



**JULIANA DE OLIVEIRA SILVA GIACOPPO**

**MODELAGEM DE TETRAIDROQUINOLINAS: EFEITO  
LARVICIDA e ADULTICIDA EM *Aedes aegypti***

**LAVRAS-MG  
2017**

**JULIANA DE OLIVEIRA SILVA GIACOPPO**

**MODELAGEM DE TETRAIDROQUINOLINAS: EFEITO  
LARVICIDA e ADULTICIDA EM *Aedes aegypti***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Agroquímica, área de concentração em  
Agroquímica para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Giacoppo, Juliana de Oliveira Silva.

Modelagem de tetraidroquinolinas: efeito larvicida e adulticida  
em *Aedes aegypti* / Juliana de Oliveira Silva Giacoppo. - 2017.  
137 p. : il.

Orientador(a): Teodorico de Castro Ramalho.

.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.  
Bibliografia.

1. *Aedes aegypti*. 2. Tetraidroquinolinas. 3. Modelagem  
molecular. I. Ramalho, Teodorico de Castro. . II. Título.

**JULIANA DE OLIVEIRA SILVA GIACOPPO**

**MODELAGEM DE TETRAIDROQUINOLINAS: EFEITO LARVICIDA e  
ADULTICIDA EM *Aedes aegypti***  
**MODELING OF TETRAHYDROQUINOLINES: LARVICIDE and ADULTICIDE  
EFFECT IN *Aedes aegypti***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Agroquímica, área de concentração em  
Agroquímica para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2017.

Dr <sup>a</sup> . Joziana Muniz de Paiva Barçante	UFLA
Dr <sup>a</sup> . Kátia Julia de Almeida	UFLA
Dr. Matheus Puggina de Freitas	UFLA
Dr. Felipe de Almeida La Porta	UTFPR
Dr. Robson Ricardo Teixeira	UFV

Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2017**

*Àquele que ERA, que É e quem sempre SERÁ!*

*Ao Deus da minha vida!*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Ao único e soberano DEUS, que me resgatou e a cada dia me dá mais um fôlego de vida. Aquele que é merecedor de toda honra, glória e louvor. Ao exemplo de doutor em quem tento me inspirar todos os dias.

Aos meus pais Jurandir e Jovita, que se doaram a mim e me incentivaram a continuar nessa caminhada. É por eles que comecei e para eles que terminei. O mérito é todinho de vocês. Valeu a pena cada sacrifício e hoje vocês podem contemplar essa vitória.

Aos meus irmãos Juliano, Jacqueline e Marcelo, minha cunhada Flávia e meus sobrinhos Otávio e Rafael. Vocês são parte de mim. Agradeço pela paciência e pelo incentivo. Nossa união nos dá força para fazer tudo o que for necessário. Aprendemos juntos que a família é a coisa mais importante de nossas vidas e isso é nosso maior diploma. Ao meu Cunhado Francesco e sogros, Antonina e Domenico pelas orações, preocupação e pela força. Mesmo longe sinto o carinho e o cuidado de vocês.

Ao meu amado esposo Carmelo Giacoppo. Como agradecer a você? Você esteve presente a cada segundo dessa caminhada, me suportando, incentivando, compreendendo, se calando quando podia gritar, oferecendo ajuda mesmo sabendo que não poderia ajudar. Você foi parte essencial dessa etapa e pra você dedico essa conquista. Se não fosse seu apoio todos os dias não teria chegado ao fim. Te amo!

Por fim dedico àqueles que entraram na minha vida durante essa caminhada e mudaram todo o curso da minha existência, me transformaram por completo, Thallis e Luigi. Confesso que diversas vezes pensei em desistir, mas cada dia ao chegar em casa e vê-los correndo ao meu encontro me fazia acreditar que valeria a pena fazer tudo isso para oferecer a vocês o melhor. E me comprometo a fazer por toda minha vida tudo o que for necessário para vê-los sorrindo.

Aos meus queridos amigos do Grupo de Química Computacional pela amizade acima de tudo, pelo apoio, compreensão e por toda ajuda. Em especial a Daiana por estar sempre ao meu lado desde a graduação e a Letícia por não me medir esforços para me ajudar. Você foi parte essencial desta etapa Le.

Aos professores Moacyr, Fernando, Joziana e ao Juliano pela parceria.

Aos colegas e amigos do Departamento de Engenharia pela compreensão e incentivo, em especial ao Israel e Maradona.

Ao meu orientador, Teodorico por acreditar no meu potencial e por todos os conselhos (até mesmo pessoais) e ensinamentos que sempre farão parte da minha caminhada.

Aos membros da banca, professores Joziana, Matheus, Katia, Felipe e Robson pela disposição e pelas considerações que certamente complementarão meu trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Química pela oportunidade e pelos 10 anos de aprendizado.

À CAPES pelo financiamento dos recursos necessários para o desenvolvimento do presente trabalho.

## RESUMO GERAL

As doenças transmitidas por mosquitos (arboviroses) têm se tornado constantes ameaças em regiões tropicais. Enquanto não há uma vacina validada contra o vírus de doenças como dengue, zika, chikungunya e febre de mayaro a única forma de prevenção existente consiste no controle dos mosquitos transmissores *Aedes aegypti* e/ou *Aedes albopictus*. A busca por novos inseticidas, associada à eliminação de possíveis criadouros de *A. aegypti*, é de fundamental importância no combate a este vetor. É necessária a obtenção de compostos que apresentem maior eficácia, menor estabilidade no ambiente e menor toxicidade a humanos e animais. Além disso, a procura por novos alvos moleculares também é essencial. Este trabalho foi realizado em duas etapas: primeiro, foi realizado um estudo sobre a ação larvicida e/ou adulticida de alguns derivados das tetraidroquinolinas já testados contra *Aedes aegypti*. Neste caso, estudou-se a interação dessa classe de compostos no receptor de ecdisona (*AaEcR*) e também no canal BK do mosquito. A partir de nossos achados teóricos, novos e promissores compostos contra *Aedes aegypti* foram projetados. A segunda parte é dedicada à interação desses mesmos compostos (já testados e propostos) com a acetilcolinesterase (*AaAChE*), analisando a seletividade desses compostos à enzima humana (*HssAChE*). É importante notar que em ambos os estudos uma metodologia teórica foi aplicada utilizando cálculos de modelagem por homologia, cálculos de ancoramento e dinâmica molecular. Nossos achados revelam que o composto JG2, proposto neste trabalho, têm ação larvicida e adulticida, uma vez que interage bem com o receptor de ecdisona, com o canal BK assim como com a acetilcolinesterase do *Aedes aegypti*. Além disso, há ainda maior seletividade à enzima do mosquito do que a acetilcolinesterase humana, o que é importante quanto à toxicidade a humanos. Baseados nisso, nossos resultados indicam JG2 um potencial inseticida a ser sintetizado e testado contra o mosquito *Aedes aegypti*.

Palavras-chave: Receptor de ecdisona. Canal BK. Acetilcolinesterase. Modelagem por homologia. *Docking*. Dinâmica molecular.



## ABSTRACT

Mosquito-borne diseases (arboviruses) have been made constant threats in tropical regions. While there is no valid vaccine against the virus of diseases such as dengue, zika, chikungunya and mayaro fever the only form of prevention existing is the control of the mosquitoes transmitting *Aedes aegypti* and/or *Aedes Albopictus*. The search for new insecticides, associated with the elimination of possible *A. aegypti* breeding sites, is of fundamental importance in the fight against this vector. It is necessary to obtain compounds that are more effective, less stable in the environment as well as less toxicity to humans. In addition, the search for new molecular targets is also essential. This work was carried out in two stages: first, a study was carried out on the larvicidal and/or adulticidal action of some tetrahydroquinolines derivatives already tested against *Aedes aegypti*. In this case, we studied the interaction of this class of compounds in the ecdysone receptor (*AaEcR*) and also in the BK channel of the mosquito. From our theoretical findings, new and promising compounds against *Aedes aegypti* have been designed. The second stage is devoted to interaction of these same compounds (already tested and those proposed) with acetylcholinesterase (*AaAChE*), analyzing the selectivity of these compounds to human enzyme (*HssAChE*). It is important to note that in both studies a theoretical methodology was applied using homology modeling, docking calculations and molecular dynamics simulations. Our findings show that the compound JG2, proposed in this work, has both larvicidal and adulticidal action, since it interacts well with the ecdysone receptor, with the BK channel as well as *Aedes aegypti* acetylcholinesterase. In addition, there is still greater selectivity to the mosquito enzyme than human acetylcholinesterase, which is important for toxicity of human. In line with that, our results indicate JG2 as a potential insecticide to be synthesized and tested against the *Aedes aegypti* mosquito.

Keywords: Ecdysone receptor. BK channel. Acetylcholinesterase. Homology modeling. Docking. Molecular dynamics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Fêmea adulta do <i>Aedes aegypti</i> .....	18
Figura 2	Ciclo evolutivo do <i>Aedes aegypti</i> .....	19
Figura 3	Estrutura da tetraidroquinolina.....	31
Figura 4	Estruturas químicas da $\alpha$ -ecdisona (Esquerda) e $\beta$ -Ecdisona ou 20-hidroxiecdisona (Direita).....	33
Figura 5	Receptor de ecdisona.....	34
Figura 6	Diagrama esquemático da subunidade $\alpha$ do canal BK inserida na membrana celular com seis domínios (S1-S6), onde o domínio S4 é o sensor de voltagem (carregado positivamente). Entre os domínios S5 e S6 está a alça que forma o poro (P). RCK 1 e 2 são as regiões intracelulares de controle da condutância ao potássio e a última porção com resíduos de carga negativa onde se liga o cálcio antes do carboxi-terminal. B) BK formado por quatro subunidades $\alpha$ e a seta indica a interação entre as regiões que regulam o canal.....	37
Figura 7	Sítio ativo da AChE.....	38

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO 1

Figure 1	Tetrahydroquinolines studied (1-6) (Palli et al., [24] and Smith et al., [25]). Chemical structure of $\beta$ -Ecdysone or 20-hydroxyecdysone (20E) and structure of compound Z [(3aR,4S,9bS)-4-(Naphthalen-1-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinoline-8-carboxylic acid] (Ponte et al. [14]).....	63
Figure 2	Simple alignment between <i>AaEcR</i> and 1R1K.....	68
Figure 3	Ramachandran Graph of <i>AaEcR</i> . The most favorable regions are shown in red, yellow allowed in the generously allowed in light yellow and not allowed in white.....	68
Figure 4	Hydrogen Interactions observed between the hormone 20-hydroxyecdysone (20E) and <i>AaEcR</i> .....	72
Figure 5	(a) All test compounds within the cavity. (b) Possible interaction $\pi$ - $\pi$ stacking between Phe110 and the compounds under study.....	72
Figure 6	In electrostatic interactions of the studied compounds. In green are the negative and red positive interactions.....	74
Figure 7	DRMQ versus Time for the simulation of compounds 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 20E hormone/ <i>AaEcR</i> . The receptor curve is represented in black and the compounds in red.....	76
Figure 8	(a) Map pharmacophore after the dynamic of compounds 3 and 1 (b).....	78
Figure 9	Important points in the structure of a derivative of tetrahydroquinoline. Adapted: Kitamura et al. (2014) and important positions, compounds 1 and 3 and their respective points for modification.....	80
Figure 10	Map pharmacophore after dynamic - JG2.....	83

## ARTIGO 2

Figure 1	(A) Structures of the tetrahydroquinoline studied. (B) Structures studied by Giacoppo et al. (2016).....	101
Figure 2	Simple alignment between <i>AaAChE</i> and 1ODC.....	104
Figure 3	(A) Ramachandran chart of <i>AaAChE</i> . The most favorable regions are shown in red, allowed in yellow, the generously allowed in light yellow and not allowed in white. (B) Overlay of target enzymes ( <i>AaAChE</i> ) and mold (1ODC).....	106
Figure 4	Compounds Tacrine, 1 and JG2 and its hydrogen and electrostatic interactions with <i>AaAChE</i> . Red (positive) and green (negative).....	110
Figure 5	Temporal RMSD of compounds in <i>AaAChE</i> (A) and in <i>HssAChE</i> (B).....	111
Figure 6	Variation of spatial RMSD to systems: Tacrine, 1 and JG2 / <i>AaAChE</i> .....	112
Figure 7	Number of H-bonds. Interactions between compound Tacrine, 1, JG2 and <i>AaAChE</i> during the MD simulation.....	112
Figure 8	Map pharmacophore of compounds Tacrine (A), 1 (B) and JG2 (C).....	114

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO 1

Table 1	Experimental values of EC <sub>50</sub> (half maximal effective concentration) and pEC <sub>50</sub> (pEC <sub>50</sub> = -logEC <sub>50</sub> (M)).....	65
Table 2	Values of pEC <sub>50</sub> [pEC <sub>50</sub> =-logEC <sub>50</sub> (M)] (Palli et al <sup>24</sup> and Smith et al <sup>25</sup> ), intermolecular interaction energy (kcal mol <sup>-1</sup> ) receptor/ligand and hydrogen bond (kcal mol <sup>-1</sup> ) obtained from the docking.....	70
Table 3	Values of angle length (Å) the hydrogen interactions, energy of hydrogen interactions (kcal mol <sup>-1</sup> ) and amino acid residues with which the interactions are formed between the compound and the receptor studied.....	71
Table 4	Interaction (kcal mol <sup>-1</sup> ), electrostatic, long-range electrostatic (kcal mol <sup>-1</sup> ) and hydrogen binding energy values as well as bond length values (Å) and main amino acid residues responsible for the interaction between compounds and the channel.....	73
Table 5	Changes performed and estimated values of the intermolecular interaction energy (kcal mol <sup>-1</sup> ) obtained in anchoring for the ecdysone receptor and BK channel.....	81

#### ARTIGO 2

Table 1	Energy values: the intermolecular interaction (kcal mol <sup>-1</sup> ), hydrogen bonding, electrostatic, and long-range electrostatic (kcal mol <sup>-1</sup> ).....	107
Table 2	Hydrogen binding energy values as well as bond length values (Å) and main amino acid residues responsible for the interaction between compounds and the targets.....	108

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Inseticidas recomendados pela Organização Mundial de Saúde para aplicação residual.....	27
Quadro 2	Inseticidas recomendados pela Organização Mundial de Saúde para aplicação espacial a UBV para espaços abertos.....	27
Quadro 3	Larvicidas recomendados pela Organização Mundial de Saúde para uso em água potável.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

20E	20-hidroxicdisona
3D	Tridimensional
Å	Angstrom
AaAChE	Acetylcolinesterase do <i>Aedes aegypti</i>
AaEcR	Receptor de ecdisona do <i>Aedes aegypti</i>
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Ala	Alanina
AM1	Método semiempírico de química computacional Austin Model 1
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
ATP	Trifosfato de adenosina
B3LYP	Método DFT de Becke, usando correlação de Lee, Yang e Parr
BHC	Benzene Hexachloride
BK	“Big” K <sup>+</sup> /Canal de potássio ativado por cálcio
CHIKV	Vírus da Chikungunya
cm	Centímetro
DBD	<i>DNA-binding domain</i>
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DENV1	Sorotipo 1 da dengue
DENV2	Sorotipo 2 da dengue
DENV3	Sorotipo 3 da dengue
DENV4	Sorotipo 4 da dengue
DM	Dinâmica molecular
DN	Doenças negligenciadas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRMQ	Desvio da Raiz Média Quadrática
EC <sub>50</sub>	Half maximal effective concentration
EcR	Receptor de ecdisona
F	Flúor
FA	Febre amarela
fs	Fentossegundos
Gln	Glicina
Glu	Glutamato
H	Hidrogênio
His	Histidina
HJ	Hormônio Juvenil
HssAChE	Human Acetylcholinesterase
IGR	Insect Grown Regulator
K	Kelvin
Kcal mol <sup>-1</sup>	Quilocaloria por mol
KJ mol <sup>-1</sup>	Quilojoule por mol
LBD	<i>Ligand-binding domain</i>
MAYV	Mayaro vírus
MS	Ministério da Saúde
MVD	Molegro Virtual Docker
nm	Nanômetro

ns	Nanossegundos
Phe	Fenilalanina
RMSD	Root Mean Square Deviation
RMSD	Root-mean-square deviation
RXR	Receptor de ácido retinóico
Ser	Serina
SRN	Superfamília dos receptores nucleares
THQ	Tetrahydroquinoline/ Tetraidroquinolina
Thr	Treonina
TIP3P	Modelo de solvatação (Transferable Intermolecular Potentials)
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
<i>Usp</i>	<i>Ultraspiracle</i>
WHO	World Health Organization
YFV	Vírus da febre amarela
ZIKV	Zika vírus
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\Phi$	Ângulo phi
$\Psi$	Ângulo psi

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>15</b>
	<b>INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Doenças emergentes ou reemergentes.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b><i>Aedes aegypti</i> Linnaeus 1762.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Febre amarela (FA).....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Dengue.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Febre chikungunya.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Zika.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Febre de Mayaro.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3</b>	<b>Inseticidas utilizados ao combate do <i>Aedes aegypti</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Adulticidas.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Larvicidas.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4</b>	<b>Resistência a inseticidas.....</b>	<b>30</b>
<b>2.5</b>	<b>Compostos estudados.....</b>	<b>31</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Tetraidroquinolinas (THQs).....</b>	<b>31</b>
<b>2.6</b>	<b>Alvos moleculares do mosquito <i>Aedes aegypti</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Receptor de ecdisona.....</b>	<b>32</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Canal de potássio ativado por cálcio (BK).....</b>	<b>35</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Acetilcolinesterase (AChE).....</b>	<b>37</b>
<b>2.7</b>	<b>Métodos teóricos empregados.....</b>	<b>39</b>
<b>2.7.1</b>	<b>Modelagem por homologia.....</b>	<b>39</b>
<b>2.7.2</b>	<b>Ancoramento molecular (<i>docking</i>).....</b>	<b>41</b>
<b>2.7.3</b>	<b>Dinâmica molecular.....</b>	<b>43</b>
<b>2.7.4</b>	<b>Associação dos cálculos de Docking e Dinâmica Molecular.....</b>	<b>45</b>
	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
	<b>SEGUNDA PARTE.....</b>	<b>61</b>
	<b>ARTIGO 1 Toward the understanding of tetrahydroquinolines action in <i>Aedes aegypti</i>: larvicide or adulticide?.....</b>	<b>61</b>
	<b>ARTIGO 2 Interaction between tetrahydroquinolines and <i>Aedes aegypti</i> and human acetylcholinesterases: Design of Potential insecticides.....</b>	<b>98</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>129</b>
	<b>ANEXOS (Trabalhos desenvolvidos durante pós-graduação).....</b>	<b>130</b>

## PRIMEIRA PARTE

### INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO

#### 1 INTRODUÇÃO GERAL

As doenças emergentes e reemergentes são doenças de origem infecciosa e cuja incidência em seres humanos aumentou nas duas últimas décadas ou ameaça aumentar no futuro próximo (NII-TREBI, 2017; IOM, 1992). Sabe-se que os insetos estão associados com a transmissão de diversas dessas doenças. Nesta pesquisa em particular, será destacado o mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 e as doenças que este veicula.

