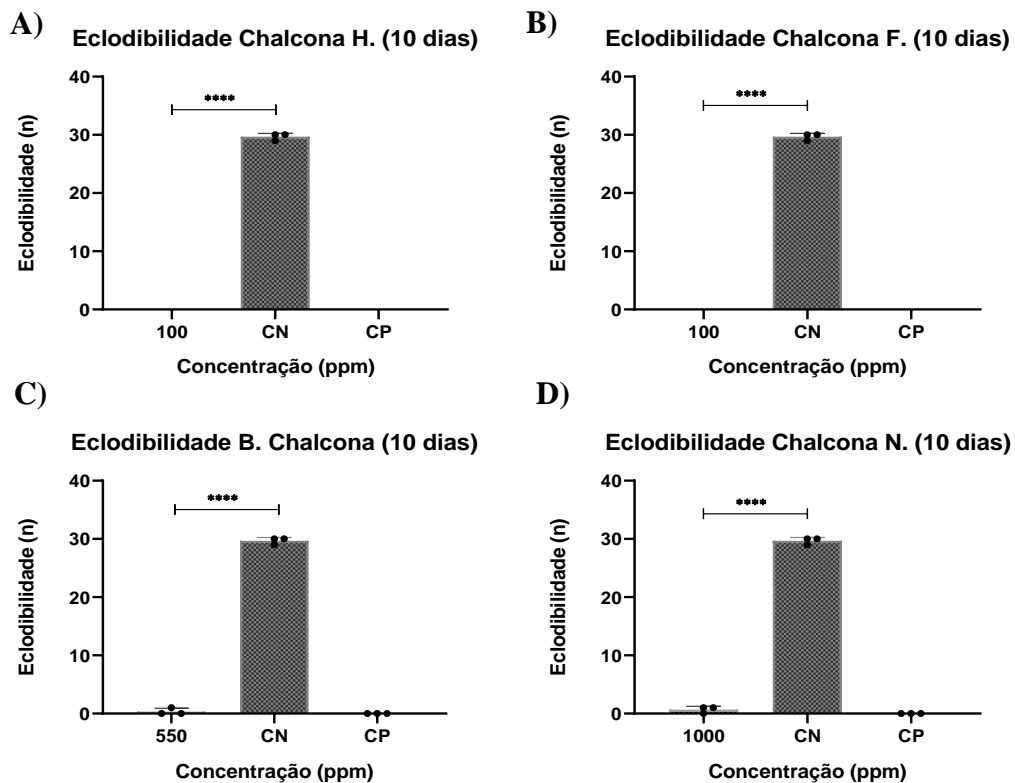
Diante dos resultados expostos no Gráfico 6, podemos observar que mesmo em concentrações fixas, que variaram de 100 a 1000 ppm, houve alternâncias na mortalidade nos diferentes testes utilizados. Essa atividade pode sugerir um possível mecanismo de sinalização envolvendo as enzimas PTE2 e QTA, como destacado anteriormente na atividade larvicida e pupicida, e no estudo *in silico*. Nas fêmeas, a redução da expressão ou interferência de PTE2 leva a um nível reduzido da captação de colesterol após repasto sanguíneo, tendo pouco efeito na captação de AP (Radek; Dyer; Lan, 2010; Kim; Wessely; Lan, 2005). A QTA é uma enzima significativamente predominante em estágios larvais, responsável pela conversão de 3-HK (composto altamente tóxico ao SNC em mosquitos) em XA, importante para o desenvolvimento de mosquitos adultos em *Ae. aegypti* (Han *et al.*, 2005; Li J; Li G, 1997). Embora a QTA fosse o principal intermediário na via da XA, a mesma está presente apenas em baixas concentrações em mosquitos adultos (menos de 30 mg⁻¹) (Li e Guoyu, 1997). Após exposição as concentrações fixas das chalconas, observamos um aumento da mortalidade no teste de contato corporal, sendo uma aplicação direta ao mosquito adulto. Mesmo em baixas concentrações, a interação molecular frente a esta exposição mediada por estes compostos, pode ser atribuída entre as chalconas e a QTA, não favorecendo a transaminação da 3-HK, ocorrendo assim o acúmulo de 3-HK, levando à formação de espécies reativas de oxigênio, danos neuronais e morte ao organismo. Estudos com derivados de chalconas revelam que a ação voltada para as substâncias, pode estar relacionada com a formação de poros na membrana celular, além de apresentarem atividade inibitória de enzimas essenciais para o metabolismo do organismo (Cuellar *et al.*, 2022; De santiago-silva *et al.*, 2022; Insuasty *et al.*, 2015).

5.5 Avaliação sobre os ensaios da atividade de eclosão

Nos gráficos 7A, B, C, D, são demonstrados os dados decorrentes da atividade de eclodibilidade em exposição a CH (Figura 22), CF (Figura 23), BC (Figura 24) e CN (Figura 25). Para avaliar a atividade de eclodibilidade, discos de papel filtro contendo 30 ovos foram expostos a menor concentração das substâncias teste, que matou 100% das larvas. Os ovos foram mantidos nas condições ideais de desenvolvimento e observados ao longo de 10 dias. De

acordo com os parâmetros estabelecidos, foram utilizadas concentrações fixas que variaram de 100 a 1000 ppm. Ao avaliar os dados, observou-se que a CH ($p < 0,0001$ [Gráfico 7A]), CF ($p < 0,0001$ [Gráfico 7B]), BC ($p < 0,0001$ [Gráfico 7C]) e CN ($p < 0,0001$ [Gráfico 7D]) obtiveram atividade significativa, diminuindo acentuadamente a eclodibilidade dos ovos de *Ae. Aegypti* após 10 dias de exposição. Os quatro tipos diferentes de chalconas apresentaram significância estatística, quando comparada ao controle negativo. Possivelmente, a atividade evidenciada sobre a eclodibilidade dos ovos de *Ae. aegypti* pode estar relacionada a um dano em suas camadas, visto que, para eclosão do embrião, o ovo precisa se manter em condições ideais de desenvolvimento, para que assim ocorra uma reorganização metabólica e posterior fecundidade.

Gráfico 7: Atividade dos quatro tipos diferentes de chalconas diante da eclodibilidade em *Ae. aegypti* após 10 dias de exposição.



Legenda: A) Chalcona Heterocíclica (CH), B) Chalcona Flúor (CF); C) Bromo Chalcona (BC); D) Chalcona Nitrogênio (CN); Concentrações de (100, 550 e 1000 ppm); CN = controle negativo; CP = controle positivo; **** ($p < 0,0001$) resultados que diferem significativamente do controle negativo.

Estudo de Silva *et al.*, (2019), observou a exposição de ovos de *Meloidogyne incognita* diante um análogo de chalcona por um período de 7 dias. De acordo com os resultados

evidenciados, houve redução significativa no número de eclosões desses embriões, quando comparado ao grupo controle negativo (água). As concentrações de 500 e 250 µg/mL, atingiram, respectivamente, reduções de 56% e 69% ($p < 0,05$). Já a Concentração de 75 µg/mL foi semelhante ao controle negativo, não sendo observada significância estatística. Já Pereira *et al.*, (2018) analisou os efeitos de dois análogos de chalconas, em um modelo de esquistossomose em camundongos. Foi feito a ingestão dos ovos pelos camundongos e tratamento oral com os análogos de chalconas. No entanto, não houve uma atividade estatisticamente significativa mediante ao aumento relacionado ao dano, em comparação ao grupo controle negativo. Porém, foram observadas reduções significativas ($p < 0,05$) na carga parasitária após tratamento oral em camundongos, 49 dias após a infecção. Foram observadas reduções totais de 32,8% e 31,8% com uma dose oral única (400 mg/kg), em comparação com grupo controle negativo.

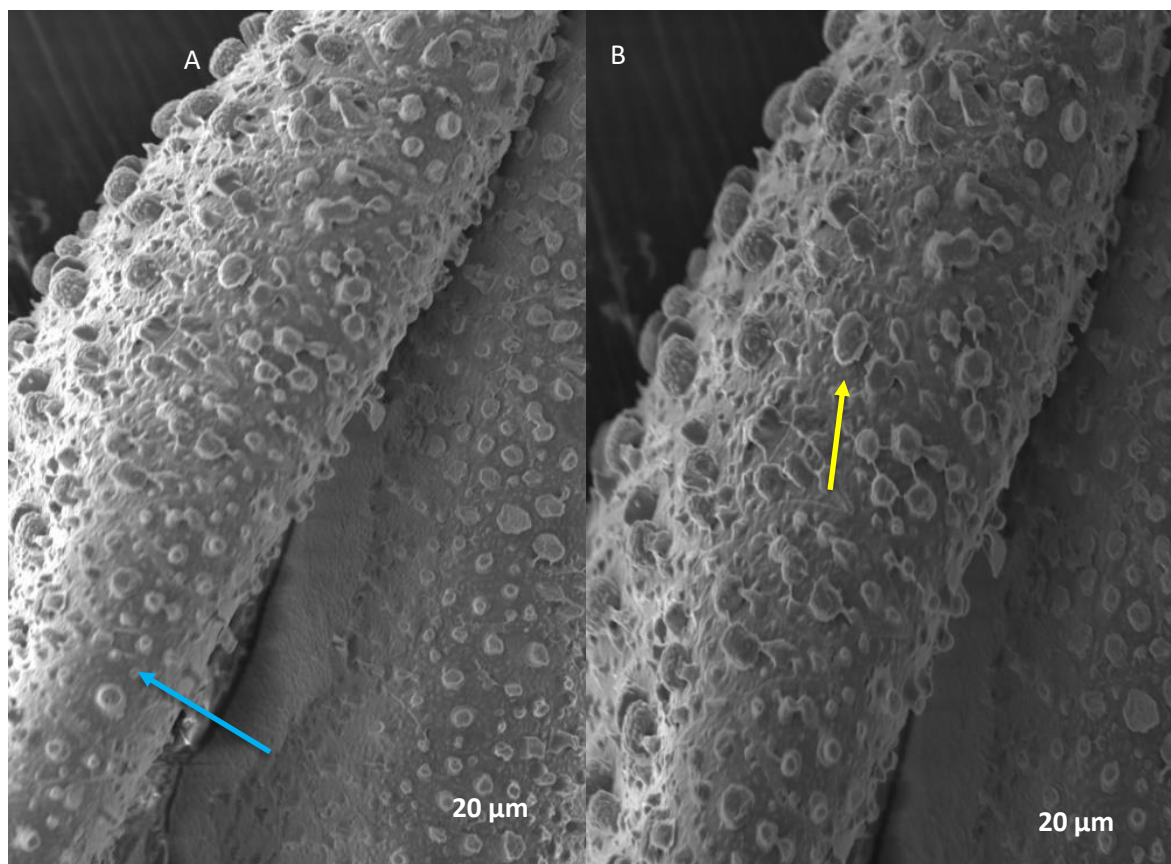
No estudo de Souza, (2017) foi avaliado a utilização do extrato liofilizado de *Agave sisalana* frente ao bioensaio de eclodibilidade em ovos de *Ae. aegypti*. Os resultados demonstraram uma inibição da eclodibilidade de 100% na concentração de 10 mg/mL durante 15 dias de observação. Já no estudo conduzido por Fernandes *et al.* (2021), foram testadas diferentes concentrações de frações de *Helicteres velutina* frente aos ovos de *Ae. aegypti*. Ambas as frações, hexânica e diclorometano, demonstraram 100% de inibição da eclosão na concentração de 5 mg/mL. A fração hexânica, em particular, mostrou eficácia notável, com a menor concentração testada (0,1 mg/mL) inibindo a eclosão de 67,7% dos ovos. Resultados semelhantes aos observados no presente estudo, com inibição da eclodibilidade variando entre 97% e 100% nas diferentes concentrações testadas (100 a 1000 ppm), sugerindo que as chalconas possuem um impacto significativo na inibição da eclosão dos ovos de *Ae. aegypti*. Esses compostos podem causar danos ao exocóron, impedindo o desenvolvimento adequado do embrião em condições ideais. Esse dano pode comprometer a reorganização metabólica necessária para a eclosão, afetando negativamente a viabilidade dos ovos.

5.5.1 Análise de Danos Estruturais em Ovos de *Ae. aegypti* por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Através do ensaio de eclodibilidade e da análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), podemos identificar danos estruturais na camada dos ovos de *Ae. aegypti*. Esses danos podem comprometer a integridade do ovo, resultando em uma redução na taxa de

eclosão e na viabilidade dos ovos. Na Figura 28, observamos a estrutura dos ovos de *Ae. aegypti* íntegras expostas ao grupo controle negativo. Na seta amarela designada na Figura 28B é destacada as células C importantes para a proteção do exocórrion (camada externa dos ovos) localizado na Figura 28A pela seta azul.