*Aedes aegypti* ganha notória popularidade devido à sua relação com diversas doenças atuais. Este é o vetor responsável pela transmissão dos vírus causadores da febre amarela, dengue, chikungunya, zika e febre mayaro (BOSIRE et al., 2014; SIMOY; SIMOY; CANZIAN; 2015; SERRA et al., 2016). Acredita-se que suas origens são do continente africano e que este vetor chegou a América a partir das viagens exploradoras/colonizadoras europeias (TORRES, 1998).

Os inseticidas utilizados para o combate a este vetor são classificados como adulticidas ou larvicidas. Os adulticidas são aqueles utilizados no combate aos insetos adultos, entre estes, por exemplo: os piretróides, os derivados halogenados e os organofosforados (FORATTINI, 1962; COSTA, 2007). Já os larvicidas são responsáveis por combater as formas imaturas dos insetos. Larvicidas químicos, biológicos e os reguladores de crescimento de insetos – IGRs (Insect Grown Regulator) são desenvolvidos e recomendados para o controle das larvas de *A. aegypti* (MULLA et al., 2004; THAVARA et al., 2004).

Os IGRs, também conhecidos como terceira geração de inseticidas são moléculas sintéticas, análogas, miméticas ou de ação semelhante aos hormônios naturais dos insetos (RESENDE; GAMA, 2006). Esses compostos são biologicamente ativos e vem amplamente sendo estudados e utilizados como inseticidas. Eles são mais seguros para a manipulação e possuem lenta evolução de resistência aos inseticidas convencionais (RESENDE; GAMA, 2006; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Eles surgiram na década de 1970 como um novo grupo de ação mais específica e menor toxicidade para mamíferos se comparados a outros inseticidas, pois atuam seletivamente ao interromper o desenvolvimento e o crescimento das larvas e pupas ao invés da intoxicação direta do mosquito (MARTINS; SILVA, 2004). Tais compostos regulam o crescimento sendo agonistas de ecdisteróides, inibidores da síntese de quitina, anti-juvenóides



(agem como antagonistas do hormônio juvenil) ou juvenóides (agem como agonistas do hormônio juvenil).

Ainda sobre os IGRs, são dois os principais hormônios envolvidos neste processo: o hormônio esteróide 20-hidroxiecdisona (20E) e o hormônio juvenil (HJ). Qualquer interferência, seja por fontes exógenas de hormônios ou de seus análogos sintéticos, pode resultar na interrupção ou até mesmo, anormalidade no desenvolvimento e reprodução de insetos (HOFFMANN; LORENZ, 1998; SMAGGHE et al., 2012; RIDDIFORD, 1985; CHO et al., 1995).

Deve-se ressaltar que a ecdisona possui um receptor específico, o receptor de ecdisona (EcR), receptor este que desempenha um papel crucial na metamorfose e no desenvolvimento de insetos (KOELLE et al., 1991). Novos inseticidas surgem quando compostos similares ao hormônio, os chamados agonistas da ecdisona se ligam ao receptor, do mesmo modo que a ecdisona natural. Assim, ocorre a ativação da transcrição gênica e o início da muda prematura prejudicando o ciclo de desenvolvimento normal do inseto (BOUDJELIDA et al., 2005; FERREIRA, 2009).

Os compostos derivados das tetraidroquinolinas (THQs) são alguns exemplos de agonista da ecdisona. Estes atuam na expressão do gene realizada por este receptor no *A. aegypti* (AaEcR) e sua ação como larvicida já é conhecida (SRIDHARAN; SURYAVANSHI; MENÉNDEZ; 2011; SMITH et al., 2003).

Além disso, estudos mostram que essa classe de compostos tem ação, embora com função diferente a exposta até aqui, no canal de potássio ativado por cálcio (BK) (PONTE et al., 2012). Estes canais são encontrados em diversos lugares do organismo humano e dentre suas diversas funções ele é responsável pela excitabilidade neuronal (KHAN et al., 2001; SPROSSMAN et al., 2009), o que levanta a hipótese de que se houver a ação das THQs isso causaria prejuízo para o inseto mostrando uma possível ação adulticida destes compostos. O estudo com este canal também é importante na busca por novos alvos moleculares.

Por fim, outro alvo das THQs é na enzima acetilcolinesterase (GATTA, et al. 1992; FINK, et al. 1995). Esta enzima atua nos sistema nervoso central e periférico, sobre o receptor de acetilcolina e auxiliando na transmissão de impulsos nervosos (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; SOREQ et al., 1990). Já se conhece bem a ação dos inseticidas organofosforados sobre essa enzima (GUPTA, 2005). Neste trabalho será estudada a interação dela (acetilcolinesterase) com esta classe de compostos (THQs), almejando mostrar novos mecanismos de inibição.

Com base nisso, o objetivo do presente trabalho foi estudar a ação de alguns derivados das THQs como inseticidas e avaliar sua ação como larvicida, em particular no receptor de ecdisona e na AChE, e/ou adulticida, ação no canal BK e na AChE, utilizando técnicas de modelagem por homologia, *docking* e dinâmica molecular. Além disso, propor um novo composto que apresente ambas ações, larvicida e adulticida, no controle do mosquito *Aedes aegypti*.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Doenças emergentes ou reemergentes**

A emergência e reemergência de doenças infecciosas ocorrem ao longo do tempo. Antes de uma epidemia, agentes de doenças infecciosas passam por várias fases de adaptação ao acesso ou ao adquirir características patogênicas em um novo hospedeiro (NII-TREBI, 2017; CARRUTHERS; COTEER; KUMAMTO, 2007).

Processos específicos, como recombinação e mutação genética, bem como fatores que obrigam os agentes microbianos a mudar os hospedeiros, constituem oportunidades para que os agentes infecciosos evoluam, se adaptem a novos hospedeiros, a novos locais e se espalhem facilmente (NII-TREBI, 2017; ALCAIS; ABEL; CASANOVA, 2009; MOUCHET; CARNEVALE, 1997).

Historicamente, os arbovírus têm sido mais estudados pelos pesquisadores dos países desenvolvidos o que resultou em maior conhecimento sobre sua biologia molecular, sua patogênese e seu potencial para ressurgir como ameaças ao mundo desenvolvido. À primeira vista, os arbovírus parecem estar já bem representados na agenda internacional de pesquisa, particularmente sob a rubrica de doenças emergentes / re-emergentes ou patógenos biodefensivos (LABEAUD, 2008).

### **2.2 *Aedes aegypti* Linnaeus 1762**

Os mosquitos estão associados com vários problemas de saúde pública (BOSIRE et al., 2014; GIACOPPO, et al. 2016). O *Aedes aegypti* (Figura 1) é o mosquito responsável pela transmissão de importantes doenças: febre amarela, dengue, chikungunya, zika e mayaro (BOSIRE et al., 2014; SIMOY; SIMOY; CANZIAN; 2015; LI et al., 2012; ORSBORNE et al., 2016; LONG et al., 2011; SERRA et al., 2016).

Figura 1 - Fêmea adulta do *Aedes aegypti*.



Fonte: Foto de James Gathany/Flickr CC BY 2.0.

Acredita-se que sua origem seja o continente africano e que este vetor chegou a América a partir das viagens exploradoras/colonizadoras europeias (TORRES, 1998). Foi identificado na Bahia em 1686, chegando ao Rio de Janeiro em 1849. Entre 1850 a 1899 se dispersou pelo Brasil, seguindo o rumo da navegação marítima, sendo encontrado desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul (BRASIL, 1999).

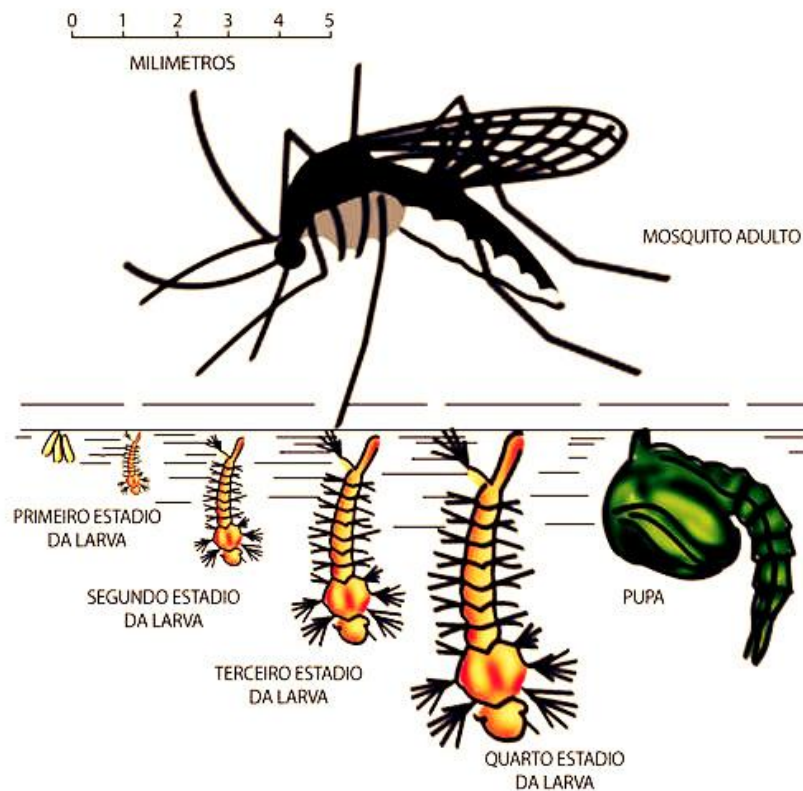
Devido à sua importância como vetor da febre amarela, este vetor foi intensamente combatido e considerado erradicado em 1955 (MATILDE, 2013). Porém países vizinhos como as Guianas e a Venezuela e outros países americanos como os Estados Unidos e Cuba não erradicaram o mosquito. Fato este, que contribuiu com o fim do programa de erradicação no ano de 1970, impediu sua eliminação nestes países e resultou na re-invasão do Brasil (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; MATILDE, 2013).

*Aedes aegypti*, pertence ao Filo Arthropoda, à classe Insecta, à ordem Diptera, família Culicidae e subfamília Culicinae (SOUZA, 2013). São menores que mosquitos comuns, medido cerca de 3-6 mm de comprimento. Porém, é importante destacar que os insetos do sexo masculino são, em geral, menores do que as fêmeas (SOUZA, 2013; CLEMONS et al., 2010).

Seu corpo é dividido em segmentos chamados de metâmeros, os quais se unem e formando a cabeça, o tórax e o abdome (SOUZA, 2013). Possuem o corpo delgado, cabeça globosa, pernas longas, abdome cilíndrico e tórax comprimido lateralmente. Seus anéis prateados na porção basal de cada segmento das pernas são característicos. Além disso, algumas partes do corpo são revestidas por escamas com tonalidade castanho-escura (Figura 1) (SOUZA, 2013; CLEMONS et al., 2010).

O ciclo biológico do mosquito compreende a fase de ovo, de larva (quatro estágios larvais), de pupa e fase terrestre (Figura 2). Apartir da oviposição o ciclo de vida até alcançar a fase adulta é de aproximadamente 10 dias (CLEMONS et al., 2010; NUNES, 2011).

Figura 2 - Ciclo evolutivo do *Aedes aegypti*.



Fonte: [deleonscarlett.wordpress.com](http://deleonscarlett.wordpress.com).

É um mosquito com hábitos diurno. As fêmeas são preferencialmente antropofílicas e apresentam maior atividade hematófaga ao amanhacer e pouco antes do crepúsculo (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). As fêmeas geralmente põem ovos nas paredes internas dos depósitos que servem de criadouros, por exemplo, pneus velhos, vasos de flores, tanques de água e outros recipientes. Uma vez em fase embrionária os ovos podem resistir à desidratação por um ano (JANSEN; BEEBE, 2010; NUNES 2011).

Após a apenas um ciclo gonotrófico, múltiplas oviposições acontecem. Para garantir a sobrevivência e dispersão da sua prole, a fêmea realiza a chamada oviposição em saltos (Souza, 2013; Yoshioka, et al. 2012), ou seja, ela interrompe a oviposição e sai a procura de novos locais para realizar a postura dos ovos (SOUZA, 2013; REITER 1991, 1996, 2007). A fêmea chega a pôr cerca de 100 ovos por vez (CLEMONS et al., 2010).

Os ovos do *A. aegypti* medem cerca de um milímetro de comprimento, tendo contorno alongado e fusiforme (FORATTINI, 1962; BRASIL, 2001). Quando são postos, os ovos possuem cor branca, a qual se torna negra nas primeiras vinte quatro horas. Em 48 horas, têm-se formação do embrião, os quais podem resistir a longos períodos de dessecação, por volta de 1 ano (BRASIL, 2001).

A eclosão das larvas de *A. aegypti* é estimulada devido à redução do oxigênio disponível realizado por bactérias presentes na água. Metabólitos químicos derivados de plantas também podem estimular a eclosão mesmo que não haja a diminuição de oxigênio dissolvido (PONNUSAMY et al., 2011; SOUZA, 2013). Após a eclosação, as larvas se alimentam de matéria orgânica e dentro de dez dias completam os quatro estádios larvais chegando à fase de pupa e emergência de adultos (SOUZA, 2013).

Já na fase de pupa não há alimentação e é nesta fase que ocorre a metamorfose a qual marcará o início da fase adulta. A pupa, quando em estado inativo, se mantém flutuando na superfície da água, facilitando assim a emergência do inseto adulto (BRASIL, 2001). Ela é dividida em cefalotórax e abdômen (OLIVEIRA: CARDOSO, 2011; BRASIL, 2001). O Tórax e a cabeça são unidos, constituindo o cefalotórax. A pupa tem um par de tubos respiratórios os quais atravessam a água permitindo assim a respiração (BRASIL, 2001). Esta última fase do estágio aquático (pupa), em condições favoráveis de temperatura, tem duração de aproximadamente dois dias. A pupa raramente é afetada pela ação de larvicidas (TELES, 2009).

Após emergir o inseto adulto vai à busca de paredes de recipientes para pousar, local este onde permanece por várias horas, para que haja o endurecimento das asas e do exoesqueleto, Além disso, no caso dos machos, neste momento ocorre a rotação da genitália em 180° (BRASIL, 2001). Após 24 horas podem acasalar, o que vale para ambos os sexos. Com relação ao acasalamento, o *A. aegypti* é considerado estenógamo devido à sua capacidade de acasalar em espaços pequenos, podendo estar pousados sobre uma superfície ou até mesmo durante o voo (MATILDE, 2013).

Na fase adulta, os mosquitos já formados alimentam-se de néctar e sucos vegetais até a fase de acasalamento. A partir daí, é necessário que a fêmea se alimente de sangue para que haja a maturação dos ovos (TELES, 2009). Estas restringem seus hábitos hematófagos aos horários diurnos sendo seus picos de maior atividade ao amanhecer (7:00 às 10:00h) e pouco antes do crepúsculo vespertino, 16:00 às 19:00h (BRASIL, et al., 2001; MS, 2009). Elas se alimentam frequentemente no homem e em animais domésticos (BRASIL, et al., 2001). É interessante ressaltar que uma única inseminação é suficiente para fecundar todos os ovos que

a fêmea venha a produzir durante sua vida e que um mosquito adulto vive por até 45 dias (FARRAR, et al., 2014).

A transmissão de diferentes doenças causadas por este mosquito será detalhada a seguir:

### **2.2.1 Febre amarela (FA)**

O vírus da febre amarela (VFA) pertence ao gênero *Flavivirus* e a família Flaviviridae (do latim flavus = amarelo) (JORGE, et al. 2017). Apresenta capsídeo icosaédrico, envolto por um envelope viral. O genoma viral é composto de RNA de fita simples e polaridade positiva, com cerca de 11 kilobases (CHAMBERS et al., 1990).

O vírus da febre amarela originou-se em África e foi trazido ao hemisfério ocidental durante a era do comércio de escravos, com a primeira epidemia relatada em 1648 no Yucatan (STAPLES; MONATH, 2008; CARTER, 1931) Durante os 200 anos seguintes, os surtos ocorreram extensamente na América tropical, nas cidades litorais norte-americanas e na Europa (STAPLES; MONATH, 2008; STRODE, 1951).

A FA é uma doença viral febril, aguda, não contagiosa, transmitida por mosquitos infectados e de gravidade variável (VASCONCELOS, 2003). O VFA mantém-se em dois ciclos básicos: um ciclo urbano simples do tipo homem-mosquito, no qual o *Aedes aegypti* é responsável pela disseminação da doença e outro silvestre complexo, onde várias espécies de mosquitos responsáveis pela transmissão diferem: na África, os mosquitos *Aedes* e na América os mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* (VASCONCELOS, 2003; SMITH, 1951).

Antes da introdução da vacina contra a febre amarela, o controle dos mosquitos *A. aegypti* era o único procedimento para prevenir a ocorrência da doença. A vacinação é agora a maneira mais prática e confiável de prevenir a FA em pessoas que vivem e viajam para áreas onde é endêmica (WHO, 2016).

### **2.2.2 Dengue**

Dengue é uma doença infecciosa, febril, causada por vírus da família Flaviviridae. É um vírus de RNA de cadeia simples. Cinco sorotipos foram identificados, DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e DENV-5 (MUSTAFA et al. 2015; MS, 2009). Todos os sorotipos são transmitidos aos humanos pela picada de mosquitos do gênero *Aedes* infectados,

principalmente o *A. aegypti* no Brasil (MS, 2009). A infecção por um deles confere proteção permanente para o mesmo sorotipo e imunidade parcial e temporária contra os outros tipos (DEGALLIER et al., 2001).

As primeiras epidemias suspeitas de dengue nas Américas foram relatadas em 1635 na Martinica e Guadalupe e em 1699 no Panamá. Entretanto, é difícil atribuir esses surtos à dengue sem um quadro clínico detalhado (DICK et al., 2012; GLUBER, 1997).

Após a picada e ingestão de sangue pela fêmea do *A. aegypti* contendo o vírus, ocorre uma infecção das células epiteliais do intestino do mosquito que se propaga através da lâmina basal para a circulação, infectando assim as glândulas salivares do vetor. É importante observar que o vírus é obtido a partir de um hospedeiro vertebrado virêmico (fase de viremia 4 a 12 dias. O mosquito fica possibilitado de transmitir o vírus após o período de incubação extrínseco, período este com duração de 8 a 12 dias. Cada mosquito *A. aegypti* vive em média 45 dias e, nesse período, um único mosquito pode infectar até 300 pessoas (McBRIDE; BIELEFELDT-OHMANN, 2000; NUNES, 2011).

Ao picar o hospedeiro, a fêmea do mosquito regurgita a saliva, na qual substâncias anticoagulantes são encontradas, e, dessa forma, o vírus é introduzido dentro da corrente sanguínea da vítima (PICINATO, et al. 2015). Após o humano ser infectado, o vírus fica incubado em seu organismo de 2 a 15 dias, apenas após esse período é que os primeiros sintomas da doença surgirão (McBRIDE; BIELEFELDT-OHMANN, 2000; MURRAY, 2006; NUNES, 2011).

O período em que o mosquito pode ser infectado ao picar um humano infectado vai desde um dia antes de aparecer febre no homem até seis dias depois da manifestação desta (PICINATO, et al. 2015). Após o período de incubação extrínseco, o *A. aegypti* poderá transmiti-lo para os humanos até o fim da sua vida (PICINATO, et al. 2015).

Em alguns países já está disponível a vacina contra dengue chamada Dengvaxia®. Produzida pela Sanofi Pasteur's, esta é a primeira vacina do mundo licenciada para prevenção do dengue causada pelos 4 sorotipos em indivíduos entre 9 e 45 anos de idade. Foram necessários mais de 20 anos de investigação e desenvolvimento, incluindo dois ensaios clínicos de Fase 3 envolvendo mais de 35.000 participantes com idade entre 2-16 anos, para desenvolver a vacina. Ela está disponível no México, nas Filipinas, no Brasil, em El Salvador e conta com vários outros países no processo de revisão regulatória (HALSTEAD; AGUIAR 2016).

Embora seja crescente o número de pesquisas, a não existência de vacinas validadas na maior parte do mundo, para o uso contra dengue, faz com que o melhor método de controle

seja a prevenção, ou seja, o ataque ao vetor *A. aegypti* (GUY; JACKSON, 2016). Esse controle é feito eliminando os locais propícios à oviposição ou combatendo as larvas desse mosquito. No caso específico do dengue, a maior dificuldade é de se obter uma vacina que seja capaz de imunizar contra os quatro (4) tipos de dengue, com alta eficiência, para evitar o mecanismo fisiopatológico que desencadeia o dengue hemorrágico (FIGUEIREDO, 1999).

### **2.2.3 Febre chikungunya**

Chikungunya é uma doença infecciosa emergente causada por um vírus do gênero *Alphavirus*, da família *Togaviridae* (HORWOOD; BUCHY, 2015; BURNETT, 2014). Esta infecção é tipicamente transmitida pela picada de mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* infectados (BURNETT, 2014).

Chikungunya foi descrita pela primeira vez em um surto de 1952, na região Makonde, onde é agora a Tanzânia. Seu nome incomum vem da língua Makonde *kungunyala*, que significa "tornar-se contorcido", "andar debruçado sobre", ou "o que se inclina para cima" uma descrição vívida do desconforto articular que comumente ocorre com a doença (BURNETT, 2014; BURT et al., 2012).

Três genótipos distintos de chikungunya virus (CHIKV) foram relatados: na África Ocidental, África Oriental/Central/Sul e genótipos asiáticos. A distribuição geográfica destes genótipos é tradicionalmente restrita às regiões implicadas pelos seus nomes (HORWOOD; BUCHY, 2015).

A infecção por CHIKV tem várias semelhanças com a infecção causada pelo vírus da dengue (BURT et al., 2012). O período de incubação varia de 1 a 12 dias, com uma média de 2 a 4 dias e é seguido pelo início súbito da febre chikungunya, que é caracterizada por febre alta, artralgia grave e mialgia, juntamente com dores de cabeça, fotofobia e erupção cutânea (BURT et al., 2012; HORWOOD; BUCHY, 2015; REZZA et al., 2007; QUEYRIAUX et al., 2008; LEMANT et al., 2008). As infecções assintomáticas são raras. Em particular, cerca de 3 a 25% das pessoas com provas sorológicas de infecção não têm sintomas óbvios (BURT et al., 2012).

A maioria dos pacientes tem melhora parcial na artralgia em 1 a 2 semanas após o início agudo da doença. Nesta fase, alguns pacientes se recuperam completamente, no entanto, muitos pacientes têm artralgia persistente que dura meses ou até mesmo anos (BURT et al., 2012; HORWOOD; BUCHY, 2015).



Como não há tratamento específico disponível, o tratamento de suporte dos sintomas, incluindo repouso, ingestão de líquidos, antipiréticos e analgésicos, é a única opção (POWERS, 2010). Várias drogas antivirais foram testadas contra a febre chikungunya. Entre estas temos a ribavirina, polissacáridos sulfatados, ácido micofenólico, harringtonina, interferon, corticosteróides, 6-azauridina, cloroquina, entre outros (POWERS, 2010; PRETELL; SERRANIO; SALGUEDO, 2016).

Embora haja alguma evidência de que essas opções podem proporcionar algum alívio, existem efeitos colaterais e os benefícios a longo prazo, bem como, a relação custo-benefício não são claros. No entanto, os resultados preliminares são encorajadores e sugerem que testes adicionais devem ser realizados possibilitando o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes (POWERS, 2010).

#### **2.2.4 Zika**

O Zika (ZIKV) é um vírus de RNA de cadeia simples pertencente ao gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae (KUNO et al., 1998; KUNO; CHANG, 2007; HAYES, 2009; LI et al., 2012). O vírus foi isolado pela primeira vez em 1947 a partir de um macaco Rhesus febril na floresta Zika de Uganda (LI et al., 2012; DICK et al., 1952).

Em ambientes urbanos e suburbanos, o vírus Zika é transmitido num ciclo de transmissão humano-mosquito-humano. Duas espécies do subgênero *Stegomyia* de *Aedes* (*A. aegypti* e em menor grau, *A. albopictus*) foram associadas a quase todos os surtos de vírus Zika conhecidos, embora duas outras espécies, *A. hensilli* e *A. polynesiensis* tenham sido considerados vetores nos surtos de Yap e Polinésia Francesa, respectivamente. *A. aegypti* e *A. albopictus* são as únicas espécies conhecidas de *Aedes* (*Stegomyia*) nas Américas (LEDERMANN et al., 2014; LI et al., 2012; PETERSEN et al., 2016).

O período de incubação, isto é, o tempo que decorre desde a exposição até o aparecimento dos sintomas, da doença do vírus Zika não está bem estabelecido, mas é provavelmente de alguns dias. Os sintomas são semelhantes aos de outras infecções por arbovírus, incluindo a dengue, e são a febre, erupções na pele, conjuntivite, mialgia, artralgia, mal-estar e cefaleias. Estes sintomas duram, normalmente de 2 a 7 dias (WHO, 2016).

Evidências substanciais indicam que o vírus Zika pode ser transmitido da mãe para o feto durante a gravidez (PETERSEN et al., 2016). O vírus Zika foi identificado no líquido amniótico das mães cujos fetos apresentaram anormalidades cerebrais detectadas por

ultrassonografia, sendo identificados antígenos virais e RNA no tecido cerebral e placentas de crianças que nasceram com microcefalia e morreram logo após o nascimento, bem como nos tecidos de abortos espontâneos (PETERSEN et al., 2016; CALVET et al., 2016; OLIVEIRA MELO et al., 2016; JOUANNIC et al., 2016).

Nas últimas décadas, foi feito um esforço significativo no sentido da descoberta de terapias para infecções por flavivirus. Devido à semelhança entre ZIKV e vírus da dengue, o conhecimento derivado da descoberta de drogas para tratar a dengue poderia ser aplicado no tratamento de infecções por Zika. Segundo Weaver et al. (2016) não é razoável especular que poderiam ser encontrados inibidores ativos tanto contra o vírus ZIKV como contra o vírus da dengue. Precauções devem ser tomadas ao extrapolar a experiência de dengue para descoberta de potenciais fármacos contra ZIKV. Isso ocorre porque a biologia dos dois vírus pode ser muito diferente (WEAVER et al. 2016).

Enquanto as vacinas e a terapêutica permaneçam indisponíveis, provavelmente durante pelo menos alguns anos, as melhores perspectivas para o controle do vírus Zika está relacionada à redução do contato entre o vetor, provavelmente *A. aegypti* na maioria das regiões, e os seres humanos (WEAVER et al., 2016).

### **2.2.5 Febre de Mayaro**

Mayaro virus (MAYV) é o agente etiológico da febre de Mayaro. Pertence à família Togaviridae, gênero *Alphavirus* assim como o vírus Chikungunya (CHIKV). São vírus pequenos, icosaédricos, medindo 65 a 70 nm de diâmetro (KING et al., 2011; MOTA et al., 2015).

MAYV foi isolado pela primeira vez de trabalhadores florestais doentes em Trinidad em 1954 (ANDERSON et al., 1957; TESH et al., 1999). Posteriormente, o vírus foi isolado de humanos, vertebrados selvagens e mosquitos na Colômbia, no Brasil, em Suriname, na Guiana, na Guiana Francesa, no Peru e na Bolívia (TESH et al., 1999).

A febre de Mayaro é uma doença febril aguda como o dengue, com duração de 3 a 5 dias, caracterizada por dores frontais, dor epigástrica, mialgias, artralgia incapacitante, erupção maculopapular, calafrios, náuseas, fotofobia e vertigem. A dor articular pode persistir por vários meses assim como acontece na chikungunya (PINHEIRO, 1981; COIMBRA et al., 2007).

Os surtos da doença causada por MAYV são geralmente limitados a áreas rurais dentro ou perto de florestas tropicais onde o mosquito vetor *Haemagogus janthinomys* é abundante. Porém o MAYV pode ser potencialmente transmitido em ambiente urbano pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, os quais são amplamente encontrados nas cidades (SPINDOLA et al. 2014; TERZIAN et al., 2015).

É importante destacar que o vírus de mayaro tem uma distribuição sobreposta ao vírus dengue (DENV) e a doença tem similaridade aos sinais iniciais e sintomas (MOTA et al., 2015), o que torna esta doença facilmente confundida com outras febres virais, principalmente dengue (ZUCHI et al., 2014; MOTA et al., 2015). Também vale lembrar que a vacina contra dengue pode estar prontamente disponível e a prevalência real da doença causada pela MAYV pode afetar futuros estudos sobre esta vacina (MOTA et al., 2015).

Finalmente, é importante ressaltar que o mosquito *Aedes aegypti* é o inseto associado com a transmissão destas diversas doenças.

### **2.3 Inseticidas utilizados no combate ao *Aedes aegypti***

A utilização de inseticidas para controle de populações de mosquitos adultos (adulticidas) e na sua forma larvária (larvicidas) é feita por meio do tratamento focal e perifocal e da aspersão aeroespacial de inseticidas em ultra baixo volume (UBV) (ZARA et al., 2016). O tratamento focal ocorre aplicando um produto larvicida, que pode ser químico ou biológico, nos depósitos onde se encontram as larvas que não possam ser eliminadas mecanicamente (MS, 2009; ZARA et al., 2016).

Já o tratamento perifocal se baseia na aplicação de uma camada de adulticida de ação residual, utilizando-se um aspersor manual, nas paredes externas dos criadouros situados em pontos estratégicos (ZARA et al., 2016). Esse tratamento está indicado para localidades recém-infestadas com o objetivo de complementar o tratamento focal em pontos estratégicos (MS, 2009; ZARA et al., 2016).

Por fim, temos a aspersão aeroespacial de inseticidas em UBV, a qual é feita com equipamento portátil costal ou acoplado a veículos e tem como função específica eliminar formas adultas de *A. aegypti*. Esse tipo de tratamento deve ser utilizado somente para bloqueio de transmissão e para controle de surtos ou epidemias. É importante lembrar que essa nebulização não é seletiva, eliminando qualquer mosquito que esteja no ambiente, e seu uso indiscriminado para combate de outros insetos não é recomendado (MS, 2009; ZARA et al., 2016).

Nos quadros 1, 2 e 3 estão apresentados os inseticidas recomendados pela OMS para controle de mosquitos.