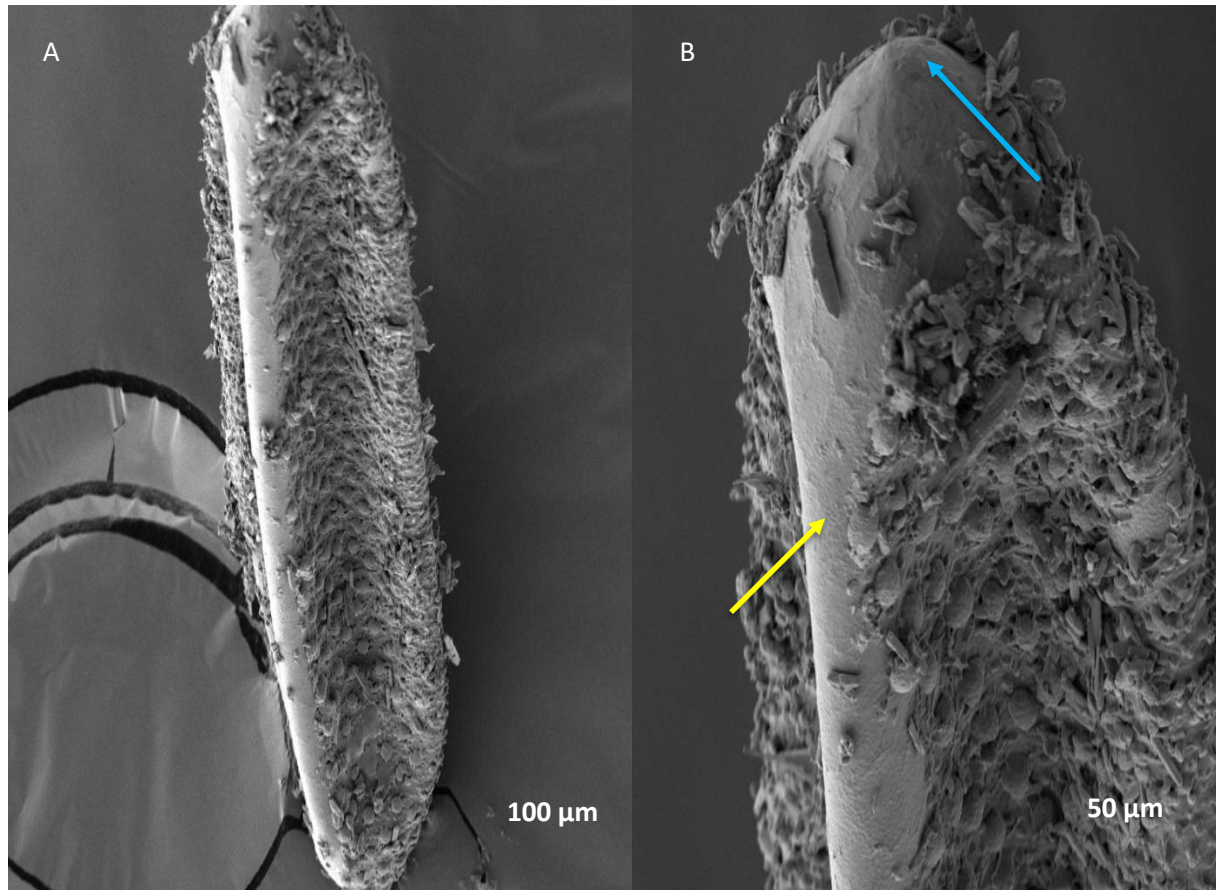
Figura 28: Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura do grupo controle negativo dos ovos de *Ae. aegypti*.



Legenda: Ovos do grupo controle negativo de *Ae. aegypti*; A e B) Membrana externa; Escala em 20µm; Seta azul = exocórrion; Seta amarela = células C do exocórrion

Nas imagens obtidas por MEV em escala de 100 e 50 µm respectivamente, a Figura 29 se refere ao grupo teste após exposição da CH frente aos ovos de *Ae. aegypti*. Na seta amarela, configurada na Figura 29B, podemos observar o exocórrion dos ovos danificado na superfície lateral do pólo anterior, próximo ao aparelho micropilar destacado na seta azul também na Figura 29B. As células C designadas no exocórrion se mostram desparelhadas e desorganizadas com os danos possivelmente provenientes da exposição ao composto.

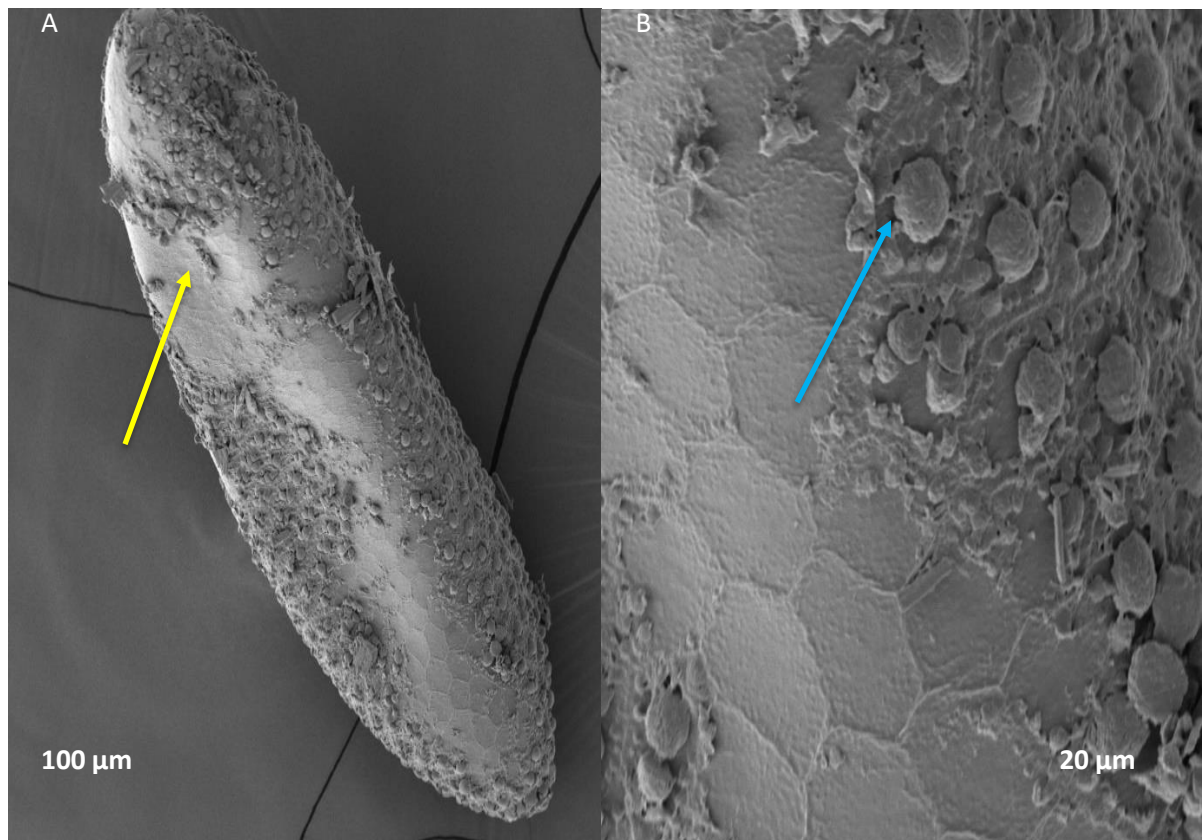
Figura 29: Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos ovos de *Ae. aegypti* após exposição a chalcona heterocíclica.



Legenda: Ovos de *Ae. aegypti* expostos a chalcona heterocíclica; Escala em 100 e 50µm; Seta amarela = descamação do exocócion na superfície lateral no pólo anterior; Seta azul = dano ao aparelho micropilar.

A Figura 30, nas imagens registradas por MEV em uma escala de 100 e 20 µm respectivamente, se refere ao grupo teste após exposição da CF frente aos ovos de *Ae. aegypti*. Na seta amarela, configurada na Figura 30A, observarmos alterações morfológicas no exocócion dos ovos na superfície anterior. Podemos evidenciar diferenças de alterações na Figura 30B mais proximamente na esclada de 20 µm, destacando as células C morfológicamente viáveis pela seta azul, enquanto que na superfície lateral na mesma imagem, registramos danos ao exocócion e desorganização celular.

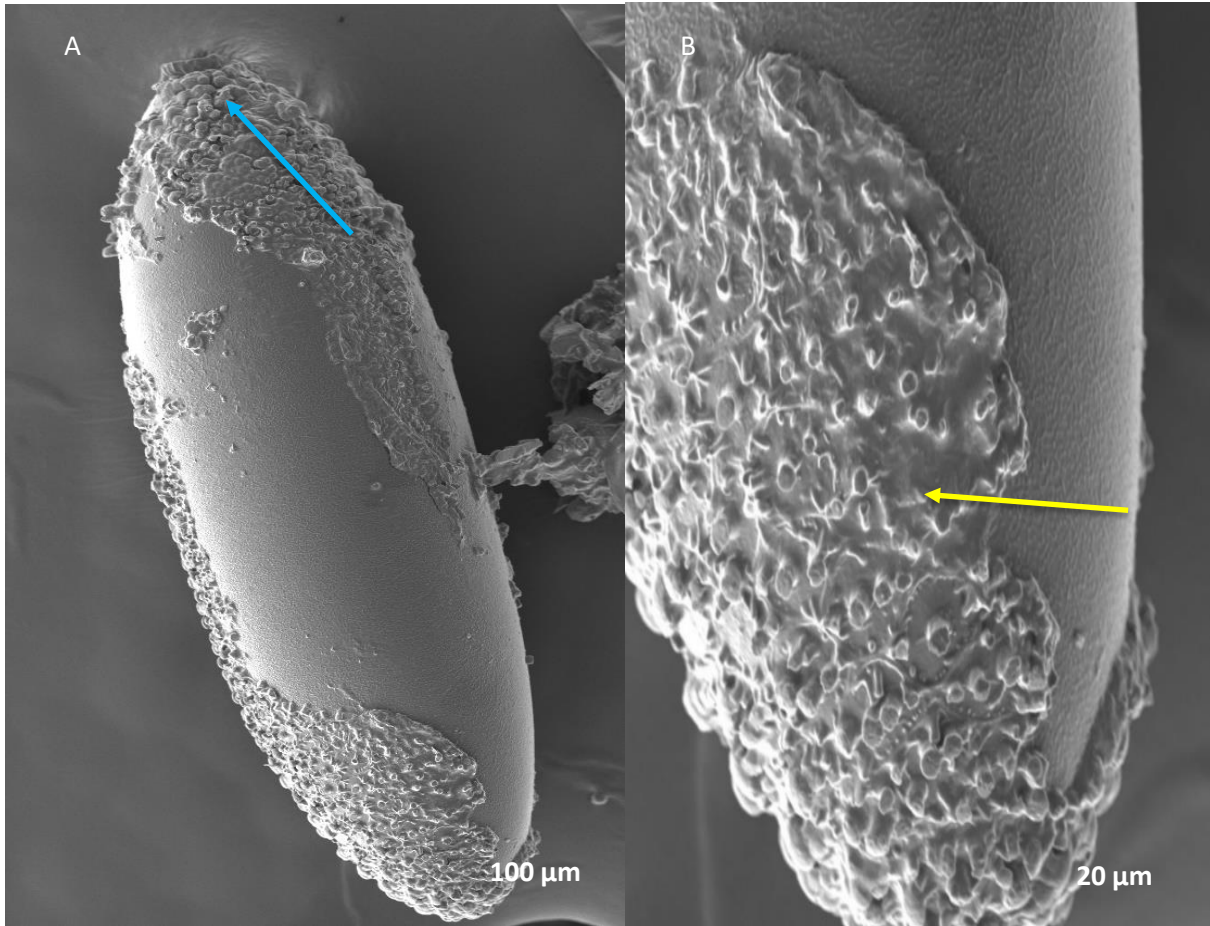
Figura 30: Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos ovos de *Ae. aegypti* após exposição a Chalcona Flúor.



Legenda: Ovos de *Ae. aegypti* expostos a chalcona flúor; Escala em 100 e 20 μm; Seta amarela = descamação do exocórrion na superfície lateral no pólo anterior; Seta azul = células C viáveis.

A Figura 31, nas imagens evidenciadas por MEV em uma escala de 100 e 20 μm respectivamente, se refere ao grupo teste após exposição da BC frente aos ovos de *Ae. aegypti*. Na seta amarela, configurada na Figura 31B, observamos alterações morfológicas no exocórrion dos ovos na superfície lateral. É evidenciado na Figura 31B, em escala de 100 μm, alterações significantes de desorganização celular e descamação no exocórrion dos ovos. Células C morfologicamente danificadas pós exposição ao composto. Na seta azul localizada ainda na Figura 31A, é destacado o aparelho micropilar morfologicamente viável, sendo o mesmo, importante para a troca de gases e regulagem de pressão interna dos ovos (Linley, 1989)

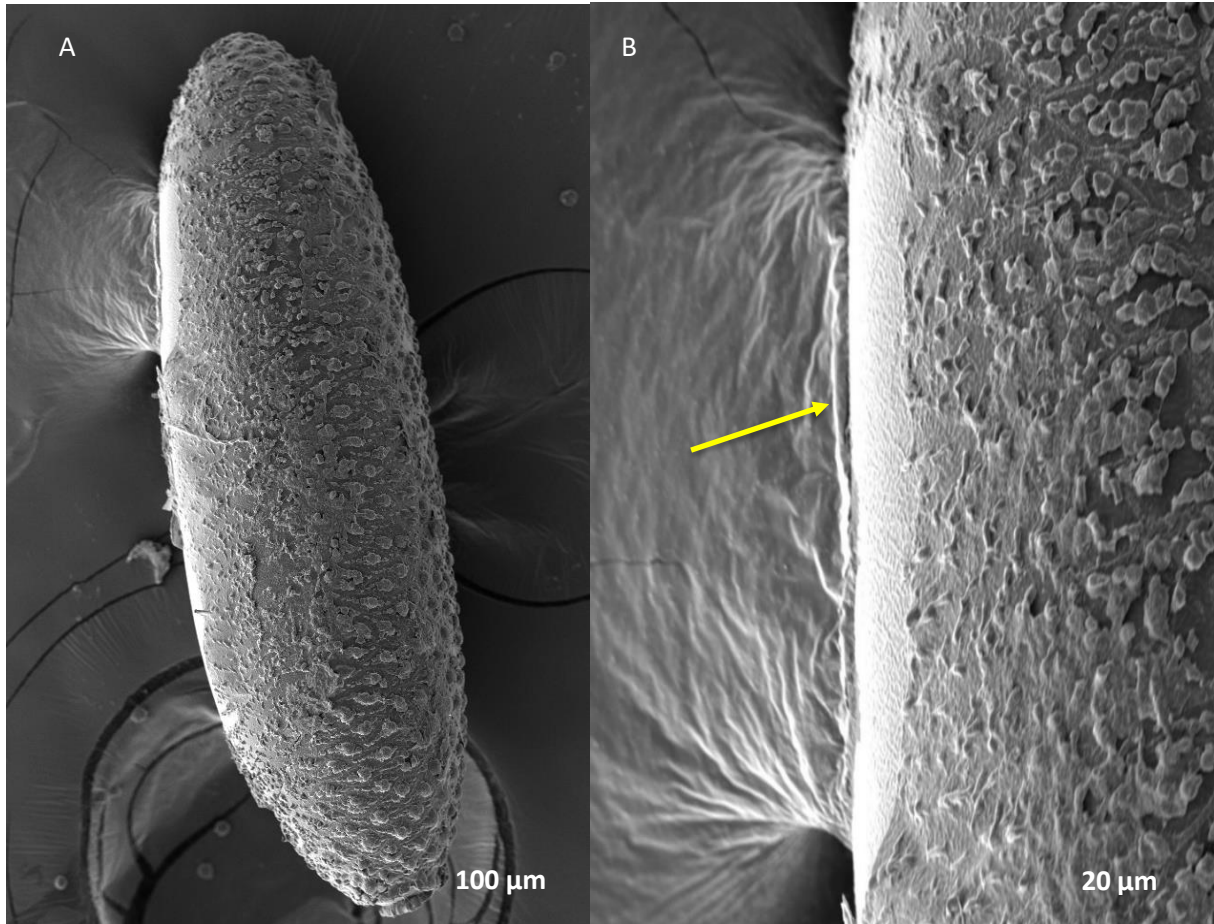
Figura 31: Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos ovos de *Ae. aegypti* após exposição a Bromo Chalcona.