Quadro 1. Inseticidas recomendados pela OMS para aplicação residual

<b>Produto</b>	<b>Grupo</b>
Alfacipermetrina	Piretróide
Bendiocarb	Carbamato
Bifentrina	Piretróide
Ciflutrina	Piretróide
Deltametrina	Piretróide
DDT	Organoclorado
Etofenprox	Piretróide
Fenitrothion	Organofosforado
Lambdacialotrina	Piretróide
Malathion	Organofosforado
Pririmifósmetil	Organofosforado
Propoxur	Carbamato

Fonte: WHO, 2007 ([http://www.who.int/whopes/Insecticides\\_IRS\\_Malaria\\_ok.pdf](http://www.who.int/whopes/Insecticides_IRS_Malaria_ok.pdf))

Quadro 2. Inseticidas recomendados pela OMS para aplicação espacial a UBV para espaços abertos

<b>Produto</b>	<b>Grupo</b>
Deltametrina	Piretróide
Lambdacialotrina	Piretróide
Malathion	Organofosforado
dd, transcifenotrina	Piretróide

Fonte: WHO, 2012a ([http://www.who.int/whopes/Insecticides\\_for\\_space\\_spraying\\_Jul\\_2012.pdf](http://www.who.int/whopes/Insecticides_for_space_spraying_Jul_2012.pdf))

Quadro 3. Larvicidas recomendados pela OMS para uso em água potável

<b>Produto</b>	<b>Grupo</b>
Bacillus thuringiensis israelensis	Larvicida bacteriano
Diflubenzuron	Benzoilureas
Novaluron	Benzoilureas
Piriproxifen	Análogo de hormônio juvenil
Espinosade	Espinosinas
Temefós	Organofosforado

Fonte: WHO, 2012b ([http://www.who.int/whopes/Mosquito\\_Larvicides\\_Sept\\_2012.pdf](http://www.who.int/whopes/Mosquito_Larvicides_Sept_2012.pdf))

Os adulticidas são aqueles utilizados no combate aos insetos adultos e os larvicidas que atuam sobre as formas imaturas (larvas e pupa) dos insetos.

### 2.3.1 Adulticidas

Neste grupo encontram-se os organoclorados, os piretróides, os organofosforados e os carbamatos (FORATTINI, 1962; COSTA, 2007).

O grupo dos organoclorados é o mais antigo. Ele inclui o diclorodifeniltricloroetano (DDT), talvez a substância química mais notória do século passado (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012; ARAÚJO, et al. 2015). Em 1948, Paul Muller recebeu o Prêmio Nobel de Medicina pela descoberta da utilidade do DDT no controle dos diversos vetores de doenças como a malária, febre amarela, etc. (BRAGA; VALLE, 2007). Os inseticidas desse grupo agem nos canais de sódio dos insetos, mantendo-os abertos por um período mais longo. Sendo assim, ações repetitivas são desencadeadas, uma vez que ocorre transmissão contínua do impulso nervoso. Os insetos eventualmente morrem devido à hiperexcitação (GUEDES, 1999).

Os piretróides são pesticidas artificiais, com estruturas derivadas de piretrinas naturais encontradas em flores de *Chrysanthemum cineraraefolium* (YU et al. 2017). São geralmente ésteres carboxílicos e podem ser classificados em dois grupos: Tipo I e Tipo II, diferenciados pela ausência (Tipo I) ou presença (Tipo II) de um grupo ciano na porção álcool (BLANKSON et al. 2016; YU et al. 2017). A adição do substituinte ciano melhora grandemente a capacidade dos piretróides como inseticidas (ESTEVE-TURRILLAS; PASTOR; de la GUARDIA, 2005; YU et al. 2017). Sua melhor fotoestabilidade e persistência ambiental sobre os seus congêneres naturais contribuem para a sua enorme popularidade nos campos agrícolas (KODBA; VONČINA, 2007; YU et al. 2017). Esses compostos agem sob a membrana dos neurônios afetando o mecanismo da bomba de sódio e potássio impedindo assim a transmissão dos impulsos nervosos, levando o inseto a uma morte rápida (“*rapid knockdown*”) (BRASIL, 2001).

Os compostos organofosforados, por outro lado, agem por inibição da acetilcolinesterase no mecanismo da junção neuromuscular, provocando um estado de paralisia no inseto seguido de uma morte lenta (“*low knockdown*”) (BRASIL, 2001). Apresentam vantagens, e desvantagens se comparados aos organoclorados. Trazem como vantagens serem biodegradáveis e não se acumularem nos tecidos e como desvantagens maior toxicidade para os vertebrados mesmo em baixas doses (BRAGA; VALLE, 2007; PALCHICK, 1996). Outra desvantagem é que por apresentar instabilidade química, seu uso

frequente e em doses cada vez maiores, tem desenvolvido resistência pelo mosquito aos pesticidas comumente utilizados, dificultando o trabalho de controle do vetor por esta classe de inseticidas (LIMA, et al., 2003; BRAGA et al., 2004).

Os carbamatos, assim como os organofosforados, apresentam ação letal rápida sobre os insetos, apesar de um curto poder residual. Da mesma forma que os organofosforados, estes inibem a AChE através da reação de carbamilação (BRAGA; VALLE, 2007). Embora atuem de forma semelhante nos sistemas biológicos, os carbamatos apresentam duas principais diferenças em relação aos organofosforados: alguns carbamatos são potentes inibidores da Aliesterase e apresentam seletividade pronunciada contra as AChE de certas espécies. A segunda diferença é que a inibição da AChE pelos carbamatos é um processo reversível (BRAGA; VALLE, 2007).

Vale ressaltar que a aplicação de inseticidas sobre os mosquitos adultos somente é recomendada em casos de surtos epidêmicos ou em locais onde haja grande infestação do vetor, com o objetivo que diminuir rapidamente sua densidade em situações de emergência (RANSON et al., 2010).

### **2.3.2 Larvicidas**

Outro tipo de inseticidas amplamente utilizados e estudados são os larvicidas. Larvicidas químicos e biológicos como o Temefós, o Bti (*Bacillus thuringiensis israelenses*) e os reguladores de crescimento de insetos (IGRs), têm sido desenvolvidos e recomendados para o controle da larva de *A. aegypti* (MULLA et al , 2004; THAVARA et al, 2004).

O organofosforado Temefós foi introduzido no mercado em 1965 (MELO et al. 2008; da SILVA et al., 2015), sendo o único larvicida do grupo com uso generalizado no controle de larvas de mosquito, por mais de 40 anos (da SILVA et al., 2015). Ele é o único do grupo aprovado pela OMS para uso em água de consumo humano, por ser de baixa toxicidade aguda e apresentar pouca persistência no ambiente (WHO, 1997; WHO, 2007; da SILVA et al., 2015).

O Bti é uma bactéria gram positiva, aeróbica facultativa, cosmopolita, esporulante e formadora de inclusões cristalinas (DE BARJAC; FRACHON, 1990; BECKER et al., 2010; OLMO et al., 2016). Sua atividade como inseticida é devida à estrutura cristalina das proteínas associadas à sua esporulação. Estas proteínas cristalinas, se ingeridas, encontram pH adequadamente alcalino no intestino médio das larvas de mosquito para ativar as suas toxinas (ô-endotoxinas) (OLMO et al., 2016). Endotoxinas matam as larvas por ligação a receptores

específicos no epitélio intestinal. As células perdem permeabilidade e as larvas acabam por morrer devido a perfurações intestinais (BOISVERT; BOISVERT, 2000; OLMO et al., 2016).

Os reguladores de crescimento também conhecidos como terceira geração de inseticidas são moléculas sintéticas, análogas, miméticas ou de ação semelhante aos hormônios naturais dos insetos (RESENDE; GAMA, 2006). Estes inseticidas apresenta maior segurança para a manipulação, além de possuem lenta evolução de resistência aos inseticidas convencionais (RESENDE; GAMA, 2006; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Estes inseticidas surgiram na década de 1970, sendo novo grupo de ação mais específica e de menor toxicidade para os mamíferos quando comparados a outros inseticidas, pois ao invés da intoxicação direta eles atuam ao interromper o desenvolvimento e o crescimento dos insetos (SILVA; MENDES, 2002; MARTINS; SILVA, 2004).

Tais compostos em particular, regulam o crescimento, sendo agonistas de ecdisteróides, inibidores da síntese de quitina, anti-juvenóides (agem como antagonistas do hormônio juvenil) ou juvenóides (agem como agonistas do hormônio juvenil) (SILVA; MENDES, 2002).

Um exemplo de regulador de crescimento é o Piriproxifem (Sumilarv®), um éter piridiloxipropílico, análogo ao hormônio juvenil. Este tem atuação no inseto inibindo o desenvolvimento das características adultas e causando esterilidade do mesmo (BASTOS et al., 2016; KOYAMA et al., 1989).

A ação de diferentes larvicidas tem sido estudada, como exemplo, a ação do flavonóide rutina (GUARDA et al. 2016), do óleo essencial de *Citrus sinensis* (FERREIRA et al. 2015), do spinosad (PAZ-SOLDAN et al. 2016) e dos derivados das THQs (KITAMURA et al. 2014), entre outros.

Neste trabalho, compostos derivados das THQs com possível ação inseticida (adulticidas e/ou larvicida) serão estudados.

## **2.4 Resistência a inseticidas**

A resistência é um fenômeno genético, que se caracteriza por ocorrer mutações que afetam as proteínas alvos dos inseticidas e/ou o seu metabolismo (LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007; MOREIRA; MANSUR; MANSUR, 2012).

O ciclo de vida dos insetos é curto e estes apresentam prole abundante, fatos estes que favorecem o surgimento de populações com características genéticas diferentes. A frequência da utilização de inseticidas resulta na propagação de resistência dos insetos. Esta resistência é

resultante não apenas da pressão seletiva desses compostos tóxicos sobre estas populações, mas também das características herdadas das espécies de insetos envolvidas (HEMINGWAY; RANSON, 2000; MOREIRA; MANSUR; MANSUR, 2012).

É importante notar que a resistência tem sido detectada para todas as classes de inseticidas, apresentando efeitos diretos e profundos na re-emergência das doenças transmitidas por vetores (BROGDON; McALLISTER, 1998; BRAGA; VALLE, 2007).

Nesse sentido, é necessário que se faça o monitoramento e o manejo da resistência. Além disso, é imprescindível também a busca por novas substâncias com modos de ação diferentes dos inseticidas químicos convencionais. Estes fatores são importantes em qualquer programa de controle de vetores (BRAGA; VALLE, 2007, FERRARI, 1996).

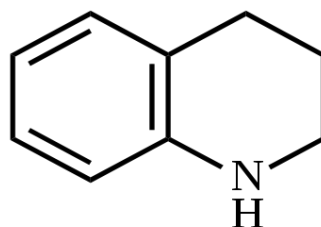
## 2.5 Compostos estudados

### 2.5.1 Tetraidroquinolinas (THQs)

Os compostos heterocíclicos, especialmente heterocíclicos de azoto, são a classe mais importante dos compostos nas indústrias farmacêutica e de agroquímicos compreendendo cerca de 60% de todas as substâncias medicamentosas (SRIDHARAN; SURYAVANSHI; MENÉNDEZ; 2011).

THQ (Figura 3) é um composto orgânico com a fórmula química  $C_9H_{11}N$ . Classificado como uma amina secundária, ele é derivado de isoquinolina por hidrogenação. É um líquido viscoso incolor que é miscível com a maior parte dos solventes orgânicos (MITCHINSON; NADIN, 2000).

Figura 3 - Estrutura da tetraidroquinolina.



As THQs têm sido alvos importantes para os químicos sintéticos, devido à sua ampla distribuição em produtos naturais e agentes medicinais (NAMMALWAR; BUNCE, 2014; KATRITZKY; RACHWAL; RACHWAL, 1996). Devido à sua importância estrutural em um grande número de compostos biologicamente ativos, diversas estratégias sintéticas para sua



obtenção têm sido desenvolvidas (NAMMALWAR; BUNCE, 2014; SRIDHARAN; SURYAVANSHI; MENÉNDEZ, 2011).

Os compostos derivados das THQs são conhecidos por sua ampla aplicabilidade. Pode-se citar sua ação sobre os receptores de neurotransmissores, de membrana e de hormônios esteróides; no tratamento quimioterápico, como agonista do receptor de estrogênio, antagonista do receptor de progesterona, anti-HIV, antibacterial, entre vários outros (SRIDHARAN; SURYAVANSHI; MENÉNDEZ; 2011). Além disso, já é conhecida sua ação como inseticida atuando no receptor de ecdisona (KUZNETSOV et al. 1995; SOIN et al. 2010; PALLI et al. 2005; SMITH et al, 2003; SRIDHARAN; SURYAVANSHI; MENÉNDEZ; 2011).

Sabe-se também que alguns derivados da THQs apresentam atividade nos canais iônicos, como por exemplo, derivados preparados via reação de Povarov foram identificados como agonistas do canal de larga-condutância de potássio ativado por cálcio (BK) (SRIDHARAN; SURYAVANSHI; MENÉNDEZ; 2011). Ponte et al. (2012) também relatam compostos tetraidroquinolínicos que ativam o canal BK.

Além disso, muitos derivados das quinolinas têm demonstrado atividade anti-colinesterase (ISOMAE et al., 2002; SZYMAŃSKI et al., 2012; GUTIÉRREZ et al., 2015). Por exemplo, Gatta et al. (1992) relataram a síntese de derivados das THQs e Fink et al. (1995) relataram a síntese e avaliação de 5-amino-5,6,7,8-tetraidroquinolinona, ambos como inibidores da AChE.

## **2.6 Alvos moleculares do mosquito *Aedes aegypti***

### **2.6.1 Receptor de ecdisona**

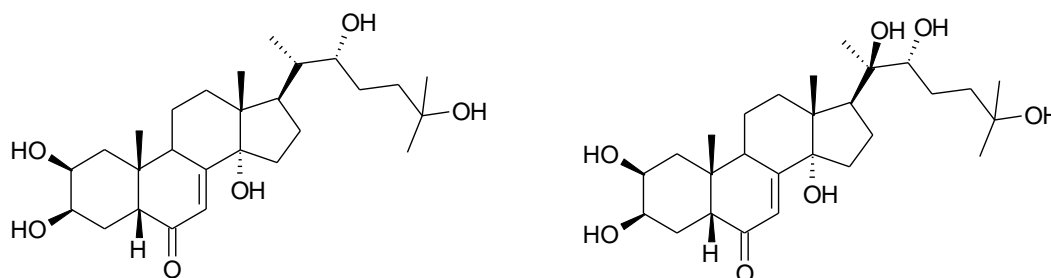
Os dois principais hormônios que regulam o crescimento de insetos, desenvolvimento e reprodução são o hormônio esteróide 20-hidroxiecdisona (20E) e o hormônio juvenil (HJ). Qualquer interferência nestes hormônios ou nos mecanismos pelos quais estes manifestam suas ações resulta em anormal ou prejudicial crescimento, desenvolvimento e reprodução dos insetos (SMAGGHE; GOMEZ; DHADIALLA, 2012; RIDDIFORD, 1985; CHO et al., 1995).

Os ecdisteróides juntamente com o hormônio HJ, desempenham um importante papel na regulação do desenvolvimento e reprodução em insetos (KUMAR; THOMPSON, 2004), pois iniciam e coordenam a muda nesses organismos (KOTHAPALLI et al., 1995; RIDDIFORD, 1996). O HJ modula o processo de muda afetando a ação da ecdisona de forma que altos títulos de HJ promovam a muda de um instar larval para outro, enquanto que os

baixos níveis ou sua ausência estimulam a ecdisona a promover a muda para adultos (HARTFELDER, 2000).

A ecdisona (Figura 4) foi o primeiro composto químico identificado como um hormônio de inseto; este composto é um pró-hormônio inativo que se converte a sua forma ativa (20-hidroxiectdisona (20E)) (Figura 4), pelo corpo gorduroso e células epidérmicas (HORN et al., 1966; NIJHOUT, 1994; GILBERT, 1994; TELES, 2009).

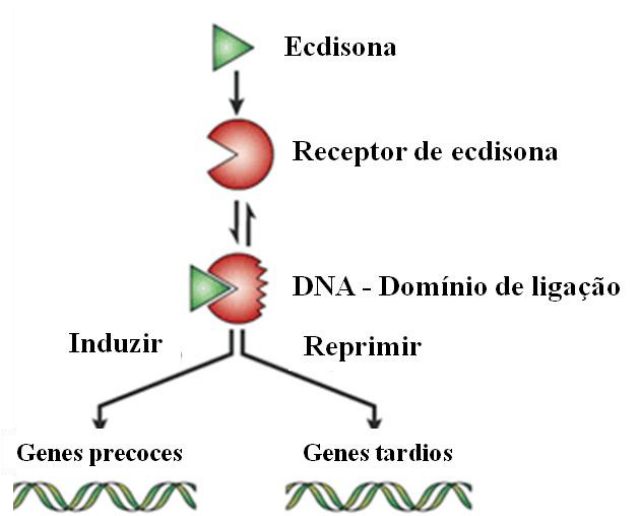
Figura 4 - Estruturas químicas da  $\alpha$ -ecdisona (Esquerda) e  $\beta$ -Ecdisona ou 20-hidroxiectdisona (Direita).



Com relação ao *Aedes aegypti*, os hormônios ecdisteróides possuem papel fundamental em sua reprodução. A ecdisona é produzida pelos ovários, durante a fase adulta, secretada para a hemolinfa, hidrolisada no corpo gorduroso na forma de 20-hidroxiectdisona (20E) e passa a agir como ativadora indireta da síntese de proteínas de vitelo. As proteínas vitelogênicas sintetizadas nos corpos gordurosos são secretadas para a hemolinfa e endocitadas pelas células ovarianas (RAIKHEL; DHADIALLA, 1992; BRAGA; VALLE, 2007).

Vale ressaltar que a ecdisona possui um receptor específico, chamado de receptor de ecdisona (EcR) (Figura 5). Este pertence à família de receptores nucleares e pode ser encontrado amplamente pelo organismo dos insetos, em embriões e em vários tecidos pré-pupais como corpo gorduroso, discos imaginais, glândulas salivares, traqueia, sistema nervoso central, intestino e células associadas com estruturas cuticulares (KOELLE et al., 1991; TELES, 2009).

Figura 5. Receptor de ecdisona.



Fonte: Nature Reviews. Molecular Cell Biology.

Este receptor tem sido utilizado no desenvolvimento de inseticidas e interruptores de genes para a regulação genética (Figura 5) (PALLI et al., 2005; SOIN et al., 2010; YOGINDRAN; RAJAM, 2016; MALIK, et al. 2016). Ele é dividido em domínios, possui blocos de aminoácidos conservados, ativa ou reprime a transcrição de genes (KOELLE et al., 1991; TELES, 2009).

Este receptor é um heterodímero composto pelo produto do gene *EcR* e pelo produto de um outro gene, o *usp* (*ultraspiracle*), um ortólogo do receptor de ácido retinóico (RXR) de vertebrados (YAO et al., 1992, 1993; TELES, 2009). Esse heterodímero se liga a ecdisteróides e a seus elementos de resposta regulando sua expressão (PATRICK et al., 2001; PALLI et al., 2005).

Ele desempenha um papel crucial na metamorfose e no desenvolvimento de insetos. Apesar da semelhança e homologia dos domínios com os receptores nucleares dos mamíferos, o receptor de ecdisona e seus ligantes são ortogonais aos receptores dos mamíferos. Esta propriedade torna o EcR um alvo atraente para inseticidas ambientalmente benignos e, mais recentemente, para uso em sistemas para controlar a expressão de genes em organismos transgênicos (KOELLE et al., 1991; YOGINDRAN; RAJAM, 2016; MALIK, et al. 2016; SUGAHARA, et al. 2017).

Alguns receptores de ecdisteróides foram caracterizados em outros artrópodes como *Aedes aegypti* (CHO et al., 1995) e *Chironomus tentans* (IMHOF et al., 1993), em lepidópteros, *Manduca sexta* (FUJIWARA et al., 1995), *Heliothis virescens* (MARTINEZ et al., 1999), *Bombyx mori* (SWEVERS et al., 1995), entre outras espécies.

Sabe-se que alguns compostos, os derivados das THQs, atuam na expressão do gene realizada por este receptor no *Aedes aegypti* (AaEcR) e sua ação como larvicida é conhecida (SRIDHARAN; SURYAVANSHI; MENÉNDEZ; 2011; SMITH et al 2003).

### **2.6.2 Canal de potássio ativado por cálcio (BK)**

Os canais iônicos são definidos como poros proteicos presentes em diversas membranas biológicas e que desempenham importantes funções em uma ampla variedade de mecanismos celulares ao permitirem a passagem de íons ou pequenas moléculas de compartimentos celulares (RESTREPO-ÂNGULO; DE VIZCAYA-RUIZ; CAMACHO, 2010; HILLE, 1992). Estes canais estão envolvidos com a contração muscular e a excitabilidade de neurônios, a secreção de hormônios, a ativação de linfócitos T e a função renal, dentre muitas outras (HILLE, 1992).

As grandes famílias e subfamílias de canais diferem pelo tipo de íon que carregam, como por exemplo, cálcio e potássio; da forma como são regulados por ligantes, como o ATP, o cálcio intracelular e algumas proteínas da família G; e/ou, pelo potencial de membrana ( $\Psi$ ) das células (NICHOLLS et al., 1992).

De todos os tipos de canais iônicos conhecidos, os canais de potássio são os que apresentam maior grupo e maior diversificação, representando cerca de 70 *locus* no genoma dos mamíferos (GUTMAN et al., 2005; VIEIRA, 2011). Dentre estes temos: o canal de potássio retificador de entrada (Kir), o canal de potássio de 2 poros, o canal de potássio dependente da voltagem e o canal de potássio ativado por cálcio (LEVITAN et al., 2010; NASCIMENTO, 2011; VIEIRA, 2011).

Os canais de potássio ativado por cálcio são divididos em três grupos: canais de potássio de baixa condutância (SK, KCa2), canais de potássio de condutância intermediária (IK, KCa3.1) e canais de potássio de grande condutância (BK, Slack, KCa1.1, maxi-K ou Slo) (SALKOFF et al., 2006; VIEIRA, 2011).

O canal de potássio de alta condutância, ativado por cálcio, denominado classicamente como BK (“Big” K<sup>+</sup>) ou Maxi-K e recentemente como SLO1 da família *Slowpoke* de canais de potássio de alta condutância é codificado nos humanos pelo gene KCNMA1, que dá origem à subunidade  $\alpha$ , localizado no cromossomo 10q22 (SALKOFF et al., 2006).

É mais abundante no cérebro e nos órgãos que contêm músculo liso, mas também tem sido detectado em uma ampla variedade de outros tipos de tecidos, incluindo os órgãos reprodutores (ovário, testículos), pâncreas e glândulas supra-renais, e nas membranas

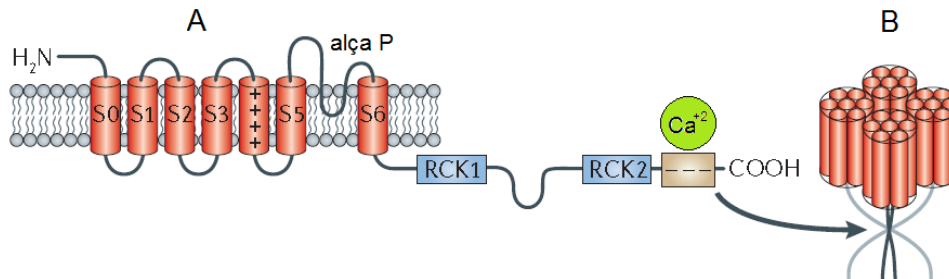
plasmáticas de miócitos cardíacos (ventriculares) (WU; MARX, 2010). Este desempenha também diversas funções, tais como, regulação do tônus do músculo liso, excitabilidade neuronal, atua nas atividades das glândulas secretoras de salivas e eletrólitos (KHAN et al., 2001; SPROSSMAN et al., 2009; PERRY; SANDLE, 2009; NASCIMENTO, 2011).

Como podemos ver na Figura 6, o canal é um homo-tetrâmero e cada subunidade  $\alpha$  apresenta seis domínios transmembrana (S1-S6), onde a porção S4 apresenta os resíduos carregados positivamente e responsáveis pela sensibilidade à voltagem (SALKOFF et al., 2006).

Entre as porções S5 e S6 existe uma volta (*loop*) que dá origem ao poro seletivo ao potássio e de alta condutância (100-270 pS) (SALKOFF et al., 2006). A porção carboxi-terminal é intracelular e apresenta as regiões de regulação da condutância ao potássio (RCK 1 e 2) e o sítio de ligação do cálcio. Existem ainda 4 subunidades  $\beta$  descritas (KCNMB1 a KCNMB4) que podem modular a sensibilidade ao cálcio e a voltagem da subunidade  $\alpha$ . Outros mecanismos de regulação aumentam a diversidade de funções do BK em diferentes tecidos, como o *splicing* alternativo, sítios de fosforilação e a formação de heterodímeros com SLO2 (SALKOFF et al., 2006; LATORRE; BRAUCHI, 2006).

Estudos mostram que a porção S0 é responsável pela expressão e função do canal (LIU et al., 2008). Também é importante notar que a porção S4 mostra os resíduos carregados positivamente que são responsáveis pela sensibilidade à tensão (YU et al., 2016). As subunidades  $\beta$  ( $\beta$ 1-  $\beta$ 4) podem modular a sensibilidade ao cálcio e a tensão da subunidade  $\alpha$  (CONTRERAS et al., 2013).

Figura 6 – A) Diagrama esquemático da subunidade  $\alpha$  do canal BK inserida na membrana celular com seis domínios (S1-S6), onde o domínio S4 é o sensor de voltagem (carregado positivamente). Entre os domínios S5 e S6 está a alça que forma o poro (P). RCK 1 e 2 são as regiões intracelulares de controle da condutância ao potássio e a última porção com resíduos de carga negativa onde se liga o cálcio antes do carboxi-terminal. B) BK formado por quatro subunidades  $\alpha$  e a seta indica a interação entre as regiões que regulam o canal.



Fonte: Adaptado de Salkoff et al. (2006).

Diversas patologias envolvem a hiper-reatividade do tecido muscular liso, como a hipertensão arterial, incontinência urinária, algumas disfunções eréteis e da motilidade gástrica. Neste contexto, o canal BK tornou-se um alvo terapêutico conhecido para compostos capazes de ativá-los, a fim de reduzir a hiper-reatividade muscular e reverter clinicamente estas patologias (BUTERA et al., 2005; HOLLAND et al., 1996). Além disso, Gunning et al. (2008) em sua pesquisa com atracotoxinas Janus-faced em insetos sugere que o canal BK pode ser um potencial alvo inseticida.

### 2.6.3 Acetilcolinesterase (AChE)

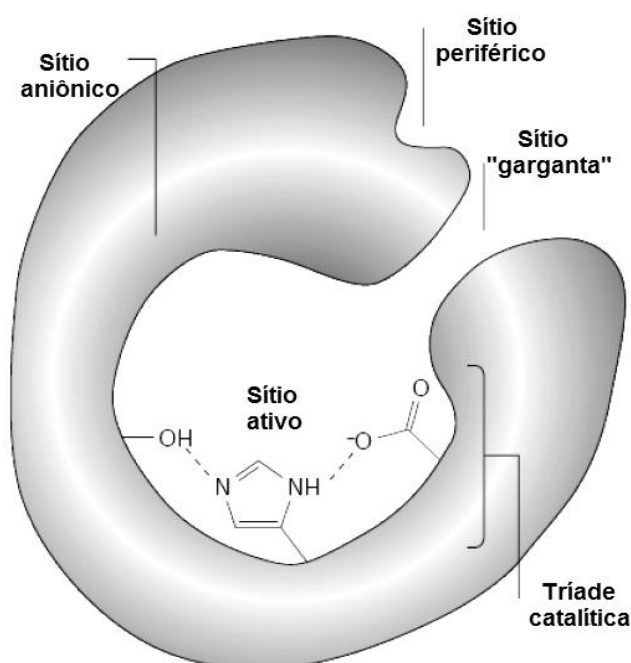
A acetilcolina acetil-hidrolase, ou acetilcolinesterase (AChE), é um componente chave das sinapses colinérgicas cerebrais e junções neuromusculares (GUPTA, et al. 2015). O principal papel biológico da enzima é a terminação da transmissão dos impulsos nervosos por hidrólise rápida do neurotransmissor catiônico, acetilcolina (ACh) (TÕUGU, 2001; MOHAMED ASATH et al., 2017).

O papel central na neurotransmissão não é a única razão pela qual a AChE atraiu muita atenção dos pesquisadores. Ela está também entre as enzimas mais eficientes, sendo capaz de rapidamente hidrolisar a ACh (QUINN, 1987; TAYLOR et al., 1994; TÕUGU, 2001; SOREQ et al., 1990). AChE é considerada como uma enzima evolutiva perfeita, porque todos os passos de transformação no substrato: associação de substrato, transformações químicas e dissociação do produto procedem a taxas semelhantes (QUINN, 1987; TÕUGU, 2001).

Ela está presente nos sistemas nervoso central e periférico, sobre o receptor de acetilcolina atuando na transmissão de impulsos nervosos, por meio das sinapses

neuromusculares (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; SOREQ et al., 1990). Cada monômero da AChE contém um centro catalítico, o qual é composto por dois compartimentos: o subsítio catalítico que contém a tríade catalítica e o subsítio aniônico o qual acomoda o compartimento quaternário positivo de ACh (Figura 7) (GONÇALVES, 2009; PATOČKA et al., 2005).

Figura 7 - Sítio ativo da AChE.



Fonte: Obregon (2006).

Nessas regiões existem quatro domínios:

- Domínio 1: Localizam os resíduos de serina e histidina da tríade catalítica (Ser203 e His447), a qual é encontrada no fundo da “garganta” do sítio ativo (GONÇALVES, 2009; HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; MATOS et al., 2012).
- Domínio 2: É o subsítio aniônico, localizado a uma distância igual ou superior a 4,7Å da hidroxila do resíduo serina. Este subsítio é carregado negativamente, em que o grupo amônio quaternário da ACh interage, eletrostaticamente, com o Glu334. Seu papel é orientar a parte carregada do substrato que entra no centro ativo (PATOČKA et al., 2005; MATOS et al., 2012; GONÇALVES, 2009; QUINN, 1987).
- Domínio 3: Constitui-se por uma região hidrofóbica importante para a ligação com substratos cíclicos (MATOS et al., 2012; GONÇALVES, 2009; QUINN, 1987).

- Domínio 4: Local onde interagem ligantes catiônicos e alguns outros ligantes neutros. Esse domínio se localiza a mais de 20 Å do sítio ativo e, por isso, é denominado sítio aniônico periférico, consistindo dos resíduos de Asp74 e Trp286 como um núcleo comum (MATOS et al., 2012).

Vale ressaltar que a complexação de ligantes com o sítio periférico frequentemente provoca alterações conformacionais no sítio ativo. As interações de ligantes com esses resíduos podem ser o ponto de partida para a modulação alostérica da atividade catalítica da AChE (BOURNE et al., 2009; GONÇALVES, 2009; PATOČKA et al., 2005).

A inibição da AChE destaca-se como um método promissor de controle de insetos. Portanto, a descoberta de novos inibidores e mecanismos de inibição da AChE é uma tarefa importante (CASANOVA et al., 2002).

Vale lembrar que o tipo de inibição mais comum é aquele que ocorre pelos organofosforados e carbamatos, os quais afetam a transmissão de impulsos nervosos resultando no acúmulo da acetilcolina no tecido neuromuscular de insetos causando paralisia e em seguida, a morte (OTERO et al., 2014; PLANCHE et al., 2012; BUŠIĆ et al., 2016).

A AChE se torna um dos alvos moleculares mais vulneráveis a agentes neurotóxicos, pesticidas e venenos de cobras, e também a fármacos voltados para o tratamento das doenças, como o mal de Parkinson e a doença de Alzheimer (GONÇALVES, 2009; QUINN, 1987).

## **2.7 Métodos teóricos empregados**

### **2.7.1 Modelagem por homologia**

Os métodos computacionais são utilizados atualmente com sucesso no estudo e no planejamento de novos compostos bioativos. Estes métodos que podem ser usados como ferramentas do planejamento racional de compostos ativos (SANT'ANNA, 2009; BARREIRO; FRAGA, 2001).

Os bancos de dados em rede e a crescente disponibilidade de programas computacionais relacionados à química são ferramentas fundamentais para a descoberta e planejamento de novas drogas. Estas informações permitem uma análise rápida da atividade biológica *versus* propriedades físico-químicas de uma série de moléculas de interesse (CARVALHO et al., 2003).



Tratando-se de predição de estruturas tridimensionais de proteínas, uma ferramenta utilizada com sucesso é a modelagem por homologia, também chamada de modelagem comparativa. Esta metodologia baseia-se em alguns padrões gerais, que tem sido observados em nível molecular, no processo de evolução biológica são citados por Santos Filho e Alencastro (2003): (a) homologia entre seqüências de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional; (b) proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas (principalmente constituídas de elementos de estrutura secundária: hélices- $\alpha$  e folhas- $\beta$ ); (c) as regiões externas são as responsáveis pelas principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas, constituídas principalmente por alças (“loops”), que ligam os elementos de estruturas secundárias (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003).

A modelagem por homologia está baseada na ideia de que a semelhança de seqüência acima de um determinado limiar implica similaridade estrutural (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003; CHOTHIA; LESK, 1986; D’ALFONSO; TRAMONTANO; LAHM; 2001). Assim, uma proteína de estrutura conhecida e cuja seqüência é semelhante à da proteína alvo pode ser utilizada como um molde para construir um modelo tri-dimensional da última.

Deane e Blundell (2003) relatam o primeiro passo na modelagem comparativa: identificar as estruturas tridimensionais resolvidas, que possam ser utilizadas como uma base estrutural para a modelagem da seqüência-alvo (proteína-alvo). Esta identificação pode ser realizada seguindo diferentes aspectos, como: similaridade de função, conhecimento estrutural, expressão pelo mesmo grupo de genes, similaridade sequencial ou até correlação evolutiva (DEANE; BLUNDELL, 2003).