Legenda: Ovos de *Ae. aegypti* expostos a bromo chalcona; Escala em 100 e 20 μm ; Seta amarela = descamação do exocórcion na superfície inferior do pólo anterior; Seta azul = aparelho micropilar

Nas imagens obtidas por MEV em escala de 100 e 20 μm respectivamente, a Figura 32 se refere ao grupo teste após exposição da CHN frente aos ovos de *Ae. aegypti*. Na seta amarela, configurada na Figura 32B, podemos observar o exocórcion dos ovos danificado na superfície lateral do pólo anterior. Na seta em azul, destacada na Figura 32A observamos células C morfológicamente viáveis mesmo após exposição à concentrações elevadas. No ensaio de eclodibilidade, foi observado uma diminuição efetiva na taxa de eclosão dos ovos frente exposição à CHN. Alterações morfológicas se destacaram em menor evidência neste ensaio, quando comparada com os outros compostos utilizados.

Figura 32: Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos ovos de *Ae. aegypti* após exposição a Chalcona Nitrogênio.



Legenda: Ovos de *Ae. aegypti* expostos a chalcona nitrogênio; Escala em 100 e 20 μm ; Seta amarela = descamação do exocórcion na superfície lateral do pólo anterior

Um estudo de Alves *et al.* (2022) utilizou lectina das folhas de *Myracrodruon urundeuva* (MuLL) como inseticida frente aos ovos de *Ae. aegypti*. Os ovos do *Ae. aegypti* foram incubados com MuLL por 72h para determinação de sua concentração na qual a taxa de eclosão reduza em 50% (CL_{50}). Os efeitos do MuLL na estrutura da superfície dos ovos foram avaliados utilizando MEV, e a possível interação do MuLL com as estruturas internas dos ovos. O MuLL atuou como um agente ovicida com uma CL_{50} de 0,88 mg/mL. A análise por MEV revelou que os ovos tratados com MuLL por 24 e 48h não tinham mais tubérculos e não demonstraram uma rede exocoriônica bem definida. Além disso, deformação e degeneração da superfície foram observadas após 72h de exposição. A comparação entre a atividade de *Myracrodruon urundeuva* e chalconas sintéticas revela que ambos os grupos de compostos possuem atividades ovicidas significativas. Embora os mecanismos específicos possam variar, ambos podem causar danos estruturais aos ovos de *Ae. aegypti*. Já Yang *et al.* (2021) retrata a utilização de um inseticida sistêmico (espirotetramate) para investigação da atividade ovicida,

frente ao *Frankliniella occidentalis*, conhecido como tripes-do-ocidente. Este inseticida age interrompendo a biossíntese de lipídios, afetando a produção de energia e o desenvolvimento dos insetos. A toxicidade do espirotetramato para *F. occidentalis*, em ovos de 0h, 12h e 24h de idade foi determinado pelo método de imersão de ovos. Os resultados sugeriram que o valor de LC₅₀ aumentou (8,549 mg/mL – 0h; 14,418 mg/mL – 12h; 32,471 mg/mL – 24h) gradualmente à medida que a idade dos ovos aumentaram. Foram observados nos ovos de 0h por MEV, atrofia das células embrionárias e ruptura da superfície do ovo.

Em um outro estudo de Alves *et al.* (2020), é evidenciado a utilização de lectinas da casca de *Myracrodruon urundeuva* (MuBL) e cerne (MuHL) para investigação da atividade ovicida frente ao *Ae. aegypti*. Os efeitos de MuBL e MuHL na estrutura da superfície dos ovos foram avaliados por MEV. A atividade ovicida de MuBL e MuHL foi determinada pelas concentrações que reduziram as taxas de eclosão em 50% no período de 72h de exposição (EC₅₀). Em ovos tratados com MuBL e MuHL, foram observadas a presença de protuberâncias na superfície dos ovos, o desaparecimento da rede exocoriônica e a diminuição e deformação dos tubérculos. Os dados sobre a atividade de eclodibilidade destacados demonstram semelhanças significativas com os efeitos das chalconas, especialmente em relação aos danos ao exocóxon e à diminuição da taxa de eclosão dos ovos. A combinação de agentes naturais e sintéticos pode proporcionar uma abordagem integrada e eficiente no controle de vetores.

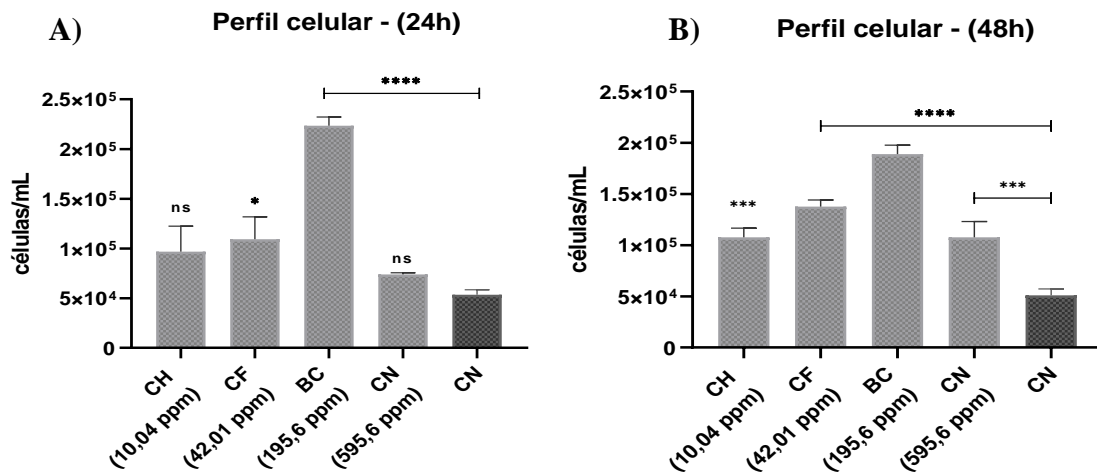
5.6 Avaliação sobre os ensaios de perfil celular total

Nos gráficos 8A-8B, são demonstrados os dados decorrentes dos ensaios de perfil celular total em larvas (L3) após a CH (Figura 22), CF (Figura 23), BC (Figura 24) e CN (Figura 25). De acordo com os parâmetros estabelecidos, foram utilizadas a CL₅₀ de cada composto, as concentrações variaram de 10.04 a 595.6 ppm, sendo avaliadas por um período de 24 e 48 horas se exposição. No período de 24 horas de exposição, observamos um aumento dos hemócitos totais (Gráfico 8A) em BC ($p < 0,0001$ [$22,3 \pm 1,3\%$]) e CF ($p = 0,0183$ [$10,91 \pm 1,3\%$]), apresentando significância estatística ($R^2 = 0,9524$), quando comparado como grupo controle negativo. Por sua vez, a CH ($p = 0,0684$ [$9,6 \pm 1,3\%$]) e CN ($0,6832$ [$10,7 \pm 1,5\%$]) apresentaram um aumento considerável dos hemócitos totais após exposição por um período de 24 horas, mas sem significância estatística, quando comparada com o grupo controle negativo. Já no período de 48 horas de exposição, três chalconas apresentaram aumento dos hemócitos totais (Gráfico 8B), CH ($p = 0,0005$ [$10,7 \pm 8,8\%$]), CF ($p < 0,0001$ [$13,7 \pm 7,8\%$]) e CN ($p < 0,0005$ [$11,1 \pm 7,8\%$]), porém, curiosamente, a BC ($p < 0,0001$ [$16,4 \pm 1,8\%$]) apresentou uma diminuição dos hemócitos

totais, mas sem significância estatística quando comparada ao período de 24 horas de exposição. Todas apresentaram significância estatística ($R^2 = 0.9655$) quando comparada ao controle negativo. Ao contrário dos vertebrados, os insetos dependem exclusivamente da imunidade inata (Bergmann *et al.*, 2024).

Em um estudo de Oliveira *et al.* (2016), foi evidenciado a utilização de um extrato bruto da *Agave sisalana* (*A. sisalana*) em *Ae. aegypti*. Hemócitos foram expostos a diferentes concentrações do extrato bruto de *A. sisalana* (0,18–6,00 mg/mL) por um período de 24 horas, em seguida, as células foram marcadas com iodeto de propídio e submetidas à microscopia de fluorescência para verificar a viabilidade celular. A microscopia de fluorescência demonstrou que as células expostas a concentrações abaixo de 6 mg/mL não apresentaram diferença significativa na morte celular em comparação ao grupo controle. As células expostas a 6 mg/mL do extrato bruto de *A. sisalana* apresentaram $73,8\% \pm 9,6\%$ de células necróticas versus $34,6\% \pm 9,6\%$ no grupo controle, após 24 horas de exposição. Vale mencionar que houve um aumento de 39,2% de células necróticas em comparação ao grupo controle.

Gráfico 8: Quantificação de hemócitos totais em larvas (L3) frente exposição aos quatro tipos diferentes de chalconas por 24 e 48 horas.



Legenda: A e B) Quantificação de hemócitos totais frente exposição as quatro chalconas no período de 24 e 48 horas; Concentrações de (10.04 [CH], 42.01[CF], 195.6 [BC] e 595.6 [CN] ppm); CN = controle negativo; * ($p=0,0183$) *** ($p=0,0003$), **** ($p<0,0001$) resultados que diferem significativamente do controle negativo.

No estudo de Nascimento *et al.* (2024), foi investigado a atividade do timol como substância larvicida e imunomoduladora em *Ae. aegypti* em diferentes concentrações (0.25

mg/mL) por 24 horas de exposição para a avaliação dos hemócitos. Foi demonstrado que o grupo experimental teve 4 vezes mais células necróticas do que o grupo controle ao analisar os efeitos do timol sobre hemócitos ($43,0 \pm 6,8$ vs. $10,0 \pm 1,1$). A diferença entre os grupos foi considerada estatisticamente significativa a um nível de significância de 95%. No estudo de Sukkar *et al.* (2023), investigou-se em uma abordagem *in vitro* a avaliação da resposta de hemócitos expressos de *Apis mellifera*, *Drosophila melanogaster* e *Mamestra brassica* após exposição a imidacloprida e amitraz, com imunoestimulação após 18 horas de exposição por zimozan A. A exposição ao amitraz sem imunoestimulação resultou em uma diminuição significativa na viabilidade de hemócitos (95,91%) em comparação com todas as exposições a pesticidas, exceto o grupo controle negativo. Todas as condições que incluíram ativação imune com zymosan A, a 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ não demonstraram nenhuma diferença significativa na viabilidade de hemócitos.

Diante dos resultados obtidos, evidenciou-se um aumento substancial na concentração de hemócitos totais frente exposição a diferentes concentrações (10.04 [CH], 42.01[CF], 195.6 [BC] e 595.6 [CN] ppm) respectivamente, sendo a BC, a única que apresentou diminuição dos hemócitos totais no período de 48 horas. A expressão dos hemócitos frente exposição aos compostos pode se dar pelas vias de sinalização mais comuns, como a Toll, resultando na proliferação de hemócitos. Por outro lado, a via IMD através do reconhecimento por PGRP-LC, atua produzindo peptídeos antimicrobianos e da mesma forma, ocasionando proliferação de hemócitos (Kumar *et al.*, 2018). A hipótese de atividade frente a PTE2 não se vincula aos hemócitos, já que sua expressão é pouco efetiva nessas células.

No estudo de Kim e Lan (2010), como já retratado anteriormente, avaliando genes (MsPTE-2-x/PTE-2) da PTE2 em *Manduca sexta*, destacam que no corpo gorduroso, houve um aumento transitório nas transcrições de MsSCP-2 no final e no início de cada fase de desenvolvimento larval, porém baixos níveis de mRNA de MsSCP-2 foram detectados na hemolinfa e em hemócitos de *Manduca sexta*. Com importantes resultados, o estudo de Lan e Massey (2004) já destacavam a expressão da PTE2 em sub linhagens celulares (Aag-2) de *Ae. aegypti*. A linhagem celular Aag-2 foi estabelecida a partir de uma cultura de células de *Ae. aegypti*, e é uma linhagem celular do tipo epitelial, não hemocítica. Isso significa que, embora as células Aag-2 sejam derivadas de um mosquito, elas não são hemócitos, que são células da hemolinfa, responsáveis por funções imunológicas, como fagocitose e sob a defesa contra patógenos. Em células cultivadas de *Ae. aegypti*, a AeSCP-2 foi detectada principalmente no citosol, em algumas mitocôndrias e núcleos de marcação em células do epitélio, mas não em vesículas membranosas.

Já a hipótese mediada pela QAT e sua expressão em hemócitos, vemos quase ou não nenhuma correlação. Em um estudo de Cristina *et al.* (2022) foi evidenciado a expressão de diversos genes voltados para a via de sinalização da QAT e metabolização do triptofano em caracol de lagoa *Lymnaea stagnalis* (LS). Como resultados observaram maior expressão do gene Lym AADAT-like, semelhante ao gene AADAT (aminoadipate aminotransferase) no intestino de LS, importante para via de metabolização frente a L-quinurenina. As análises revelaram que os níveis de mRNA deste gene nos hemócitos eram significativamente mais baixos em relação a todas as outras tecidos avaliados. Genes Lym AFMID-like, Lym KMO-like, Lym HAAO-like e Lym KYAT-like, que desempenham um papel importante de codificação dos subprodutos sob as vias de sinalização e metabolização do triptofano foram significativamente expressos no intestino, e diminuídos em hemócitos de LS.

Entretanto, vias de sinalização direcionadas a imunomodulação por QTA, um derivado do triptofano, e PTE2, podem ser destacadas, já que ambos os estudos de Cristina *et al.* (2022), Kim e Lan (2010) e Lan e Massey (2004) demonstram a expressão dos derivados dessas proteínas na hemolinfa e tecidos adjacentes. Em crustáceos, a suplementação de triptofano melhora o índice de crescimento e a taxa de sobrevivência. Também foi demonstrado que o triptofano e seus metabólitos diminuem o comportamento agressivo (lutas/ataques) em juvenis de *Scylla serrata* (Huang *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2019; Prasad *et al.*, 2014). Em termos imunológicos, a suplementação de triptofano aumenta a microbiota intestinal de *Eriocheir sinensis*, resultando em maiores taxas de sobrevivência após desafio bacteriano. A suplementação atua no aumento da resposta imunológica, incluindo a contagem total de hemócitos, a taxa de fagocitose, a atividade da fosfatase ácida e da fosfatase alcalina, além da capacidade antioxidante (Huang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2018). O triptofano e seus metabólitos, como a melatonina, podem ativar o cascata antioxidante e promover a expressão de proteínas de resposta imunológica (Huang *et al.*, 2020; Hoseini *et al.*, 2019; Li J; Li G, 1997).

Já a PTE2 pode atuar de maneira indireta frente ao sistema imunológico dos insetos. O seu papel primário se dá pelo transporte de esteróis e ácidos graxos no citosol das células, facilitando a via da β -oxidação para posterior produção de ATP. A sua atividade indireta seria no papel sob o metabolismo lipídico, visto que, diversas moléculas sinalizadoras são reguladas e sintetizadas através do carreamento e metabolismo desses componentes (Krebs; Lan, 2003). A síntese, acumulação e hidrólise de lipídios ocorrem no corpo gorduroso (CG) e a acumulação de triacilglicerol (TAG) ocorre predominantemente em gotículas lipídicas intracelulares (LDs) nas células do CG. Os metabólitos distribuídos pelo CG possuem diversas funções sob o sistema imunológico em insetos, como a atividade antimicrobiana mediada por LDs, participando da

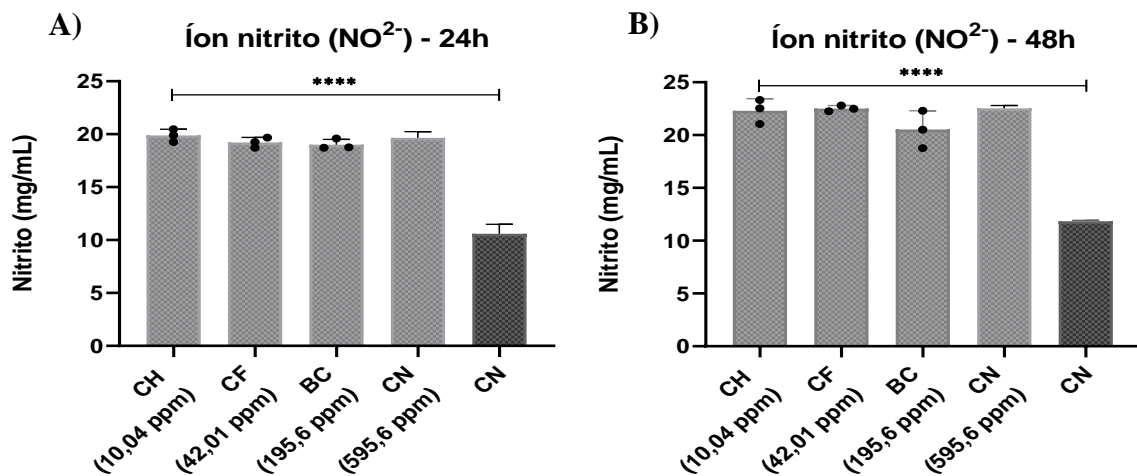
resposta celular de hemócitos, as apolipoproteínas atuando no reconhecimento de patógenos, suporte no processo de encapsulação por hemócitos, e regulação das vias de sinalização imunológica. No estudo de Barletta *et al.* (2016) foi evidenciado que as células Aag2 de *Ae. aegypti* aumentaram LDs após a exposição a bactéria *Enterobacter cloacae*, vírus Sindbis e da Dengue. Da mesma forma, LDs também se acumularam nas células do intestino médio após o desafio com a bactéria *Serratia marcescens* e ao vírus Sindbis. O número de LDs foi ainda aumentado pela ativação constitutiva das vias Toll e IMD, resultante do *knockdown* dos moduladores negativos Cactus e Caspar. A literatura científica indica que tanto as vias Toll quanto IMD podem ser ativadas em *Locusta migratoria* em resposta à infecção por *Metarhizium acridum*, e que os genes associados às vias Toll e IMD apresentam padrões de expressão distintos no corpo gorduroso e nos hemócitos (Wronska *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2015; Brasaemle *et al.*, 2004).

Portanto, a hipótese de interferência das chalconas nas vias em destaque, pode sugerir uma modulação nas vias de sinalização que estimulam a proliferação ou a mobilização dos hemócitos. As vias Toll e IMD são fundamentais na resposta imune dos insetos e podem estar sendo estimuladas de forma específica ou indireta devido à interferência nas proteínas PTE2 e QTA. Embora essas proteínas não sejam diretamente envolvidas na sinalização imune, sua interferência poderia alterar o metabolismo celular, ocasionando sinais de estresse ou modulação imunológica que ativariam as vias Toll e IMD, direcionando assim, para um maior recrutamento de hemócitos, o que foi evidenciado no presente estudo por três chalconas (CH, CF e CN). A BC apresentou diminuição na contagem total de hemócitos em *Ae. aegypti* frente ao período de 48 horas de exposição, mas sem significância estatística quando comparada ao período de 24 horas de exposição. Em hipótese, a BC pode ter atividade sob a proliferação de hemócitos atuando na inibição direta das vias Toll e IMD, dificultando o recrutamento de hemócitos. Pode-se destacar também a atividade por efeitos multialvos, ou seja, diminui a expressão de hemócitos interagindo com outras proteínas ou vias de sinalizações importantes para a sobrevivência e proliferação celular, além de PTE2 e QTA. Outra hipótese é de que a BC, pode estar ocasionando efeito citotóxico direto sobre os hemócitos, induzindo apoptose ou necrose. Investigações adicionais para elucidar essas hipóteses e delinear os mecanismos subjacentes será essencial para uma compreensão abrangente do impacto das chalconas na resposta imune e na proliferação de hemócitos em *Aedes aegypti*.

5.7 Determinação da produção do íon nitrito (NO²⁻)

Nos gráficos 9A-9B, são demonstrados os dados decorrentes da determinação da produção do NO^{2-} em larvas (L3) após exposição a CH (Figura 22), CF (Figura 23), BC (Figura 24) e CN (Figura 25). De acordo com os parâmetros estabelecidos, foram utilizadas a CL_{50} de cada composto, as concentrações variaram de 10.04 a 595.6 ppm, sendo avaliadas por um período de 24 e 48 horas se exposição. No período de 24 e 48 horas de exposição, observamos um aumento do NO^{2-} em todas as chalconas utilizadas, CH ($p < 0.0001$), CF ($p < 0.0001$), BC ($p < 0.0001$) e CN ($p < 0.0001$), (24h: $18,9 \pm 0,6\%$ e 48h: $20,9 \pm 0,6\%$). Diversas pesquisas em invertebrados têm relacionado a produção NO a efeitos citotóxicos contra patógenos e agentes externos.

Gráfico 9: Determinação da produção de NO^{2-} em larvas (L3) após exposição aos quatro tipos diferentes de chalconas por 24 e 48 horas.



Legenda: A e B) Determinação de NO^{2-} frente exposição as quatro chalconas no período de 24 e 48 horas; Concentrações de (10.04 [CH], 42.01[CF], 195.6 [BC] e 595.6 [CN] ppm); CN = controle negativo; **** ($p < 0,0001$) resultados que diferem significativamente do controle negativo.

O aumento na produção de NO pelos hemócitos está correlacionado com a resposta imunológica contra agentes estranhos (Nunes *et al.*, 2013), e também atua como um transmissor versátil, ativando a produção de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) como segundo mensageiro (Bergmann *et al.*, 2021). O NO é sintetizado através da oxidação da L-arginina em L-citrulina, mediada pela enzima NOS. É um radical altamente instável que reage rapidamente com outras espécies de oxigênio para formar produtos estáveis, como NO^{2-} , nitratos (NO^{3-}), e alguns radicais altamente tóxicos, como o OONO^{\cdot} . As arginases competem com a NOS pelo

mesmo substrato, resultando na produção de L-ornitina, que, por sua vez, pode ser descarboxilada pela enzima ornitina descarboxilase (ODC) para produzir poliaminas (Rivero, 2006). O cGMP possui diversas funções, como o recrutamento de hemócitos para uma resposta imunológica efetiva, promove a síntese da Proteína Quinase G (PKG) levando a fosforilação da lipase hormônio-sensível (HSL) para quebra de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol, e atua sob o desenvolvimento e vias de sinalizações em diversas espécies. O NO possui papel importante na regulação e expressão do Proteína de Ligação ao Elemento Regulatório de Esteróis (SREBP) para síntese de enzimas como Sintase de Ácidos Graxos (FASN) e Acetil-CoA Carboxilase (ACC), importantes para o processo de maior síntese de ácidos graxos e triglicerídeos, e nas cascatas de sinalização das vias Toll e IMD, promovendo um papel sob a resposta imunológica, incluindo a proliferação de hemócitos (Bodis, *et al.*, 2022; Song *et al.*, 2022; Pang *et al.*, 2021; Ruka; Miller; Blumenthal, 2013; Rawson, 2003; Morton; Hudson, 2002; Davies, 2000; Müller, 1997; Kuzin *et al.*, 1996).

Um estudo de Bergmann *et al.* (2024) conduziu uma comparação paralela da expressão da NOS e da produção de NO em hemócitos durante a infecção por *Escherichia coli* em quatro espécies de vetores: *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Culex pipiens molestus* e *Culex pipiens quinquefasciatus*. Fêmeas de quatro espécies diferentes foram utilizadas cerca de 1 a 2 semanas após a muda final. Após um período de incubação de 24 horas, os mosquitos foram brevemente anestesiados com CO₂ e colocados no gelo. Os abdômens foram cortados perto do tórax com tesouras pequenas para avaliação posterior. Em geral, as reações imunológicas foram mais pronunciadas na parte dorsal do abdômen do que no lado ventral. Nos lados ventrais dos abdômens, hemócitos NADPHd-positivos e citrulina-positivos foram distribuídos por toda a parede abdominal durante uma forte reação imunológica. Células pericárdicas de *Ae. aegypti* e *Culex pipiens molestus* mostraram um aumento na imunofluorescência de citrulina, sugerindo seu envolvimento na resposta imune. *Culex pipiens molestus* e *Ae. aegypti* exibiram uma resposta imune pronunciada, com a expressão de hemócitos NADPHd e citrulina-positivos. As células pericárdicas, também conhecidas como nefrócitos, são distribuídas ao redor da corda nervosa ventral (CNV), absorvendo toxinas potenciais da hemolinfa e, portanto, encontrando moléculas de sinalização e peptídeos imunes.

Já no estudo de Nunes *et al.* (2015) avaliou a produção de NO²⁻ frente exposição a *Agave sisalana* (*A. sisalana*) em *Ae. aegypti* em diferentes concentrações (0,18–6,00 mg/mL). Os resultados mostraram que a concentração de NO²⁻ na hemolinfa de larvas expostas ao extrato bruto de *A. sisalana* foi menor do que nas larvas dos grupos controle negativo. Após 3 horas de exposição, a concentração de NO²⁻ foi de 5,3±4,3 vs 22,7±5,2 μmol no grupo controle negativo,

enquanto após 6 h, foi de $4,3 \pm 5,5$ vs. $25,4 \pm 6,6$ μmol no grupo controle negativo, e após 24 h, foi de $6 \pm 1,7$ vs. $37,1 \pm 7,8$ μmol no grupo controle negativo.