Após definido o molde, alinha-se as duas seqüências em estudo (a problema e a molde) com o objetivo de alinhar os resíduos estruturalmente equivalentes considerando as características estruturais comuns, como por exemplo, resíduos catalíticos e elementos de estrutura secundária. Durante este processo, surgem alguns espaços vazios, também chamados de “gaps”, os quais são representados no alinhamento por linhas tracejadas (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003; SANTOS FILHO, 2000)

Logo após é realizada a construção do modelo, ou seja, a geração das coordenadas cartesianas. Para se construir a parte interna da proteína-problema usa-se a ideia de que a conformação da cadeia principal da estrutura-molde pode ser transferida para a proteína-problema. Existem vários métodos de modelagem dessas regiões conservadas (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003).

Por fim, o modelo gerado é validado. A validação é uma etapa muito importante que pode ser realizada em diferentes níveis de organização estrutural. É necessário avaliar os parâmetros estereoquímicos, a qualidade do empacotamento global da proteína e os possíveis erros estruturais (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003).

Uma vez que a qualidade do modelo esta relacionada diretamente com a estrutura da proteína-molde utilizada, é necessário que esta a proteína-molde tenha sido obtida com boa resolução e com um fator-R satisfatório. Prefere-se a escolha de modelos estruturais cujo fator-R seja inferior a 20% e a resolução seja igual ou superior a 2Å (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003; SANTOS FILHO, 2000).

Um importante indicador da qualidade estereoquímica de uma proteína é a distribuição dos ângulos torcionais  $\Phi$  e  $\Psi$  da cadeia principal. A distribuição de todos estes ângulos pode ser examinada através do gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968). Se houver resíduos de aminoácidos com problemas estereoquímicos, eles estarão em regiões não-permitidas neste gráfico. Através deste gráfico também se pode ver a porcentagem de resíduos que ocupam regiões favoráveis, sendo uma das melhores maneiras de avaliar a qualidade e estereoquímica de um modelo de proteína (HÖLTJE; FOLKERS, 1997). De acordo com a literatura, um modelo ideal deve apresentar mais de 90% de resíduos nessas regiões (JOHNSON et al., 1994; MANCINI, et al.2012).

### **2.7.2 Ancoramento molecular (docking)**

Estudar as interações proteína-ligante tem sido um dos objetivos da química computacional por anos. A predição destas interações são tarefas essenciais se o objetivo for o desenho de novas drogas (ABEL et al., 2016).

O ancoramento molecular ou *docking* é uma das mais importantes técnicas de investigação das interações intermoleculares entre uma proteína e um ligante, nos casos em que a estrutura 3D da proteína já foi elucidada (SILVEIRA, 2003). O processo de ancoramento envolve dois passos básicos: a previsão da conformação do ligante, bem como a sua posição e orientação dentro da proteína (normalmente chamado de pose) e a avaliação da afinidade de ligação (MENG et al., 2011).

As simulações de *docking* podem ser utilizadas para reproduzir dados experimentais através de algoritmos de validações de ancoragem, onde as conformações proteína-ligante ou proteína-proteína são obtidas *in silico* e comparadas com estruturas obtidas a partir de cristalografia de raios-X ou ressonância magnética nuclear. Além disso, *docking* é uma das

principais ferramentas para os procedimentos de triagem virtual, onde uma biblioteca de vários compostos é "ancorado" contra um alvo de drogas e assim seleciona-se os melhores resultados (DIAS; AZEVEDO Jr.; 2008).

Os valores da função de desempenho do ancoramento  $E_{score}$  são definidos pelas Equações 1 e 2 (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006; SOUZA et al., 2008; RAMALHO et al., 2009; OGUNGBE; SETZER, 2009).

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad (1)$$

Onde

$$E_{inter} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{proteína}} \left[ E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad (2)$$

- $E_{inter}$  = energia de interação ligante-proteína.
- $E_{PLP}$  = energia potencial do inibidor por partes. Baseia-se em dois conjuntos diferentes de parâmetros: um para a aproximação do termo estérico (*van der Waals*) entre átomos, e outro potencial para a ligação hidrogênio.
- O segundo termo descreve as interações eletrostáticas entre átomos carregados. É um potencial de Coulomb com uma constante dielétrica dependente da distancia ( $D(r) = 4r$ ).
- 332,0 = fixa as unidades de energia eletrostática para  $\text{kcal mol}^{-1}$

$E_{intra}$  é a energia interna do ligante (Equação 3):

$$E_{intra} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{ligante}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{ligações flexíveis}} A[1 - \cos(m\theta - \theta_0)] + E_{penalizada} \quad (3)$$

- As duas primeiras somas contidas na equação estão relacionadas a todos os pares de átomos do ligante excluindo os pares de átomos conectados por duas ligações.
- O segundo termo esta relacionado à energia de torção, onde  $\theta$  é o ângulo de torção da ligação.
- O último termo,  $E_{penalizada}$  (chamado de termo de correção), atribui uma penalidade de 1.000 se a distância entre dois átomos pesados for menor que 2,0Å. Isso aplica uma penalidade nas conformações inexistentes do ligante.

- Em resumo, essas funções são usadas para ancorar automaticamente uma molécula flexível em uma molécula molde (proteína) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

Em suma, o *docking* molecular encontra uma media de estruturas estáveis do ligante na proteína e calcula essa estabilidade relativa. É necessário analisar todos os modos de interação para encontrar a estrutura de menor energia, considerando a flexibilidade conformacional do ligante o qual será introduzido no sítio ativo da proteína. Como esses dois problemas estão interligados, eles podem ser resolvidos ao mesmo tempo. Contudo, o número de combinações envolvidas é muito grande (MIZUTANI et al., 1994).

### 2.7.3 Dinâmica molecular

A simulação de Dinâmica Molecular (DM) é uma das técnicas computacionais mais versáteis para o estudo de macromoléculas biológicas (HANSSON et al., 2002; ALONSO et al., 2006). Seus cálculos são fundamentados nos princípios da Mecânica Clássica e fornecem informações sobre o comportamento dinâmico na escala microscópica, dependente do tempo, dos átomos individuais que compõem o sistema (BURKERT; ALLINGER, 1982; NAMBA et al., 2008). É uma simulação na qual, átomos e moléculas se movem sob a influência de forças físicas, como a gravidade. A fim de obter uma visão do movimento dos átomos e moléculas, eles são autorizados a interagir por um período de tempo (FENG et al., 2015).

Fornecem informações detalhadas sobre as flutuações e mudanças conformacional de macromoléculas, tais como proteínas e ácidos nucleicos (HAILE, 1992). Este método tem sido utilizado para investigar a estrutura, a dinâmica e termodinâmica de moléculas biológicas e de seus complexos (RAPAPORT, 2004).

Baseada na Mecânica Molecular (MM), as moléculas são tratadas como uma coleção de átomos as quais são descritas por forças newtonianas, isto é, são tratadas como uma coleção de partículas que estão unidas por forças harmônicas ou elásticas (NAMBA et al., 2008; van GUNSTEREN; BERENDSEN, 1990).

Os cálculos de dinâmica molecular se baseiam na solução passo a passo da equação de movimento de Newton, que para um sistema atômico simples, pode ser descrita pelas Equações 4 e 5.

$$F_i(t) = m_i a_i \quad (4)$$

$$F_i(t) = \frac{\partial V(r_i)}{\partial r_i} \quad (5)$$

Onde:

$F_i$  = Força que atua sobre cada partícula do sistema em um instante de tempo  $t$ .

$a_i$  = Aceleração do átomo  $i$  de massa  $m_i$ .

Após a definição do campo de forças, é possível determinar a força que atua sobre cada átomo através do cálculo da primeira derivada da energia potencial obtida do campo de forças escolhido com relação à posição dos núcleos (Equação 5) (NAMBA et al., 2008). Essas equações são resolvidas simultaneamente em um pequeno espaço de tempo, assim têm-se a trajetória de cada átomo do sistema com relação ao tempo.

Existem alguns pontos importantes para se realizar um cálculo de DM. Primeiro, especificar as posições iniciais das partículas que compõem o sistema, onde para evitar sobreposições indesejáveis geralmente elas são situadas na posição de uma rede cristalina, entre elas (NAMBA et al., 2008).

Então, o sistema é montado dentro de uma caixa que pode adotar diferentes geometrias. Em seguida, no caso de sistemas biomoleculares, são adicionadas moléculas de água dentro do sistema, e na caixa é aplicado o modelo de condição periódica de contorno, evitando que as moléculas de água escapem do meio (NAMBA et al., 2008).

Ainda, antes de se iniciar as simulações, deve-se realizar a minimização do sistema objetivando evitar maus contatos entre os átomos (NAMBA et al., 2008). Essa minimização ou otimização do sistema é feita com a intenção de se obter a energia próxima do mínimo local. Os algoritmos de minimização mais utilizados são: o método do máximo declive, o método dos gradientes conjugados e o método quasi Newton Raphson.

O método do máximo declive (FRANÇA et al., 2004; WIBERG et al. 1965) é um método de primeira derivada que converge vagarosamente nas proximidades do mínimo, mas é poderoso para configurações distantes de um mínimo de energia (FRANÇA, 2004).

O método “gradientes conjugados” permite em geral uma convergência mais rápida que o método do máximo declive que utiliza somente a informação do gradiente na coordenada atualizada. Em se tratando na busca do mínimo da função de energia, este método tem sido considerado o mais sofisticado, além de utilizar a informação sobre a primeira derivada (gradiente), leva em conta o caminho já percorrido na busca do mínimo. Este método utiliza para a determinação do passo seguinte, além do valor do gradiente no ponto atual, o valor do gradiente obtido no passo anterior (FRANÇA, 2004).

O método Newton-Raphson utiliza tanto as derivadas primeiras quanto às derivadas segundas da função. Assim, além de usar as informações do gradiente, utiliza a curvatura para prever onde a função mudará a direção ao longo do gradiente (NAMBA et al., 2008).

Após a minimização, o sistema é aquecido gradualmente para a temperatura de interesse  $T_0$ , nesse momento são atribuídas as velocidades iniciais de todas as partículas utilizando a distribuição de Maxwell-Boltzmann (NAMBA et al., 2008). Dessa forma, esses primeiros passos descritos acima, constituem o período de equilíbrio. Esse período se dá por finalizado quando o equilíbrio termodinâmico é alcançado. Após esse período é possível gerar as trajetórias da DM e realizar o cálculo das diferentes propriedades para o sistema em estudo (NAMBA et al., 2008).

#### **2.7.4 Associação dos cálculos de Docking e Dinâmica Molecular**

A fim de obter um estudo mais confiável entre o complexo proteína/ligante, as simulações de Dinâmica Molecular e *Docking* podem ser combinadas. A força desta associação encontra-se em seus complementares pontos fortes e fracos.

O *docking* é usado para explorar um vasto espaço conformacional de ligantes, permitindo examinar grandes bibliotecas de drogas semelhantes a um custo computacional baixo. As principais dificuldades apresentadas por este método é a pouca ou até mesmo a falta de flexibilidade de toda proteína e a ausência de uma função de pontuação única e amplamente aplicável (ALONSO et al., 2006).

Já a dinâmica molecular trata tanto o ligante quanto proteína de forma flexível, permitindo um ajuste dos receptores no sítio ativo. Além disso, na simulação de dinâmica é possível analisar o efeito de água explícita. No entanto, as principais desvantagens da dinâmica é que os cálculos são demorados e que o sistema pode ficar preso em mínimos locais (ALONSO et al., 2006).

Assim, com a combinação destas duas técnicas, utiliza-se o *docking* para a triagem rápida de grandes bibliotecas de drogas semelhantes e as simulações de DM para explorar conformações do receptor de proteína, otimizar as estruturas do complexo final e calcular as energias mais precisas. Baseado no exposto, esta associação tem contribuído de forma eficaz na melhora do processo de *design* de drogas (ALONSO et al., 2006).

## OBJETIVOS

Nosso objetivo principal é estudar a ação de alguns derivados das THQs como inseticidas. Como objetivos secundários têm-se:

- 1) Avaliar a ação das tetraidroquinolinas no receptor de ecdisona (*AaEcR*), na acetilcolinesterase (*AaAChE*) e no canal BK do *Aedes aegypti*.
- 2) Estudar a seletividade destes compostos analisando também sua ação na acetilcolinesterase humana (*HssAChE*).
- 3) Propor um novo composto que apresente ambas ações, larvicida e adulticida, auxiliando assim no controle do mosquito *Aedes aegypti*.

Para tal pesquisa técnicas de modelagem por homologia, *docking* e dinâmica molecular serão utilizadas para fornecer uma interpretação estrutural, bem como, um entendimento destes processos a nível molecular, contribuindo para o desenvolvimento de novas drogas.

## REFERÊNCIAS

- ABEL, R. et al. Accelerating drug discovery through tight integration of expert molecular design and predictive scoring. **Current Opinion in Structural Biology**, [S.I.], v. 43, p. 38-44, abr. 2016.
- ALCAÏS, A.; ABEL, L.; CASANOVA, J.L. Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. **Journal of Clinical Investigation**. New York, v. 119, n. 9, p. 2506–2514, 2009.
- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews**, Malden, v. 26, n. 5, p. 531-68, sep. 2006.
- ANDERSON, C. R. et al. Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 6, n. 6, p. 1012-1017, nov. 1957.
- ARAÚJO, H. R. C. et al. *Aedes aegypti* Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics. **Insects**, Basel, v. 6, p. 576-594, 2015.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 577p. 2001.
- BASTOS, C. M. et al. O uso de larvicidas em água potável é seguro? **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 38, p. 1-5, 2016.
- BECKER, N. et al. **Mosquitoes and their control**. 2nd edn. Springer, Heidelberg, doi:10.1007/978-3-540-92874-4, 2010.
- BLANKSON, G. K. et al. Contamination levels of organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticides in vegetables marketed in Accra, Ghana. **Food Control**, Berkshire, v. 68, p. 174-180, out. 2016.
- BOISVERT, M.; BOISVERT, J. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis on target and non target organisms: a review of laboratory and field experiments. **Biocontrol Science and Technology**, Sassari, v. 10, p. 517-561, out. 2000.
- BOSIRE, C. M. Larvicidal activities of the stem bark extract and rotenoids of *Millettia usaramensis* subspecies *usaramensis* on *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Suwon, v. 17, p. 531-535, set. 2014.
- BOUDJELIDA, H. et al. Effects of ecdysone agonist halofenozide against *Culex pipiens*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 83, p. 115-123, out. 2005.
- BOURNE, C. R. et al. Crystal structure of *Bacillus anthracis* dihydrofolate reductase with the dihydrophthalazine-based trimethoprim derivative RAB1 provides a structural explanation of potency and selectivity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Whashington, v. 53, n. 7, p. 3065-3073, abr. 2009.
- BRAGA, I. A. et al. *Aedes aegypti*, resistance to temephos during 2001 in several municipalites in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 199-203, mar. 2004.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: Inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007.



- BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.
- BRASIL. **Dengue**: instruções para pessoal de combate ao vetor. Manual de normas técnicas. Brasília: FUNASA; 2001.
- BRASIL. Manual de **vigilância epidemiológica de febre amarela**. FUNASA. Brasília: Ministério da Saúde 1999.
- BROGDON, W.G.; MCALLISTER, J.C. Insecticide resistance and vector control. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, n.4, p. 605-613, 1998.
- BURKERT, U.; ALLINGER, N. L. **Molecular mechanics**. ACS Monograph 177. American Chemical Society, Washington, DC, 1982.
- BURNETT, M. W. Chikungunya. **Journal of Special Operations Medicine**, St. Petersburg, v. 14, n. 4, p. 129-130, 2014.
- BURT, F. J. et al. Chikungunya: a re-emerging virus. **Lancet**, London, v. 379, n. 9816, p. 662-71, feb. 2012.
- BUŠIĆ, V. et al. Pyridoxal oxime derivative potency to reactivate cholinesterases inhibited by organophosphorus compounds. **Toxicology Letters**, Clare, v. 262, p. 114–122, nov. 2016.
- BUTERA, J. A. et al. Synthesis and bladder smooth muscle relaxing properties of substituted 3-amino-4-aryl-(and aralkyl-)cyclobut-3-ene-1,2-diones. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**. Oxford, v. 15, n. 10, p. 2495-501, 2005.
- CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, Oxon, v. 16, n. 6, p. 653-660, jun. 2016.
- CARRUTHERS, B.; COTTER, P.A.; KUMAMOTO, C.A. Microbial pathogenesis: mechanisms of infectious disease. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 2, n. 4, p. 214–219, 2007.
- CARTER, H. R. **Yellow Fever: An Epidemiological and Historical Study of Its Place of Origin**. Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1931.
- CARVALHO, I. et al. Introdução à modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 428-438, may. 2003.
- CASANOVA, H. et al. Insecticide formulations based on nicotine oleate stabilized by sodium caseinate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, München, v. 50, p. 6389-6394, oct. 2002.
- CHAMBERS, T.J. et al. Flavivirus: genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 649-688, 1990.
- CHO, W. L.; KAPITSKAYA, M. Z.; RAIKHEL, A. S. Mosquito ecdysteroid receptor: Analysis of the cDNA and expression during vitellogenesis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 25, p. 19-27, 1995.
- CHOTHIA, C., LESK, A. M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. **The EMBO journal**, Heidelberg, v. 5, p. 823–826, apr. 1986.
- CLEMONS, A. et al. *Aedes aegypti* Culturing and Egg Collection. **Cold Spring Harbor Protocols**, p. 1-5, Oct. 2010

CLEMONS, A. et al. *Aedes aegypti*: an emerging model for vector mosquito development. **Cold Spring Harbor protocols**, Woodbury, p.1-17, oct. 2010.