A aumento quantitativo de NO^{2-} após a exposição às chalconas (CH, CF e CN) pode estar intrinsecamente correlacionada com o aumento quantitativo de hemócitos, atuando como um segundo mensageiro nas vias de sinalização Toll e IMD. A BC, embora também tenha aumentado os níveis de NO^{2-} , está associada a uma redução no número de hemócitos. Este fenômeno pode ser explicado pela geração de ONOO^- , uma espécie radical altamente tóxica. O ONOO^- , em concentrações elevadas, é capaz de induzir estresse oxidativo, resultando em danos celulares e apoptose dos hemócitos. Além disso, é possível que a chalcona BC ative vias de sinalização que aumentam os níveis de NO, mas ao mesmo tempo desencadeie mecanismos que inibem a proliferação de hemócitos ou promovam a morte celular. A reação entre o NO e o O_2^- , produzido pela NADPH oxidase durante uma atividade oxidativa, leva à formação de ONOO^- . O ONOO^- também pode decompor-se rapidamente, liberando OH (radical hidroxila), que é extremamente reativo com a maioria das moléculas biológicas, causando peroxidação lipídica, quebra de cadeias de DNA e inativação enzimática (Hahn; Bender; Bayne, 2001; Beckman *et al.*, 1990).

O estudo de Chen *et al.* (2022) utilizando células S2 de *Ostrinia furnacalis* e *Drosophila* explora como o NO ativa a calcineurina A, que atua desfosforilando fatores de transcrição como NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*), que regulam a expressão de genes envolvidos na resposta a infecções e na inflamação, para mediar a produção de peptídeos antimicrobianos especificamente através da via IMD. Nos resultados evidenciou-se que o NO ativa a calcineurina A, que por sua vez modula a via IMD. Essa ativação leva a um aumento na produção de peptídeos antimicrobianos. A via IMD é ativada por patógenos, esta ativação atua sobre a quinase TAK1. A ativação de TAK1 resulta na ativação do fator de transcrição Rel2, que promove a expressão de genes de peptídeos antimicrobianos. A calcineurina A, quando ativada pelo NO, modula a atividade da via IMD, potencializando a expressão de peptídeos antimicrobianos. Já no estudo de Sadekuzzaman e Kim (2018) foi investigado como o NO regula a expressão de genes *Defensin* e *Drosomycin* que codificam peptídeos antimicrobianos em *Spodoptera exigua*, destacando o papel dos eicosanoides e da via Toll nesse processo. Como resultados, foi observado que o NO ativa a sinalização de eicosanoides, que são lipídios bioativos derivados de ácidos graxos. Esses eicosanoides, por sua vez, ativam a via Toll, um importante caminho de sinalização na resposta imune. A ativação da via Toll promove a transcrição de genes que codificam peptídeos antimicrobianos, como *Defensin* e *Drosomycin*, resultando em uma resposta imunológica mais eficaz.

No estudo de Rolandelli *et al.* (2021) investigou-se como a infecção por *Trypanosoma rangeli* afeta a expressão de genes relacionados às vias IMD, Toll e JAK-STAT no corpo gorduroso em *Rhodnius prolixus*. Foi investigado em grupos de insetos que possuíam infecções no intestino e/ou hemolinfa por *Trypanosoma rangeli*, e avaliada a carga parasitária e a expressão no corpo gorduroso de fatores de transcrição (Rp-Relish, Rp-Dorsal e Rp-STAT) e inibidores (Rp-Cactus e Rp-Caspar) das vias IMD, Toll e JAK-STAT. Os resultados mostram que a expressão das proteínas Rp-Relish, Rp-Cactus e Rp-STAT varia de acordo com a localização da infecção no *Rhodnius prolixus*. Rp-Relish é reduzido em insetos infectados no intestino e/ou hemolinfa. Rp-Cactus é aumentado apenas em insetos infectados no intestino. Rp-STAT é diminuído em todos os insetos com infecção na hemolinfa. Além disso, a infecção por *Trypanosoma rangeli* também modula diferencialmente a produção de AMPs e NO no intestino e no corpo gorduroso de *Rhodnius prolixus*, variando ao longo do tempo conforme os parasitas se multiplicam e a infecção se estabelece (Vieira *et al.*, 2015; Whitten *et al.*, 2007). Indicando que um aumento expressivo de NO pode estar correlacionado com o seu papel de imunomodulação, promovendo a expressão de peptídeos antimicrobianos e regulando a resposta imunológica sob a sinalização das vias IMD e Toll.

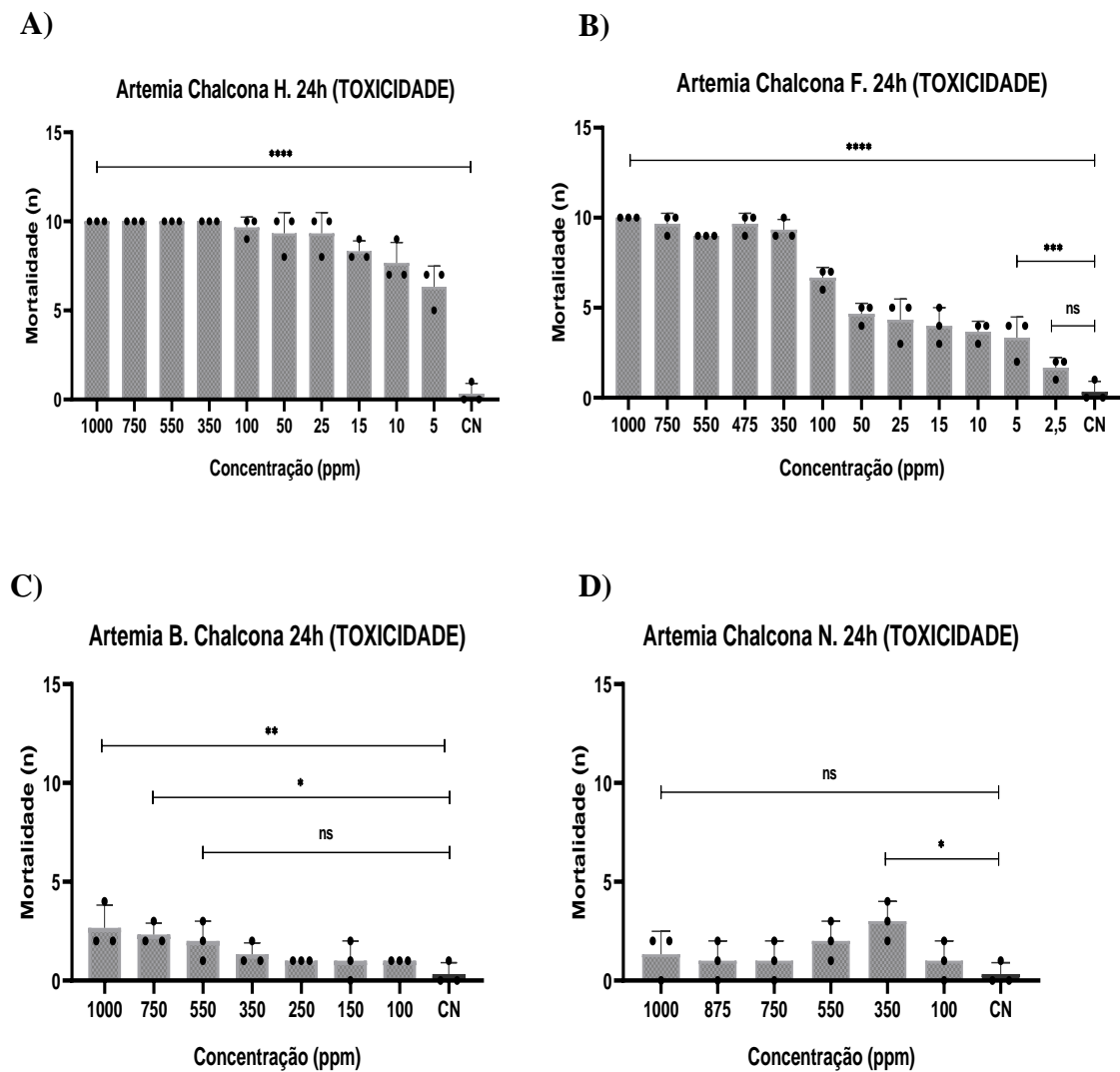
5.8 Avaliação sobre os ensaios de atividade toxicidade

O ensaio de toxicidade foi realizado com náuplios de *Artemia salina*, através da adaptação da metodologia de Meyer (1982), preparando-se uma solução com sal na concentração de 30g para 1L de água desclorada. O pH foi ajustado entre 8,0 e 9,0, por meio de solução 0,1 mol/L⁻¹ de NaOH. Esta solução foi utilizada para eclosão dos ovos de *Artemia salina*, e no preparo das demais diluições. 10 náuplios de *Artemia salina* foram utilizados para os ensaios.

O Gráfico 10 estabelece os dados dos ensaios decorrentes da atividade de toxicidade frente a *Artemia Salina* em exposição a CH (Figura 22), CF (Figura 23), BC (Figura 24) e CN (Figura 25). Diferente dos parâmetros vistos anteriormente, foram utilizadas todas as concentrações evidenciadas na atividade de desenvolvimento sobre o *Ae. Aegypti*, que variaram de 2,5 a 1000 ppm. Para a CH (Gráfico 10A), foi estabelecido concentrações de 5 a 1000 ppm, sendo a concentração de 350 ppm ($p < 0,0001$) a menor capaz de causar maior mortalidade diante das *Artemias*. Todas as concentrações testadas apresentaram significância estatística, quando comparado ao controle negativo. Com valores de CL₅₀ de 5,420 ppm ($R^2 = 0,7679$) em 24 horas de exposição. Já a CF (Gráfico 10B), diferente da CH (Gráfico 10A), demonstrou menor

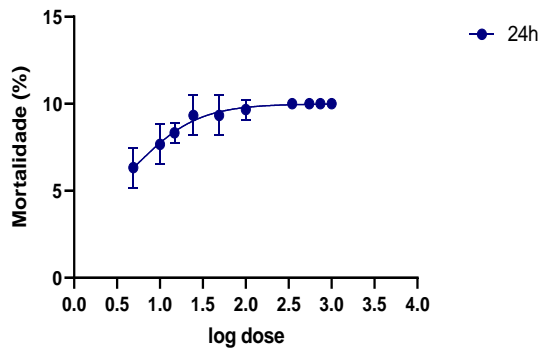
toxicidade frente a *Artemia Salina*, foram utilizadas concentrações que variaram de 2,5 a 1000 ppm, sendo a concentração de 1000 ppm ($p < 0,0001$) a menor capaz de causar maior mortalidade. As concentrações de 1000 ($p < 0,0001$), 750 ($p < 0,0001$), 550 ($p < 0,0001$), 475 ($p < 0,0001$), 350 ($p < 0,0001$), 100 ($p < 0,0001$), 50 ($p < 0,0001$), 25 ($p < 0,0001$), 15 ($p < 0,0001$), 10 ($p < 0,0001$) e 5 ppm ($p = 0,002$) apresentaram significância estatística, quando comparado com o controle negativo. Sendo a concentração de 2,5 ppm ($p = 0,1837$) a que não apresentou significância nos ensaios. Com valores de CL_{50} de 78,93 ppm ($R^2 = 0,9349$) em 24 horas de exposição.

Gráfico 10: Atividade dos quatro tipos diferentes de chalconas diante da toxicidade em *Artemia salina* após 24 horas de exposição.



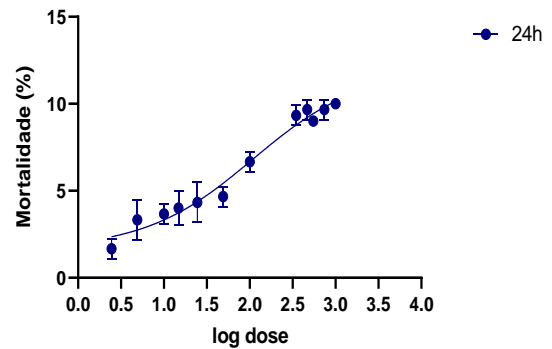
E)

Curva Dose Resposta (CL50) - Toxicidade CH.



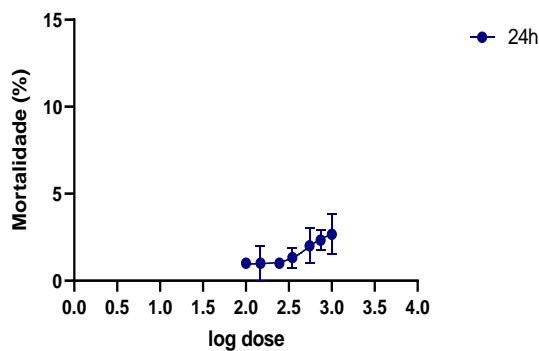
F)

Curva Dose Resposta (CL50) - Toxicidade CF.



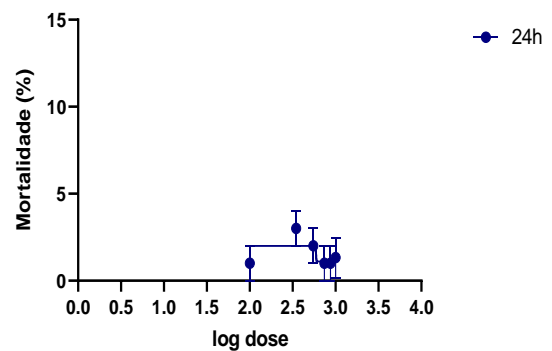
G)

Curva Dose Resposta (CL50) - Toxicidade BC.



H)

Curva Dose Resposta (CL50) - Toxicidade CN.



Legenda: Chalcona Heterocíclica (CH) (A e E); Chalcona Flúor (CF) (B e F); Bromo Chalcona (BC) (C e G), Chalcona Nitrogênio (CN) (D e G); concentrações de (2,5 a 1000 ppm); toxicidade no período de 24 horas; CN = controle negativo; ** ($p < 0,005$), *** ($p < 0,0005$) e **** ($p < 0,0001$) resultados que diferem significativamente do controle negativo; ns = sem significância estatística.

Diferente da CH (Gráfico 10A) e CF (Gráfico 10B), os resultados da BC (Gráfico 10C) e CN (Gráfico 10D) apresentaram uma menor toxicidade frente a *Artemia Salina*, mesmo em concentrações altas. Para a BC (Gráfico 10C), foi estabelecido concentrações de 100 a 1000 ppm, sendo a concentração de 1000 ppm ($p = 0,0074$) a menor capaz de causar maior mortalidade diante das *Artemias*. As concentrações de 1000 ($p < 0,0074$) e 750 ppm ($p < 0,0226$) apresentaram significância estatística quando comparado com o grupo controle. Sendo as concentrações de 550 ($p = 0,0667$), 350 ($p = 0,4287$), 250 ($p = 0,7878$), 150 ($p = 0,7878$) e 100 ppm ($p = 0,7878$), as que não apresentaram significância nos ensaios de toxicidade. Com valores de CL_{50} de 521,5 ppm ($R^2 = 0,5257$) em 24 horas de exposição. Já para a CN (Gráfico 10D), foram estabelecidas as concentrações de 100 a 1000 ppm, sendo a concentração de 350 ppm ($p = 0,0221$) a que obteve significância estatística comparada ao controle negativo, e a menor capaz de causar maior mortalidade frente as *Artemias*. As concentrações de 100 ($p = 0,9015$), 550 ($p = 0,2108$), 750

($p=0,9015$), 875 ($p=0,9015$), e 1000 ppm ($p=0,6567$) não apresentaram significância nos ensaios de toxicidade. Foi estabelecida uma CL_{50} , com valores de 598,2 ppm ($R^2 = 0,1584$) em 24 horas de exposição.

Targanski *et al.* (2021) retrata a utilização de chalconas em ensaios com organismos não alvos para avaliar níveis de toxicidade envolvidos. A toxicidade foi avaliada frente as microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e larvas de *G. mellonella*. Dez larvas saudáveis com 0,2–0,3g de peso. Posteriormente foram selecionadas e tratadas com 10 μ L da substância teste (chalconas), por 7 dias, no escuro, a 28 °C. Estabelecendo para controle negativo, DMSO (1,5%), e água destilada. O número sobre a mortalidade das larvas foram contados diariamente, para posterior síntese de uma curva de sobrevivência. Comparado com o grupo controle, as chalconas (Br, F e N) testadas não foram tóxicas para larvas de *G. mellonella* até o sétimo dia de tratamento ($p<0,05$), e para a microalga *Chlorella vulgaris* no período de 7 a 14 dias pós ensaio. A chalcona (F) aumentou significativamente o número de células de microalgas aos 14 dias pós-tratamento ($p<0,05$). As chalconas (Br e F) reduziram significativamente o número de células de *Scenedesmus obliquus* apenas aos 14 dias pós-tratamento ($p<0,05$). Sendo assim, as duas chalconas descritas, possuem citotoxicidade sobre as células de *Scenedesmus obliquus*, mesmo em períodos diferentes. Diferente da BC (Gráfico 9C) e CF (Gráfico 9B) evidenciadas nos ensaios diante da *Artemia Salina* anteriormente, ambas tiveram efeitos diferentes referentes a toxicidade, mesmo em altas concentrações, a BC (Gráfico 9C) não apresentou toxicidade mediante a *Artemia*. Enquanto que, a CF (Gráfico 9B) apresentou uma maior atividade sobre a mortalidade, evidenciando assim, como uma substância possivelmente tóxica, mesmo em concentrações baixas.

Já Almeida *et al.* (2018) utilizou de *Artemia salina* para os ensaios de toxicidade, As chalconas sintéticas foram analisadas utilizando náuplios de *Artemia salina* (Almeida *et al.*, 2017; Meyer *et al.*, 1982). Os ovos de *Artemia salina* foram eclodidos em solução salina por aproximadamente 48 horas, a 25°C. As concentrações teste variaram de 7 a 50 μ M. Os testes de toxicidade foram realizados no escuro em microplacas de 96 poços, e de 15–20 náuplios por poço. 13,6 μ M de $K_2Cr_2O_7$ foram incluídos como controle positivo e 1% de DMSO como controle negativo, e mortalidade avaliada por um período de 48 horas. Foi evidenciado que apenas uma chalcona, das três testadas, apresentou significância estatística quando comparada ao grupo controle ($p<0,01$). Mortalidade e toxicidade frente a *Artemia salina* foram observadas em concentrações de 25 e 50 μ mol.

6 CONCLUSÃO

Em resumo, os derivados de chalconas demonstraram significativa atividade inseticida e imunomoduladora frente ao *Ae. aegypti* em diferentes fases de desenvolvimento. As análises *in silico* indicaram maior estabilidade conformacional e menor energia de ligação quando comparadas ao composto co-cristalizado, sugerindo alta afinidade pelas estruturas-alvo do vetor. A atividade larvicida foi evidente, com maior mortalidade após 48 horas de exposição, reduzindo a CL₅₀. BC e CN apresentaram maior mortalidade no período de 24 horas de exposição nos bioensaios pupicida e adulticida. Houve alta redução na eclosão dos ovos, causando danos visíveis ao exocórrion, conforme análise por MEV. Na análise imunológica, as chalconas demonstraram aumento da quantificação de hemócitos e NO²⁻, exceto pela BCH, que diminuiu os hemócitos totais. Bioensaios com *Artemia salina* revelaram alta toxicidade pela CH e CF, enquanto que a BC e CN demonstraram baixa toxicidade, mesmo em altas concentrações.

Em conclusão, esses resultados destacam as chalconas como potenciais moléculas inseticidas e imunomoduladoras, com a necessidade de considerar sua toxicidade em organismos não-alvos para minimizar impactos ambientais. A combinação de estudos futuros é importante para compreender o papel das moléculas nos organismos testados e os mecanismos envolvidos com os ligantes descritos e as proteínas evidenciadas no presente estudo. No entanto, é necessário realizar otimizações estruturais nas moléculas para diminuir sua toxicidade e aumentar a seletividade desses compostos. Isto é vital para mitigar riscos potenciais decorrentes da resistência dos vetores e melhorar o seu desempenho mediante as formas de controle.

REFERÊNCIAS

- ABATZOPOULOS, Th J. *et al.* (Ed.). **Artemia: basic and applied biology**. Springer Science & Business Media, 2013.
- ABREU, Filipe Vieira Santos de *et al.* Influence of breeding site availability on the oviposition behaviour of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 669-676, 2015.
- AGUIAR, Breno S. *et al.* Potential risks of Zika and chikungunya outbreaks in Brazil: A modeling study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 70, p. 20-29, 2018.
- AL YAHYA, Hanan; SHAHER, Fekri M.; MAHYOUB, Jazem A. Larvicidal effects of some natural products on the *Aedes aegypti* mosquito, a vector of dengue fever and Zika virus. **Entomological Research**, v. 53, n. 5, p. 190-200, 2023.
- ALENCAR, Jeronimo *et al.* Microscopia eletrônica de varredura de ovos de *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae). **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 658-661, 2003.
- ALMEIDA, J. R. *et al.* Potential of synthetic chalcone derivatives to prevent marine biofouling. **Science of the total environment**, v. 643, p. 98-106, 2018.
- ALMEIDA, Joana R. *et al.* Antifouling potential of Nature-inspired sulfated compounds. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42424, 2017.
- AL-SINJARI, Sofyan HS *et al.* The Effects Of 2-Hydroxy Chalcone and its Derivative on The Larvae and Adults of *Tribolium Confusum*. **Science Journal of University of Zakho**, v. 7, n. 3, p. 75-78, 2019.
- ALVES, M. J. *et al.* Clinical presentation and laboratory findings for the first autochthonous cases of dengue fever in Madeira island, Portugal, October 2012. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 6, p. 20398, 2013.

ALVES, Robson Raion Vasconcelos *et al.* *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin damages exochorionic cells and binds to the serosal cuticle of *Aedes aegypti* eggs. *3 Biotech*, v. 12, n. 5, p. 109, 2022.

ALVES, Robson RV *et al.* Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. ***Pest management science***, v. 76, n. 2, p. 730-736, 2020.

ANDREW, J.; ANANYA BAR, Ananya Bar. Morphology and morphometry of *Aedes aegypti* adult mosquito. 2013.

BAR, Ananya; ANDREW, J. Morphology and morphometry of *Aedes aegypti* larvae. ***Annual review and Research in Biology***, v. 3, n. 1, p. 1-21, 2013.

BARLETTA, Ana Beatriz Ferreira *et al.* Emerging role of lipid droplets in *Aedes aegypti* immune response against bacteria and Dengue virus. ***Scientific reports***, v. 6, n. 1, p. 19928, 2016.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; CAM, Química Medicinal. As bases moleculares da ação dos fármacos. ***Química Medicinal, Editora ArtMed Ltda.: Porto Alegre***, 2001.

BECKAGE, Nancy E. (Ed.). ***Insect immunology***. Academic press, 2011.

BECKMAN, Joseph S. *et al.* Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, v. 87, n. 4, p. 1620-1624, 1990.

BEGUM, Naznin A. *et al.* Mosquito larvicidal studies of some chalcone analogues and their derived products: structure–activity relationship analysis. ***Medicinal chemistry research***, v. 20, p. 184-191, 2011.

BENNETT, Kelly L. et al. High infestation of invasive *Aedes* mosquitoes in used tires along the local transport network of Panama. **Parasites & vectors**, v. 12, p. 1-10, 2019.

BERGMANN, Stella *et al.* Influence of RVFV infection on olfactory perception and behavior in *Drosophila melanogaster*. **Pathogens**, v. 12, n. 4, p. 558, 2023.

BERGMANN, Stella *et al.* Localization of nitric oxide–producing hemocytes in *Aedes* and *Culex* mosquitoes infected with bacteria. **Cell and Tissue Research**, p. 1-14, 2024.

BERGMANN, Stella *et al.* NO synthesis in immune-challenged locust hemocytes and potential signaling to the CNS. **Insects**, v. 12, n. 10, p. 951, 2021.

BERNSTEIN, Frances C. *et al.* The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. **Journal of molecular biology**, v. 112, n. 3, p. 535-542, 1977.

BIAN, Guowu *et al.* Transgenic alteration of Toll immune pathway in the female mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 38, p. 13568-13573, 2005.

BLANDIN, Stephanie A.; LEVASHINA, Elena A. Phagocytosis in mosquito immune responses. **Immunological reviews**, v. 219, n. 1, p. 8-16, 2007.

BLITZER, E. J.; VYAZUNOVA, I.; LAN, Q. Functional analysis of AeSCP-2 using gene expression knockdown in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect molecular biology**, v. 14, n. 3, p. 301-307, 2005.

BOVA, Jake; PAULSON, Sally; PAULSON, Greg. Morphological differentiation of the eggs of North American container-inhabiting *Aedes* mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 32, n. 3, p. 244-246, 2016.

BRAGA, Ima Aparecida; VALLE, Denise. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.

BRASAEMLE, Dawn L. *et al.* Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46835-46842, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Monitoramento das arboviroses e balanço de encerramento do Comitê de Operações de Emergência (COE) Dengue e outras Arboviroses 2024. Brasília, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/boletins/edicoes/2024>. Acesso em: 22 jul. 2024.

CARVALHO, Fabiano Duarte; MOREIRA, Luciano Andrade. Why is *Aedes aegypti* *Linnaeus* so Successful as a Species?. **Neotropical entomology**, v. 46, n. 3, p. 243-255, 2017.

CASTILLO, J. C.; ROBERTSON, A. E.; STRAND, M. R. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 36, n. 12, p. 891-903, 2006.

CHAVASSE, Desmond C. *et al.* **Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance**. World Health Organization, 1997.

CHAVES, Maurício de Oliveira; EVANGELISTA, Maria do Socorro Nantua; FERNANDES, Fernanda Monteiro de Castro. Health education in *Aedes aegypti*: case study. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 73, p. e20180487, 2020.

CHEN, Kangkang *et al.* Nitric oxide-induced calcineurin a mediates antimicrobial peptide production through the IMD pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 905419, 2022.

CONSOLI, Rotraut AGB; OLIVEIRA, Ricardo Lourenço de. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora Fiocruz, 1994.

CONSTANTINESCU, Teodora; LUNGU, Claudiu N. Anticancer activity of natural and synthetic chalcones. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 21, p. 11306, 2021.

CRIEL, Godelieve RJ. Morphology of *Artemia*. In: **Artemia biology**. CRC Press, 2018. p. 119-154.

CRISTINA, Benatti *et al.* Identification and characterization of the kynurenine pathway in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 15617, 2022.

CRUZ-CASTILLO, Adrián Ulises *et al.* Terpenic constituents of essential oils with larvicidal activity against *Aedes Aegypti*: a QSAR and docking molecular study. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2454, 2023.

CUELLAR, José E. *et al.* Coumaro-chalcones synthesized under solvent-free conditions as potential agents against malaria, leishmania and trypanosomiasis. **Heliyon**, v. 8, n. 2, 2022.

DA SILVA BATISTA, Kate Katherine *et al.* Nitric oxide effects on *Rhodnius prolixus*'s immune responses, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* development. **Journal of Insect Physiology**, v. 126, p. 104100, 2020.

DAVID, Mariana Rocha; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, Ricardo; FREITAS, Rafael Maciel de. Container productivity, daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* mosquitoes in a high income dengue epidemic neighbourhood of Rio de Janeiro: presumed influence of differential urban structure on mosquito biology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 927-932, 2009.

DE AZEVEDO, Jr; WALTER, F. MolDock applied to structure-based virtual screening. **Current drug targets**, v. 11, n. 3, p. 327-334, 2010.

DE CASTRO, Luis Antônio Suita. Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura. 2002.

DE GREGORIO, Ennio *et al.* An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. **Developmental cell**, v. 3, n. 4, p. 581-592, 2002.

DE SANTIAGO-SILVA, Kaio Maciel *et al.* Antileishmanial activity of 4, 8-Dimethoxynaphthalenyl chalcones on *Leishmania amazonensis*. **Antibiotics**, v. 11, n. 10, p. 1402, 2022.