COIMBRA, T. L. M. et al. Mayaro virus: imported cases of human infection in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 49, n. 4, p. 221-224, jul-aug, 2007.

CONSOLI, R. G. B. A.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1994. 228p.

CONTRERAS, G. F. et al. A BK (Slo1) channel journey from molecule to physiology. **Channels**, Calgary, v. 7, p. 442-458, nov-dec, 2013.

COSTA, F. M. **Avaliação da atividade inseticida do regulador de crescimento de insetos Diflubenzuron contra Anopheles darling Root, 1926 (Diptera, Culicidae), em condições de laboratório. 2007**. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) - Universidade Federal do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas INPA, Manaus, 2007.

D'ALFONSO, G.; TRAMONTANO, A.; LAHM, A. Structural Conservation in Single-Domain Proteins: Implications for Homology Modeling. **Journal of Structural Biology**, Maryland, v. 134, p. 246-256, may-jun, 2001.

da SILVA, E. L. et al. Avaliação da Susceptibilidade ao Temephos de Populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) dos Municípios de Maracaju e Naviraí, MS, Brasil. **BioAssay**, Piracicaba, v. 10, n. 1, 2015.

de BARJAC, H; FRACHON, E. Classification of Bacillus thuringiensis strains. **Entomophaga**, [S.I] v. 35, p. 233-240, jun. 1990.

DEANE, C. M.; BLUNDELL, T. L. Protein comparative modelling and drug discovery. In WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. London : Elsevier Academic Press, 2003.

DEGALLIER, N. et al . Estudos experimentais sobre competência vetorial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* para os vírus da dengue e febre amarela. **Informe Epidemiológico do Sus**, Brasília, v. 10, n. 1, p. 9-11, 2001.

DIAS, R.; AZEVEDO Jr, W. F. Molecular Docking Algorithms. **Current Drug Targets**, Notre Dame, v. 9, p. 1040-1047, dec. 2008.

DICK, O. B. et al. The History of Dengue Outbreaks in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 3, n. 4, p. 584-593, Oct. 2012.

DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 46, p. 509-520, 1952.

ESTEVE-TURRILLAS, F. A.; PASTOR, A.; de la GUARDIA, M. Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid-phases extraction and tandem mass spectrometry detection. **Analytica Chimica Acta**, Palma de Mallorca, v. 553, n.1, p. 50e57, nov. 2005.

FARRAR, J. **Manson's Tropical Diseases**. 23rd ed. London, Elsevier: 2013

FENG et al. Application of molecular dynamics simulation in food carbohydrate research-review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Berlin, v. 31, p. 1-13, oct. 2015.

FERRARI, J.A. **Insecticide resistance**. In: The Biology of Disease Vectors. Colorado: University Press of Colorado; 1996.

FERREIRA, L. C. F. F. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

FERREIRA, S. G. et al. An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on in situ gelling nanostructured surfactant systems containing an essential oil. **Journal of Colloid and Interface Science**, Uppsala, v. 456, p. 190-196, Oct. 2015.

FIGUEIREDO, L. T. M. Vacinas contra o dengue. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 21-25, 1999.

FINK, D. M. et al. Synthesis and Evaluation of 5-Amino-5,6,7,8-Tetrahydroquinolinones as Potential Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 38, n. 18, p. 3645–3651, sep. 1995.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. Faculdade de Higiene e Saúde Pública, São Paulo, 1962.

FRANÇA, T.C. C. **Modelagem molecular da serina hidroximetiltransferase de Plasmodium Falciparum: modelos tridimensionais e proposta de potenciais inibidores seletivos**. 2004. 232fd. Tese (Doutorado em Química) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2004.

FUJIWARA, H. et al. Isolation and development expression of the ecdysone receptor gene in wings of *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Califórnia, v. 25, p. 845-856, 1995.

GATTA, F. et al. Synthesis of 1,2,3,4-Tetrahydroacridine and 5,6,7,8-Tetrahydroquinoline Derivatives as Potential Acetylcholinesterase Inhibitors. **Heterocycles**, Oxford, v. 34, n.5, p. 991–1004, 1992.

GIACOPPO, J. O. S. et al. Towards the Understanding of Tetrahydroquinolines Action in *Aedes aegypti*: Larvicide or Adulticide? **Molecular Simulation**, Oxon, v. 43, n.2, p. 121–133, oct. 2016.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. 4a edição. Sinauer, USA, 1994.

GONÇALVES, A. S. **Estudo da reativação da acetilcolinesterase humana inibida pelo organofosforado tabun através de métodos híbridos clássicos quanto-mecânicos**. 2009. 207 f. Tese (Doutorado em Biofísica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GUARDA, C. et al. Atividade larvicida de produtos naturais e avaliação da susceptibilidade ao inseticida temefós no controle do *Aedes aegypti* (díptera: Culicidae). **Interciência**, Caracas, v. 41, n. 4, apr. 2016.

GUBLER, D. J. **Dengue and dengue hemorrhagic: its history and resurgence as a global public health problem**. In: Gubler, D.J.; Kuno, G, editors. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. London: CAB International, p. 1-22, 1997.

GUEDES, R.N.C. **Toxicologia dos inseticidas**. Viçosa, MG: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 1999.

GUNNING, S. J. et al. The Janus-faced atracotoxins are specific blockers of invertebrate  $K_{Ca}$  channels. **FEBS Journal**, Hoboken, v. 275, p. 4045–4059, 2008.

GUPTA, R.C. **Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds**. 1 ed. Academic Press, 2005, 768p.

GUPTA, V. K. et al. Acetylcholinesterase from Human Erythrocytes as a Surrogate Biomarker of Lead Induced Neurotoxicity. **Enzyme Research**, London, v. 2015, p. 1-7, 2015.

- GUTIÉRREZ, M. et al. Z. Synthesis, molecular docking and design of Tetrahydroquinolines as acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, Aliero, v. 7, n. 3, p. 351-35, 2015.
- GUTMAN, G. A. et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. **Pharmacological reviews**, Bethesda, v. 57, p. 473-508, 2005.
- GUY, B.; JACKSON, N. Dengue vaccine: hypotheses to understand CYD-TDV-induced protection. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 14, p. 45-54, jan. 2016.
- HAILE, J. M. **Molecular Dynamics Simulation** (1st ed). New York, NY, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1992.
- HALSTEAD, S. B.; AGUIAR, M. Dengue vaccines: Are they safe for travelers? **Travel Medicine and Infectious Disease**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 378-383, July–August 2016.
- HANSSON, T.; OOSTENBRINK, C.; van GUNSTEREN, W.F. Molecular Dynamics Simulations. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 12, p. 190-196, 2002.
- HARTFELDER, K. Insect juvenile hormone: from 'status quo' to high society. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 33, p. 157-177, 2000.
- HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerging Infectious Diseases Journal**, Atlanta, v. 15, p. 1347-1350, 2009.
- HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 45, p. 371-391, 2000.
- HILLE, B. **Ionic channels and excitable membranes**, 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass. USA. 1992.
- HOFFMANN, K.H.; LORENZ, M.W. Recent advances in hormones in pest control. **Phytoparasitica**, Rehovot, v. 26, n. 4, p. 1-8, 1998.
- HOLLAND, M. et al. Effects of the BKCa channel activator, NS1619, on rat cerebral artery smooth muscle. **British journal of pharmacology**, Oxford, v. 117, n. 1, p. 119-29, 1996.
- HÖLTJE, H.-D.; FOLKERS, G. In Molecular Modeling: **Basic Principles and Applications**; Mannhold, R.; Kubinyi, H.; Timmerman, H., eds.; VCH: Weinheim, 1997.
- HORN, D. H. S. et al. Identity of the molting hormones of insects and crustaceans. **Chemical Communications**, Oxford, p. 339-340, 1966.
- HÖRNBERG, A.; TUNEMALM, A.; EKSTRÖM, F. Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with organophosphorus compounds suggest that the acyl pocket modulates the aging reaction by precluding the formation of the trigonal bipyramidal transition state. **Biochemistry**, Washington, v. 46, n. 16, p. 4815-4825, Apr. 2007.
- HORWOOD, P. F.; BUCHY, P. Chikungunya. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, [S.I], v. 34, n. 2, p. 479-489, 2015.
- IMHOF, M.O.; RUSCONI, S.; LEZZI, M. Cloning of a Chironomus tentans cDNA encoding a protein (cEcRH) homologous to the Drosophila melanogaster ecdysteroid receptor (dEcR). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 23, p. 15-124, 1993.

IOM. **Emerging Infections:** Microbial Threats to Health in the United States, National Academy Press, Washington, DC, USA, 1992.

JANSEN, C. C.; BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. **Microbes and infection**, Amsterdam, v. 12, n. 4, p. 272-279, 2010.

JOHNSON, M. S. et al. Knowledge-based protein modelling. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Madison, v. 219, p. 1-68, 1994.

JORGE, T. R. et al. Isolation and characterization of a Brazilian strain of yellow fever virus from an epizootic outbreak in 2009. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 166, p. 114–120, 2017.

JOUANNIC, J. M. et al. Zika virus infection in French Polynesia. **Lancet**, New York, v. 387, n. 10023, p. 1051-1053, 2016.

KATRITZKY, A. R.; RACHWAL, S.; RACHWAL, B. Recent progress in the synthesis of 1,2,3,4-tetrahydroquinolines. **Tetrahedron**, Oxford, v. 52, p. 15031-15070, 1996.

KHAN, R. N. et al. Potassium channels in the human myometrium. **Experimental physiology**, Hoboken, v. 86, p. 255-264, 2001.

KING, A. M.Q. et al. Family togaviridae. In : Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Science, CA, USA , 1103 - 1110, 2011.

KITAMURA, S. et al. Structural requirement and stereospecificity of tetrahydroquinolines as potent ecdysone agonists. **Bioorganic and medicinal chemistry letters**, Oxford, v. 7, p. 1715-1718, Apr. 2014.

KODBA, Z. C.; VONČINA, D. B. A rapid method for the determination of organochlorine, pyrethroid pesticides and polychlorobiphenyls in fatty foods using GC with electron capture detection. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 66, n.7e8, p. 619e624, 2007.

KOELLE, M. R. et al. The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. **Cell**, Cambridge, v. 67, p. 59–77, 1991.

KOTHAPALLI, R. et al. Cloning and developmental expression of the ecdysone receptor gene from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Developmental Genetics**, New York, v. 17, p. 319-330, 1995.

KOYAMA, Y. et al. A six-month chronic dietary toxicity study of pyriproxyfen in rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, Oxford, v. 14. n. 1, p. 43-64, 1989.

KUMAR, R.; THOMPSON, E. B. Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator. **Molecular Endocrinology**, Chevy Chase, v. 17, p. 1-10, 2004.

KUNO, G. et al. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. **Journal of Virology**, Whashington, v. 7, p. 73-83, 1998.

KUNO, G.; CHANG, G. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives of Virology**, Wien, v. 152, p. 687-696, 2007.

LABEAUD, A. D. Why Arboviruses Can Be Neglected Tropical Diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n.6, p. e247, Jun 2008.

LATORRE, R.; BRAUCHI, S. Large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  (BK) channel: activation by  $\text{Ca}^{2+}$  and voltage. **Biological research**, Santiago, v. 39, n. 3, p. 385-401, 2006.

LEDERMANN, J. P. et al. *Aedes hensilli* as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. e3188, 2014.

LEMANT, J. et al. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005–2006. **Critical Care Medicine**, Philadelphia, v. 36, p. 2536-2541, 2008.

LEVITAN, I. et al. Cholesterol and ion channels. **Subcellular Biochemistry**, Bethesda, v. 51, p. 509-549, 2010.

LI, M. I. et al. Oral susceptibility of Singapore *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, p. e1792, 2012.

LI, X.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.52, p. 231- 253, 2007.

LIMA, J.B. et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in states of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mcelan, v. 68, p. 329-333, 2003.

LIU, G. et al. Position and Role of the BK Channel Subunit S0 Helix Inferred from Disulfide Crosslinking. **The Journal of General Physiology**, New York, v. 6, n. 6, p. 537-48, 2008.

LONG, K. C. et al. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 85, p. 750-757, 2011.

MALIK, H. J. et al. RNAi-mediated mortality of the whitefly through transgenic expression of double-stranded RNA homologous to acetylcholinesterase and ecdysone receptor in tobacco plants. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 1-11, May. 2016.

MANCINI, D. T.; MATOS, K. S.; CUNHA, E. F. F.; ASSIS, T. M. ; GUIMARAES, A. P. ; FRANCA, T. C. C. ; RAMALHO, T. C. Molecular modeling studies on nucleoside hydrolase. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, Philadelphia, v. 30, p. 125-136, 2012.

MARTINEZ, A. et al. Transcriptional activation of cloned *Heliothis virescens* (Lepidoptera) ecdysone receptor (HvEcR) by Muristerone A. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Riverside, v. 29, p. 915-930, 1999.

MARTINS, F.; SILVA, I.G. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 37, n. 2, p. 135-138, 2004.

MATILDE, L. S. V. **Análise da expressão protéica e de peptidases em formas pré-imaginais e imagos de *Aedes aegypti* e *Aedes Albopictus***. Tese de doutorado, Pós Graduação em Biologia Parasitária, Rio De Janeiro, 2013.

MATOS, K. S. **Aspectos moleculares da reativação da acetilcolinesterase inibida por ciclosarin e carbofurano**. 2012. 148 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

McBRIDE, W.J.H.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Microbes and infection**, Merced, v. 2, n. 9, p. 1041-50, 2000.

- MELO, M. E. B. et al. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo. V. 67, n. 3, p. 196-201, 2008.
- MENG et al. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Computer-Aided Drug Design**, Sharjah, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011.
- MITCHINSON, A.; NADIN, A. Saturated nitrogen heterocycles. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, [S.I], n. 17, p. 2862-2892, 2000.
- MIZUTANI, M. Y.; TOMIOKA, N.; ITAI, A. Rational automatic search method for stable docking models of protein and ligand. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 243, n. 2, p. 310-326, 1994.
- MOHAMED ASATH, et al. Vibrational spectroscopic, molecular docking and quantum chemical studies on 6-aminonicotinamide. **Journal of Molecular Structure**, Coimbra, v. 1134, p. 143-156, 2017.
- MOREIRA, M.F.; MANSUR, J.F.; MANSUR, J.F. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. 2012.
- MOTA, M. T. de O. et. al. Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**, London, v.10, n.9, p. 1109-1122, 2015.
- MOUCHET J.; CARNEVALE, P. Impact of changes in the environment on vector-transmitted disease. **Sante**, v. 7, n. 4, p. 263–269, 1997.
- MS (Ministério da Saúde) 2009. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. Brasília-DF. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes\\_epidemias\\_dengue\\_11\\_02\\_10.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes_epidemias_dengue_11_02_10.pdf). Acesso em: 06 de Outubro de 2015.
- MULLA, M. S. et al. Procedures for evaluation of field efficacy of slow release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water storage containers. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Eatontonwon, v. 20, p. 64-73, 2004.
- MURRAY, P. R. **Microbiologia Médica**. In: ELSEVIER, editor. *Microbiologia Médica*. 5ª Ed, p. 625-30, 2006.
- MUSTAFA, et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, Maharashtra, v. 71, n. 1, 67-70, Jan. 2015.
- NAMBA, A. M.; SILVA, V. B. da; SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 13-24, 2008.
- NAMMALWAR, B.; BUNCE, R.A. Recent Syntheses of 1,2,3,4-Tetrahydroquinolines, 2,3-Dihydro-4(1H)-quinolinones and 4(1H)-Quinolinones using Domino Reactions. **Molecules**, Basel, v.19, p.204-232, 2014.
- NASCIMENTO, W. **Estudo eletrofisiológico dos canais iônicos das células-tronco mesenquimais da geléia de wharton do cordão umbilical humano**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2011.
- NICHOLLS, J. G.; MARTIN, A. R.; WALLACE, B. G. **Ionic basis of the action potential**. C. 4 **Sinauer Associates**. Inc., Sunderland, Mass. USA. 1992.