DEDAVID, Berenice Anina; GOMES, Carmem Isse; MACHADO, Giovanna. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. **EdiPUCRS**, 2007.

DEVI, Ahanthem Priyanca *et al.* Bis-and mono-substituted Chalcones exert anti-feedant and toxic effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 10, p. 5754-5759, 2021.

DEVILLERS, J. *et al.* In silico models for predicting vector control chemicals targeting *Aedes aegypti*. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 25, n. 10, p. 805-835, 2014.

DHENNI, Rama *et al.* Comparative cytokine profiling identifies common and unique serum cytokine responses in acute chikungunya and dengue virus infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, p. 1-13, 2021.

DOS SANTOS, Daiane Rodrigues *et al.* New weapons against the disease vector *Aedes aegypti*: From natural products to nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 123221, 2023.

DRIF, L.; BREHÉLIN, M. The circulating hemocytes of *Culex pipiens* and *Aedes aegypti*: Cytology histochemistry, hemograms and functions. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 7, n. 4, p. 687-690, 1983.

DYER, David H. *et al.* The structural determination of an insect sterol carrier protein-2 with a

ligand-bound C16 fatty acid at 1.35-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 40, p. 39085-39091, 2003.

E SÁ, Fernanda Hohana Almeida *et al.* A chalcone identified by in silico and in vitro assays possesses high larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Acta Tropica**, v. 238, p. 106791, 2023.

EKINCI, Deniz (Ed.). **Medicinal chemistry and drug design**. BoD–Books on Demand, 2012.

ELIAS, D. W.; BEAZELY, M. A.; KANDEPU, N. M. Bioactivities of chalcones. **Current medicinal chemistry**, v. 6, n. 12, p. 1125, 1999.

ELPHICK, Maurice R.; WILLIAMS, Les; O'SHEA, Michael. New features of the locust optic lobe: evidence of a role for nitric oxide in insect vision. *Journal of Experimental Biology*, v. 199, n. 11, p. 2395-2407, 1996.

ESTÉVEZ-LAO, Tania Y. *et al.* Nitric oxide produced by periosial hemocytes modulates the bacterial infection-induced reduction of the mosquito heart rate. **Journal of Experimental Biology**, v. 223, n. 15, p. jeb225821, 2020.

ESTÉVEZ-LAO, Tania Y. *et al.* Nitric oxide produced by periosial hemocytes modulates the bacterial infection-induced reduction of the mosquito heart rate. *Journal of Experimental Biology*, v. 223, n. 15, p. jeb225821, 2020.

FALKENBERG, Mirian Benites *et al.* Educação em saúde e educação na saúde: conceitos e implicações para a saúde coletiva. **Ciência & saúde coletiva**, v. 19, p. 847-852, 2014.

FANG, Xianwen *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of novel chalcone derivatives. **Research on Chemical Intermediates**, v. 40, p. 1715-1725, 2014.

FARALDO, Ana Carolina *et al.* Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast

inoculation. **Nitric Oxide**, v. 13, n. 4, p. 240-246, 2005.

FARALDO, Ana Carolina *et al.* Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. **Nitric Oxide**, v. 13, n. 4, p. 240-246, 2005.

FARJANA, Thahsin; TUNO, Nobuko. Multiple blood feeding and host-seeking behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 50, n. 4, p. 838-846, 2013.

FAULL, Katherine J.; WILLIAMS, Craig R. Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae) eggs using scanning electron microscopy. **Arthropod Structure & Development**, v. 45, n. 3, p. 273-280, 2016.

FERNANDES, Diégina Araújo *et al.* Estudos fitoquímico e biológico de *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) nos estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). 2021.

FERNANDES, Diegina A. *et al.* Larvicidal Compounds Extracted from *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) Evaluated against *Aedes aegypti* L. **Molecules**, v. 24, n. 12, p. 2315, 2019.

FERNANDES, Diégina Araújo *et al.* Ovicidal, pupicidal, adulticidal, and repellent activity of *Helicteres velutina* K. Schum against *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, 2021.

FIRMINO, Pollyana P. *et al.* Synthesis, molecular structure, thermal and spectroscopic analysis of a novel bromochalcone derivative with larvicidal activity. **Crystals**, v. 12, n. 4, p. 440, 2022.

FRANÇA, Leandro Pereira *et al.* Avaliação da atividade larvicida de extratos e óleo essencial de *Piper capitarianum* Yunck, 1966 (Piperaceae) sobre *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 e *Anopheles* sp (Culicidae) em laboratório. 2015.

GALLOWAY, Tamara S.; DEPLEDGE, Michael H. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology*, v. 10, p. 5-23, 2001.

GHARAGHANI, S.; KHAYAMIAN, T.; EBRAHIMI, M. Molecular dynamics simulation study and molecular docking descriptors in structure-based QSAR on acetylcholinesterase (AChE) inhibitors. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 24, n. 9, p. 773-794, 2013.

GHAZAWY, N. A. *et al.* Efficacy of ozone on mortality, super oxide dismutases, nitric oxide enzymes and ultrastructural alterations on some stored product insect larvae in Egypt. *African Entomology*, v. 29, n. 1, p. 17-31, 2021.

GOLDSTEIN, Joseph I. *et al.* **Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis**. springer, 2017.

GOMES, Marcelo N. *et al.* Chalcone derivatives: promising starting points for drug design. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1210, 2017.

GREEN, Laura C. *et al.* Nitrate biosynthesis in man. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 12, p. 7764-7768, 1981.

GROSS, Aaron D. *et al.* Toxicity and synergistic activities of chalcones against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). **Journal of medical entomology**, v. 54, n. 2, p. 382-386, 2017.

GUERRA, Thamila Menezes. **Estudos de docking molecular de derivados da tiazolidina como potenciais inibidores da enzima cruzaina de trypanosoma cruz**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. Brasil.

GUNARA, Nikko Prayudi; JOELIANTO, Endra; AHMAD, Intan. Identification of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* eggs based on image processing and elliptic fourier

analysis. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 17395, 2023.

GUTU, Mulugeta Asefa *et al.* Another dengue fever outbreak in Eastern Ethiopia—An emerging public health threat. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 1, p. e0008992, 2021.

HAHN, Ulrike K.; BENDER, Randall C.; BAYNE, Christopher J. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 778-785, 2001.

HAN, Qian *et al.* Crystal structures of *Aedes aegypti* kynurenine aminotransferase. **The FEBS journal**, v. 272, n. 9, p. 2198-2206, 2005.

HAN, Qian *et al.* Structural insight into the mechanism of substrate specificity of *Aedes* kynurenine aminotransferase. **Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 1622-1630, 2008.

HANDEL, Klaus *et al.* *Tribolium* embryogenesis: a SEM study of cell shapes and movements from blastoderm to serosal closure. **Development genes and evolution**, v. 210, p. 167-179, 2000.

HARRINGTON, Laura C.; EDMAN, John D.; SCOTT, Thomas W. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood?. **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 3, p. 411-422, 2001.

HERRERA-ORTIZ, Antonia *et al.* The effect of nitric oxide and hydrogen peroxide in the activation of the systemic immune response of *Anopheles albimanus* infected with *Plasmodium berghei*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 1, p. 44- 50, 2011.

HILLS, Susan. Chikungunya epidemiology in US territories and states with risk of transmission. 2024.

HILLYER, Julián F.; CHRISTENSEN, Bruce M. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Histochemistry and cell biology**, v. 117, p. 431-440, 2002.

HOSEINI, Seyyed Morteza *et al.* Physiological roles of tryptophan in teleosts: current knowledge and perspectives for future studies. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 1, p. 3-24, 2019.

HOSSAIN, Md Shakhawat *et al.* *Aedes* larva detection using ensemble learning to prevent dengue endemic. **BioMedInformatics**, v. 2, n. 3, p. 405-423, 2022.

HUANG, Zishu *et al.* Modulation of crustacean innate immune response by amino acids and their metabolites: inferences from other species. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 574721, 2020.

IMAM, Hashmat *et al.* The basic rules and methods of mosquito rearing (*Aedes aegypti*). **Tropical parasitology**, v. 4, n. 1, p. 53, 2014.

INSUASTY, Braulio *et al.* An efficient synthesis of new caffeine-based chalcones, pyrazolines and pyrazolo [3, 4-b][1, 4] diazepines as potential antimalarial, antitrypanosomal and antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 93, p. 401-413, 2015.

ISOE, Jun *et al.* Identification and characterization of a mosquito-specific eggshell organizing factor in *Aedes aegypti* mosquitoes. **PLoS biology**, v. 17, n. 1, p. e3000068, 2019.

JOVÉ, Veronica *et al.* Sensory discrimination of blood and floral nectar by *Aedes aegypti* mosquitoes. **Neuron**, v. 108, n. 6, p. 1163-1180. e12, 2020.

KALIRAJAN, R.; JUBIE, S.; GOWRAMMA, B. Microwave Irradated Synthesis, Characterization and Evaluation for Their Antibacterial and Larvicidal Activities of Some Novel Chalcone and Isoxazole Substituted 9-Anilino Acridines. **Peertechz J Med Chem Res**

1 (1): 001, v. 7, n. 001, 2015.

KAR, Ashutosh. **Medicinal chemistry**. New Age International, 2005.

KIM, Min-Sik; LAN, Que. Sterol carrier protein-x gene and effects of sterol carrier protein-2 inhibitors on lipid uptake in *Manduca sexta*. **BMC physiology**, v. 10, p. 1-15, 2010.

KIM, Min-sik; WESSELY, Vilena; LAN, Que. Identification of mosquito sterol carrier protein-2 inhibitors. **Journal of lipid research**, v. 46, n. 4, p. 650-657, 2005.

KNOCHEL, Paul; MOLANDER, Gary A. **Comprehensive organic synthesis**. Newnes, 2014.

KRAEMER, Moritz UG *et al.* The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. **Scientific data**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2015.

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

KUMAR, Ankit *et al.* Mosquito innate immunity. **Insects**, v. 9, n. 3, p. 95, 2018.

KUZIN, Boris *et al.* Nitric oxide regulates cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell*, v. 87, n. 4, p. 639-649, 1996.

LAN, Que; MASSEY, Randall J. Subcellular localization of the mosquito sterol carrier protein-2 and sterol carrier protein-x. **Journal of lipid research**, v. 45, n. 8, p. 1468-1474, 2004.

LAPORTA, Gabriel Z. *et al.* Global distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a climate change scenario of regional rivalry. **Insects**, v. 14, n. 1, p. 49, 2023.

LEE, Seok-Hee *et al.* Insect growth regulatory and larvicidal activity of chalcones against *Aedes albopictus*. **Entomological Research**, v. 48, n. 1, p. 55-59, 2018.

LETA, Samson *et al.* Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **International journal of infectious diseases**, v. 67, p. 25-35, 2018.

LI, Jianyong; LI, Guoyu. Transamination of 3-hydroxykynurenine to produce xanthurenic acid: a major branch pathway of tryptophan metabolism in the mosquito, *Aedes aegypti*, during larval development. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 27, n. 10, p. 859-867, 1997.

LIN, Hai-Yan *et al.* A peroxisomal sterol carrier protein 2 (Scp2) contributes to lipid trafficking in differentiation and virulence of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 158, p. 103651, 2022.

LINLEY, John R. Comparative fine structure of the eggs of *Aedes albopictus*, *Ae. aegypti*, and *Ae. bahamensis* (diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 26, n. 6, p. 510-521, 1989.

LOWENBERGER, Carl. Innate immune response of *Aedes aegypti*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 31, n. 3, p. 219-229, 2001.

MACIEL, Larissa G. *et al.* A second generation of 1, 2, 4-oxadiazole derivatives with enhanced solubility for inhibition of 3-hydroxykynurenine transaminase (HKT) from *Aedes aegypti*. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 222-236, 2021.

MACIEL, Larissa G. *et al.* Inhibition of 3-Hydroxykynurenine Transaminase from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*: A mosquito-specific target to combat the transmission of arboviruses. **ACS bio & med Chem Au**, v. 3, n. 2, p. 211-222, 2023.

MAHAPATRA, Debarshi Kar; BHARTI, Sanjay Kumar; ASATI, Vivek. Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. **European journal of medicinal**

chemistry, v. 98, p. 69-114, 2015.

MANTZANIDOU, Martha; PONTIKI, Eleni; HADJIPAVLOU-LITINA, Dimitra. Pyrazoles and pyrazolines as anti-inflammatory agents. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3439, 2021.

MATTHEWS, Benjamin J. *Aedes aegypti*. **Trends in Genetics**, v. 35, n. 6, p. 470-471, 2019.

MCCARTHY, Mary K. *et al.* MyD88-dependent influx of monocytes and neutrophils impairs lymph node B cell responses to chikungunya virus infection via Irf5, Nos2 and Nox2. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 1, p. e1008292, 2020.

MENDES, Luiza Alves *et al.* Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 684-689, 2017.

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

MOHAMED, Mamdouh FA; ABUO-RAHMA, Gamal El-Din A. Molecular targets and anticancer activity of quinoline–chalcone hybrids: Literature review. **RSC advances**, v. 10, n. 52, p. 31139-31155, 2020.

MONAGHAN, Pat; METCALFE, Neil B.; TORRES, Roxana. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology letters*, v. 12, n. 1, p. 75-92, 2009.

MORAIS, H. L. M DO N. *et al.* Hydroalcoholic extract of *Caryocar brasiliense* Cambess. leaves affect the development of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

MORTON, David B.; HUDSON, Martin L. Cyclic GMP regulation and function in insects. 2002.

MUNDIM, ANA PAULA MIRANDA. *Aedes aegypti*: morfologia, morfometria do ovo, desenvolvimento embrionário e aspectos relacionados à vigilância entomológica no Município de São Paulo. 2016.

MUNDIM-POMBO, Ana Paula Miranda *et al.* *Aedes aegypti*: egg morphology and embryonic development. **Parasites & vectors**, v. 14, p. 1-12, 2021.

MUNTEANU, Constantin; DUMITRAȘCU, Mioara; BIOSAFETY, S. C. *Artemia salina*. **Balneo-Research Journal**, v. 2, p. 119-122, 2011.

NASCIMENTO, G. J. *et al.* Repellence and insecticidal activity mediated by necrosis in *Aedes aegypti* mosquitoes exposed to thymol. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 76, p. 77-83, 2024.

NORMAN, Richard OC. **Principles of organic synthesis**. Routledge, 2017.

NOWAKOWSKA, Zdzisława. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European journal of medicinal chemistry**, v. 42, n. 2, p. 125-137, 2007.

NUNES, F. C. *et al.* Biotecnologia no controle de mosquitos transmissores de arboviroses bioensaios para avaliação da atividade inseticida em mosquitos adultos. **As Ciências Biológicas e da Saúde na Contemporaneidade**, v. 2, 2019.

NUNES, Fabiola C. *et al.* The larvicidal activity of *Agave sisalana* against L4 larvae of *Aedes aegypti* is mediated by internal necrosis and inhibition of nitric oxide production. **Parasitology research**, v. 114, n. 2, p. 543-549, 2015.

NUNES, Fabíola da Cruz *et al.* Estudo da atividade larvicida da *Agave sisalana* contra *Aedes Aegypti*. 2013.

OLIVEIRA, Boaz G.; ARAÚJO, Regiane CMU. SAPT: ligação de hidrogênio ou interação de van der Waals?. **Química Nova**, v. 35, p. 2002-2012, 2012.

OLIVEIRA, Luana Marilia Santos *et al.* Synthesis of Natural Product Derivatives as Larvicides Against *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 34, n. 1, p. 48-64, 2024.

PANG, Yuning *et al.* High fat activates O-GlcNAcylation and affects AMPK/ACC pathway to regulate lipid metabolism. **Nutrients**, v. 13, n. 6, p. 1740, 2021.

PATRICK, Graham L. **An introduction to medicinal chemistry**. Oxford university press, 2023.

PEREIRA, Álvaro Itaúna Schalcher *et al.* Antimicrobial activity in fighting mosquito larvae *Aedes aegypti*: Homogenization of essential oils of linalool and eugenol. **Educación química**, v. 25, n. 4, p. 446-449, 2014.

PEREIRA, Vinicius RD *et al.* *In vitro* and *in vivo* antischistosomal activities of chalcones. **Chemistry & Biodiversity**, v. 15, n. 12, p. e1800398, 2018.

POLANCZYK, Ricardo Antonio; GARCIA, Marcelo de Oliveira; ALVES, Sérgio Batista. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de saúde pública**, v. 37, p. 813-816, 2003.

POMBO, Ana Paula Miranda Mundim *et al.* *Aedes Aegypti*: morphology the egg and embryonic development. **Parasites & Vectors**, 2021.

POWELL, Jeffrey R. Mosquito-borne human viral diseases: why *Aedes aegypti*?. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 98, n. 6, p. 1563, 2018.

PRASAD, Ganji Lakshmi Vara *et al.* Effects of naloxone, serotonin, and dopamine on reproduction of the freshwater crab *Barytelphusa guerini*. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 321, n. 3, p. 173-182, 2014.

PRASAD, Y. Rajendra; RAO, A. Lakshmana; RAMBABU, R. Synthesis and antimicrobial activity of some chalcone derivatives. **Journal of Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 461-466, 2008.

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

RAO, M. Rajesh Kumar; KUMAR, Rajesh. Lethal efficacy of phytochemicals as sustainable sources of insecticidal formulations derived from the leaf extracts of Indian medicinal plants to control Dengue and Zika vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **International research Journal of Environmental Science**, v. 9, n. 2, p. 1-9, 2020.

RAWSON, Robert B. The SREBP pathway—insights from Insigs and insects. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 4, n. 8, p. 631-640, 2003.

REZENDE, Gustavo Lazzaro *et al.* Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. **BMC developmental biology**, v. 8, p. 1-14, 2008.

RIVERO, Ana. Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 5, p. 219-225, 2006.

ROCHLIN, Ilia *et al.* Climate change and range expansion of the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) in Northeastern USA: implications for public health practitioners. **PLoS one**, v. 8, n. 4, p. e60874, 2013.

RODRIGUES, Francisco; CAMPINO, Andre; COELHO, Patricia. Epidemiology of dengue in Portugal—a portrait. **Caderno de ANAIS HOME**, 2023.

ROIZ, David *et al.* Integrated *Aedes* management for the control of *Aedes*-borne diseases. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 12, p. e0006845, 2018.

ROLANDELLI, Agustín *et al.* Modulation of IMD, Toll, and Jak/STAT immune pathways genes in the fat body of *Rhodnius prolixus* during *Trypanosoma rangeli* infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 598526, 2021.

ROZMER, Zsuzsanna; PERJÉSI, Pál. Naturally occurring chalcones and their biological activities. **Phytochemistry reviews**, v. 15, p. 87-120, 2016.

RÜCKERT, Claudia; EBEL, Gregory D. How do virus–mosquito interactions lead to viral emergence?. **Trends in parasitology**, v. 34, n. 4, p. 310-321, 2018.

RUIZ HIDALGO, José *et al.* Synthetic bis-and mono-chalcones with insecticide effects on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **International journal of pest management**, v. 66, n. 2, p. 116-121, 2020.

RUKA, Kristen A.; MILLER, Anna P.; BLUMENTHAL, Edward M. Inhibition of diuretic stimulation of an insect secretory epithelium by a cGMP-dependent protein kinase. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 304, n. 9, p. F1210-F1216, 2013.

SADEKUZZAMAN, Md; KIM, Yonggyun. Nitric oxide mediates antimicrobial peptide gene expression by activating eicosanoid signaling. **PLoS One**, v. 13, n. 2, p. e0193282, 2018.

SANTOS, Edilson Alves dos *et al.* Bioactivity evaluation of plant extracts used in indigenous medicine against the snail, *Biomphalaria glabrata*, and the larvae of *Aedes aegypti*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

SATYAVANI, Susarla R. *et al.* Synthesis and mosquito larvicidal activity of furanochalcones and furanoflavonoids analogous to karanjin. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, p. 842-850, 2015.

SCHAPER, Stefan; HERNÁNDEZ-CHAVARRÍA, Francisco. Scanning electron microscopy of the four larval instars of the Dengue fever vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista de biología tropical**, v. 54, n. 3, p. 847-852, 2006.

SCOTTI, Marcus Tullius *et al.* MolPredictX: Online biological activity predictions by machine learning models. **Molecular Informatics**, 2022.

SEEBACH, Dieter. Organic synthesis—where now?. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 29, n. 11, p. 1320-1367, 1990.

SEGALL, Matthew D.; BARBER, Chris. Addressing toxicity risk when designing and selecting compounds in early drug discovery. **Drug discovery today**, v. 19, n. 5, p. 688-693, 2014.

SHAKER, Bilal *et al.* *In silico* methods and tools for drug discovery. **Computers in biology and medicine**, v. 137, p. 104851, 2021.

SHIN, Sang Woon *et al.* REL1, a homologue of *Drosophila* dorsal, regulates toll antifungal immune pathway in the female mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 16, p. 16499-16507, 2005.

SILVA, B.G. Quantificação de apoptose e necrose mediante corantes fluorescentes e análise de imagens no cultivo de células de inseto: o caso da *Drosophila melanogaster* S2. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)**. São Carlos, SP, 2007.

SILVA, Fabíola J. *et al.* Chalcone analogues: Synthesis, activity against *Meloidogyne incognita*, and *in silico* interaction with cytochrome P450. **Journal of Phytopathology**, v. 167, n. 4, p. 197-208, 2019.

SILVEIRA, Daniella Patrícia Brandão *et al.* ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti* L.(Culicidae) E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE PARTES AÉREAS DE *Baccharis trimera* (Less) DC. 2018.

SINGH, Manjinder; KAUR, Maninder; SILAKARI, Om. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. **European journal of medicinal chemistry**, v. 84, p. 206-239, 2014.

SMITH, Michael. **Organic synthesis**. Academic Press, 2016.

SOHAIL, Asma *et al.* The epidemiology of imported and locally acquired dengue in Australia, 2012–2022. **Journal of Travel Medicine**, v. 31, n. 2, p. taee014, 2024.

SONG, Yan *et al.* The key role of fatty acid synthase in lipid metabolism and metamorphic development in a destructive insect pest, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9064, 2022.

SOUNDRAVALLY, R. *et al.* Association between proinflammatory cytokines and lipid peroxidation in patients with severe dengue disease around defervescence. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 18, p. 68-72, 2014.

SOUSA, Patrícia Alexandria Paiva Silva de. Avaliação da atividade inseticida do extrato liofilizado de *Agave sisalana* no desenvolvimento de um bioinseticida para o *Aedes aegypti*. Trabalho de conclusão de curso. 2017

SOUZA, Raquel Santos *et al.* Microorganism-based larval diets affect mosquito development, size and nutritional reserves in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 152, 2019.

SOUZA-NETO, Jayme A.; POWELL, Jeffrey R.; BONIZZONI, Mariangela. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. **Infection, genetics and evolution**, v. 67, p. 191-209, 2019.

STRAND, Michael R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect immunology**, v. 32, p. 25-47, 2008.

SUKKAR, Dani *et al.* Differential production of nitric oxide and hydrogen peroxide among *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, and *Mamestra brassicae* immune-activated hemocytes after exposure to imidacloprid and amitraz. **Insects**, v. 14, n. 2, p. 174, 2023.

TALELE, Tanaji T.; KHEDKAR, Santosh A.; RIGBY, Alan C. Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 10, n. 1, p. 127-141, 2010.

TARGANSKI, Sabrina K. *et al.* Larvicidal activity of substituted chalcones against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and non-target organisms. **Pest management science**, v. 77, n. 1, p. 325-334, 2021.

TATUM, Natalie J. *et al.* New active leads for tuberculosis booster drugs by structure-based drug discovery. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 15, n. 48, p. 10245-10255, 2017.

TERRA, Márcia Regina *et al.* *Aedes aegypti* e as arbovíroses emergentes no Brasil. **Uningá review**, v. 30, n. 3, 2017.

THOMAS, Gareth. **Medicinal chemistry: an introduction**. John Wiley & Sons, 2011.

THOMSEN, René; CHRISTENSEN, Mikael H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, 2006.

VALLE, D. *et al.* Mosquito embryos and eggs: polarity and terminology of chorionic layers. **Journal of insect physiology**, v. 45, n. 8, p. 701-708, 1999.

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

VEERAMANI, T. *et al.* Introduction to *Artemia* culture. **Basic and Applied Zooplankton Biology**, p. 209-224, 2019.

VIEIRA, Cecilia S. *et al.* *Rhodnius prolixus* interaction with *Trypanosoma rangeli*:

modulation of the immune system and microbiota population. **Parasites & vectors**, v. 8, p. 1-13, 2015.

WATT, Ian M. The principles and practice of electron microscopy. **Cambridge University Press**. 1997.

WEBER, Alexander NR *et al.* Binding of the *Drosophila* cytokine Spätzle to Toll is direct and establishes signaling. **Nature immunology**, v. 4, n. 8, p. 794-800, 2003.

WHITTEN, Miranda *et al.* Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 5, p. 440-452, 2007.

WHO – World Health Organization. Guidelines for laboratory and field-testing of mosquito larvicides. Control of neglected tropical diseases. **WHO/CDS/CPC/MAL/13.12.**, Geneva, 41 pp, 2015.

WONG, Jacklyn *et al.* Oviposition site selection by the dengue vector *Aedes aegypti* and its implications for dengue control. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 4, p. e1015, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. World Health Organization, 2005.

WOYESSA, Abyot Bekele *et al.* The first acute febrile illness investigation associated with dengue fever in Ethiopia, 2013: a descriptive analysis. **The Ethiopian Journal of Health Development**, v. 28, n. 3, 2014.

WRONSKA, Anna Katarzyna *et al.* Lipids as a key element of insect defense systems. **Frontiers in Genetics**, v. 14, p. 1183659, 2023.

YANG, Xiaomin *et al.* Ovicidal activity of spirotetramat and its effect on hatching, development and formation of *Frankliniella occidentalis* egg. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1,

p. 20751, 2021.

YANG, Xiaozhen *et al.* Effect of dietary L-tryptophan on the survival, immune response and gut microbiota of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Fish & shellfish immunology**, v. 84, p. 1007-1017, 2019.

YÜCETEPE, Sümeyye *et al.* Insecticidal effect of new synthesized chalcone derivatives on Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, n. 0, 2024.

ZAMAN, M. S.; MITRA, Amal K. Dengue in Bangladesh and neighboring countries: an overview of epidemiology, transmission, control, and prevention. **IMC J Med Sci**, v. 18, n. 1, p. 012, 2024.

ZARA, Ana Laura de Sene Amâncio *et al.* Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.

ZERFU, Biruk; KASSA, Tesfu; LEGESSE, Mengistu. Epidemiology, biology, pathogenesis, clinical manifestations, and diagnosis of dengue virus infection, and its trend in Ethiopia: a comprehensive literature review. **Tropical Medicine and Health**, v. 51, n. 1, p. 11, 2023.

ZHANG, Wei *et al.* Comparative transcriptomic analysis of immune responses of the migratory locust, *Locusta migratoria*, to challenge by the fungal insect pathogen, *Metarhizium acridum*. **BMC genomics**, v. 16, p. 1-21, 2015.

ZHANG, Wei; CUE, Berkeley W. (Ed.). **Green techniques for organic synthesis and medicinal chemistry**. John Wiley & Sons, 2018.

ZHUANG, Chunlin *et al.* Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. **Chemical reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762-7810, 2017.