NII-TREBI, N. I. Emerging and Neglected Infectious Diseases: Insights, Advances, and Challenges. **BioMed Research International**, Cairo, v. 2017, p. 1-15, 2017.

NIJHOUT, H. F. **Insects hormones**. Princeton University Press, New Jersey, 1994.

NUNES, J. da S. **Dengue**: Etiologia, patogénese e suas implicações a nível global. 2011. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2011.

OBREGON, A. D. C. **3-Alcoxi 4-hidroxi pirrolidin-2-onas, enoilcarbamatos e 3-dialcoxi fosforiloxi trialometilados**: síntese e potencial inibitório sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase. 2006. 114 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

OGUNGBE, I. V.; SETZER, W. N. Comparative molecular docking of antitrypanosomal natural products into multiple trypanosoma brucei drug targets. **Molecules**, Basel, v. 14, n. 4, p.1513-1536, 2009.

OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, Hoboken, v. 47, n. 1, p. 6-7, 2016.

OLIVEIRA, E.S.; CARDOSO, O. Investigação da infestação e casos de dengue em Comunidades rurais. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 8, n. 2, p. 087-097, abr./jun. 2011.

OLMO, et al. Effects of Bacillus thuringiensis var. israelensis on nonstandard microcrustacean species isolated from field zooplankton communities. **Ecotoxicology**, Netherlands, v. 25, p. 1730-1738, 2016.

ORSBORNE et al. Personal Protection of Permethrin-Treated Clothing against *Aedes aegypti*, the Vector of Dengue and Zika Virus, in the Laboratory. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 5, p.e0152805, 2016.

OTERO, A.L.C. et al. Design, synthesis, acetylcholinesterase inhibition and larvicidal activity of girsengonine analogs on *Aedes aegypti*, vector of dengue fever. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 78, p. 392-400, 2014.

PALCHICK, S. **Chemical Control of Vectors** In: The Biology of Disease Vectors. Colorado: University Press of Colorado, 1996.

PALLI, S. R. et al. Ecdysteroid receptors and their applications in agriculture and medicine. **Insect and Hormones**, San Diego, v. 73, p. 59-100, 2005.

PATOČKA, J. et al. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. **Journal of Applied Biomedicine**, Czech Republic, v. 3, n. 2, p. 91-99, 2005.

PATRICK, C.W. Jr. et al. Muristerone a-induced nerve growth factor release from genetically engineered human dermal fibroblasts for peripheral nerve tissue engineering. **Tissue Engineering**, New York, v. 7, p. 303-311, 2001.

PAZ-SOLDAN, V. A. et al. Design and Testing of Novel Lethal Ovitrap to Reduce Populations of Aedes Mosquitoes: Community-Based Participatory Research between Industry, Academia and Communities in Peru and Thailand. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n.8, p. e0160386, 2016.



- PERRY, M. D.; SANDLE, G. I. Regulation of colonic apical potassium (BK) channels by camp and somatostatin. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 297, p. G159-G167, 2009.
- PETERSEN et al. Zika Virus. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 374, p. 1552-1563, 2016.
- PICINATO, M. A. C. et al. Dengue: uma visão sobre o vetor urbano *Aedes aegypti* e a difícil interface do seu controle. **Veterinária em Foco**, Canoas, v.13, n.1, jul./dez. 2015.
- PINHEIRO, F.P. Arboviral zoonoses in South America, Mayaro fever. In: STEELE, J.H., ed. **CRC Handbook series in zoonoses**. Boca Raton, CRC, v.1, p.159-164, 1981.
- PLANCHE, A. S.; KLEANDROVA, V. V.; SCOTTI, M. T. Fragment-based approach for the in silico discovery of multi-target insecticides. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 111, p. 39-45, 2012.
- PONNUSAMY, L. et al. Bacteria stimulate hatching of yellow fever mosquito eggs. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. e24409, 2011.
- PONTE, C. G. et al. Selective, direct activation of high-conductance, calcium-activated potassium channels causes smooth muscle relaxation. **Molecular pharmacology**, Bethesda, v. 81, n. 4, p. 567-77, 2012.
- POWERS, AM. Chikungunya. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 30, n. 1, p. 209-219, 2010.
- PRETELL, C. M; SERRANO, L. N. R.; SALGUEDO, C. C. Nuevos enfoques prometedores en El tratamiento frente al virus chikungunya. **Salud Uninorte**, Barranquilla, v. 32, n. 2, p. 276-291, 2016.
- QUEYRIAUX, B. et al. Clinical burden of chikungunya virus infection. **The Lancet Infectious Diseases**, Oxford, v. 8, p. 2-3, 2008.
- QUINN, D.M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chemical Reviews**, Whashington, v. 87, n. 5, p. 955-979, 1987.
- RAIKHEL, A.S.; DHADIALLA, T.S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 217-251, 1992.
- RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Advances in Protein Chemistry**, [S.I], v. 23, p. 283-437, 1968.
- RAMALHO, T. C. et al. Construction and assessment of reaction models of Class I EPSP synthase: molecular docking and density functional theoretical calculations. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, Schenectady, v. 27, n. 2, p. 95-208, 2009.
- RANSON, H. et al . Insecticide resistance in dengue vectors. **TropIKA.net**, Geneva , v. 1, n. 1, 2010.
- RAPAPORT, D. C. **The Art of Molecular Dynamics Simulation** (2nd ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2004.
- REITER, P. Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Lake Charles, v.7, p. 52-55, 1991.

REITER, P. Oviposition and dispersion of *Aedes aegypti* in urban environment. **Bulletin de la Sociéte de pathologie exotique**, Paris, v. 89, p. 120-122, 1996.

REITER, P. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: Implications for the efficacy of controls strategies. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, New York, v.7, p. 261-273, 2007.

RESENDE, M. C.; GAMA, R. A. Persistência e eficácia do regulador de crescimento pyriproxyfen em condições de laboratório para *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n.1, p.72-75, 2006.

RESTREPO-ANGULO, I.; DE VIZCAYA-RUIZ, A.; CAMACHO, J. J. Ion channels in toxicology. **Journal of Applied Toxicology**, Sussex, v. 30, p.497-512, 2010.

REZZA, G. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **Lancet**, New York, v. 370, p. 1840-46, 2007.

RIDDIFORD L. M. Hormone action at cellular level. In **Comprehensive insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology** (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert, L. I.) v. 8, p. 37-84, 1985.

RIDDIFORD, L. M. Molecular aspects of juvenile hormone action in insect metamorphosis. In "Metamorphosis: Post-embryonic Reprogramming of Gene Expression in Amphibian and Insect Cells". (In Gilbert, L.I.; Tata, J.R.; Atkinson, B.G.), Academy Press, San Diego, p. 223-251, 1996.

SALKOFF, L. et al. High-conductance potassium channels of the SLO family. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 7, n. 12, p. 921-31, 2006.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 1. n. 1, p. 49-57, 2009.

SANTOS FILHO, O. A. **Modelagem molecular da Di-hidrofolato redutase do plamodium falciparum e estudo de seus inibidores pelo metodo QSAR-3D**. 2000. 210 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2000.

SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 253-259, 2003.

SERRA, O. P. et al. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 1, p. 20-29, 2016.

SILVA, J. J.; MENDES, J. Effect of diflubenzuron on stages of *Hematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae) in Uberlândia, State of Minas Gerais, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 679-682, 2002.

SILVEIRA, R. L. V. de A. Fitotoxicidade de glifosato em *Eucalyptus*. **Addubare**, [S.I.], v. 2, n. 9, p. 4-7, 2003.

SIMOY, M. I.; SIMOY, M. V.; CANZIANI, G. A. The effect of temperature on the population dynamics of *Aedes aegypti*. **Ecological Modelling**, Amsterdam, v. 314, n. 24, p.100-110, 2015.

SMAGGHE G.; GOMEZ, L.E.; DHADIALLA, T.S. Bisacylhydrazine Insecticides for Selective Pest Control. In Tarlochan S. Dhadialla, editor: **Advances in Insect Physiology**, Burlington: Academic Press, v. 43, p. 163-249, 2012.

SMITH, H. C. et al. Synthesis and SAR of cis-1-benzoyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline ligands for control of gene expression in ecdysone responsive systems. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 13, p. 1943-1946, 2003.

SMITH, H. H. **Controlling yellow fever**. In: Strode, G.K. Yellow fever. New York, McGraw-Hill, p. 539-628, 1951.

SOIN, T. et al. Comparison of the activity of non-steroidal ecdysone agonists between dipteran and lepidopteran insects, using cell-based EcR reporter assays. **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, n. 11, p. 1215-29, 2010.

SOREQ, H. et al. Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G + C-rich attenuating structure. **Proceeding of National Academy Science of the United State America**, Washington, v. 87, n. 24, p. 9688-9692, Dec. 1990.

SOUZA, M. L. **Modelagem por homologia de estruturas proteicas do veneno de Apis mellifera**. 2008. 62 p. Monografia (Graduação em Informática Biomédica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

SOUZA, N. A. **Controle de ovos de Aedes aegypti com Metarhizium anisopliae IP 46 por diferentes técnicas**. 2013. 63f. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

SOUZA, T. C. et al. Molecular modelling of Mycobacterium tuberculosis acetolactate synthase catalytic subunit. **Molecular Simulation**, Abingdon, v. 34, n. 7, p. 707-713, 2008.

SPINDOLA, et al. Anti-Mayaro virus activity of Cassia australis extracts (Fabaceae, Leguminosae). **Parasities & Vectors**, London, v. 7, n. 1, p. 537-543, 2014.

SPROSSMANN, F. et al. Inducible knockout mutagenesis reveals compensatory mechanisms elicited by constitutive BK channel deficiency in overactive murine bladder. **FEBS Journal**, Malden, v. 276, p. 1680-1697, 2009.

SRIDHARAN, V.; SURYAVANSHI, P. A.; MENÉNDEZ, J. C. Advances in the chemistry of tetrahydroquinolines. **Chemical Reviews**, Whashington, v. 111, p. 7157-7259, 2011.

STAPLES, J. E.; MONATH, T. P. Yellow Fever: 100 Years of Discovery. **JAMA**, v. 300, n. 8, p 960-962, Aug. 2008.

STRODE, G. K. et al. **Yellow Fever**. New York, NY: McGraw-Hill Book Co; 1951 ISOMAE, K. et al. "Effects of T-82, a new quinoline derivative, on cholinesterase activity and extracellular acetylcholine concentration in rat brain". **Japanese Journal of Pharmacology**, Kyoto, v. 88, n. 2, p. 206-212, 2002.

SUGARHARA, R. et al. Geographic variation in RNAi sensitivity in the migratory locust. **Gene**, Amsterdam, v. 605, p. 5-11, 2017.

SWEVERS, L. et al. The silkworm homolog of the Drosophila ecdysone receptor (B1 Isoform): Cloning and analysis of expression during follicular cell differentiation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Riverside, v. 25, p. 857-866, 1995.

SZYMAŃSKI, P. et al. 2,3-Dihydro-1H-cyclopenta[b]quinoline derivatives as acetylcholinesterase inhibitors—synthesis, radiolabelling and biodistribution. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, p. 10067-10090, 2012.

TAYLOR, P.; RADIC, Z. The cholinesterases: from genes to proteins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v.34, p. 281-320, 1994.

TELES, R. M. **Caracterização Química, Avaliação Térmica e Atividade Larvicida Frente ao *Aedes aegypti* do Óleo Essencial da Espécie Vegetal *Aniba duckei* Kostermans**. 2009. 126f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2009.

TERZIAN, A.C.B. et al. Isolation and characterization of Mayaro virus from a human in Acre, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 92, n. 2, p. 401-404, 2015.

TESH, R. B. et al. Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 28, n.1, p. 67-73, 1999.

THAVARA, U. et al. Efficacy and longevity of a new formulation of temephos larvicide tested in trials against larval *Aedes aegypti* in water storage containers. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Eatontonwn, v. 20, p.176-82, 2004.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for highaccuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, Whashington, v. 49, n. 11, p. 3315-3332, 2006.

TORRES, E. M. **Dengue y dengue hemorrágico**. Buenos Aires/Argentina: editora Nacional da Universidade de Quilmes, p. 24-58, 1998.

TÕUGU, V. Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition. **Current Medicinal Chemistry**, Cambrigde, v. 1, n.2, p. 155-170, 2001.

VAN GUNSTEREN, W. F., BERENDSEN, H. J. C.: Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 29, p. 992-1023, 1990.

VASCONCELOS, P. F C. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.36, n. 2, p. 275-293, 2003.

VIEIRA, L.L.L.M. **Canais iônicos na expansão de células-tromco mesenquimas de cordão umbilical humano**. Dissertação (mestrado). Universidade federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, 2011.

WEAVER, S. C. et al. Zika Virus: History, Emergence, Biology and Prospects for Control. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 130, p.69-80, 2016.

WHO - World Health Organization WHOPEs-recommended compounds and formulations for control of mosquito larvae. Geneva: 2012b. Disponível em [http://www.who.int/whopes/Mosquito\\_Larvicides\\_Sept\\_2012.pdf](http://www.who.int/whopes/Mosquito_Larvicides_Sept_2012.pdf). Acesso em 02 de dezembro de 2017.

WHO - World Health Organization. **Doença do vírus Zika**. Geneva: WHO, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/pt/>. Acesso em 27 de dezembro de 2016.

WHO - World Health Organization. **WHO recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors**. Geneva: 2007. Disponível em [http://www.who.int/whopes/Insecticides\\_IRS\\_Malaria\\_ok.pdf](http://www.who.int/whopes/Insecticides_IRS_Malaria_ok.pdf). Acesso em 02 de dezembro de 2017.

WHO - World Health Organization. **WHO recommended insecticides for space spraying against mosquitoes**. Geneva: 2012a. Disponível em [http://www.who.int/whopes/Insecticides\\_for\\_space\\_spraying\\_Jul\\_2012.pdf](http://www.who.int/whopes/Insecticides_for_space_spraying_Jul_2012.pdf). Acesso em 02 de dezembro de 2017.

WHO - World Health Organization. **Yellow fever**. Geneva: WHO, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>. Acesso em 10 de Janeiro de 2017.

WHO -World Health Organization. **WHO Specifications and evaluations for public health pesticides: temephos**. Geneva: WHO, 1997. Disponível em [http://www.who.int/whopes/quality/Temephos\\_eval\\_only\\_June\\_2011.pdf](http://www.who.int/whopes/quality/Temephos_eval_only_June_2011.pdf). Acesso em 22 de dezembro de 2016.

WIBERG, K. B. A Scheme for Strain energy minimization: application to the cycloalkanes. **Journal of the American Chemical Society**, Utah, v. 87, n. 5, p. 1070-1078, 1965.

WU, R. S.; MARX, S. O. The BK potassium channel in the vascular smooth muscle and kidney:  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits. **Kidney International**, New York, v. 78, n. 10, 963-974, 2010.

YAO, T. P. et al. Drosophila ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. **Cell**, Cambridge, v. 71, p. 63-72, 1992.

YAO, T.P.et al. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. **Nature**, London, v. 366, p. 476-479, 1993.

YOGINDRAN, S.; RAJAN, M. V. Artificial miRNA-mediated silencing of ecdysone receptor (EcR) affects larval development and oogenesis in *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 77, p. 21-30, 2016.

YOSHIOKA, M. et al. Diet and density dependent competition affect larval performance and oviposition site selection in the mosquito species *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasites & Vectors**, London, v. 5, p. 225-235, 2012.

YU et al. Low temperature cleanup combined with magnetic nanoparticle Extraction to Determine Pyrethroids Residue in Vegetables Oils. **Food Control**, Oxford, v. 74, p. 112-120, 2017.

YU, M. et al. Peptide toxins and small-molecule blockers of BK channels. **Acta Pharmacologica Sinica**, Shangai, v. 37, p. 56-66, 2016.

ZARA et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.

ZUCHI, N. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, central-west Brazil . **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Manguinhos, v. 109, n. 6, p. 820-823, 2014.

## SEGUNDA PARTE

### ARTIGO 1

# **Toward the understanding of tetrahydroquinolines action in *Aedes aegypti*: larvicide or adulticide?**

*Artigo publicado no periódico Molecular Simulation*

## **Toward the understanding of tetrahydroquinolines action in *Aedes aegypti*: larvicide or adulticide?**

*Aedes aegypti* is an important vector of arboviruses such as dengue, yellow fever, chikungunya and Zika. Among the various types of insecticides used to combat this vector, the insect growth regulators (IGRs) have been developed and recommended for control of their larvae. In this work compounds with proven regulatory action, tetrahydroquinolines will be studied. These regulators act on the hormones responsible for the insect development. Ecdysone, one of the main hormones involved in this process has a specific receptor (EcR), where tetrahydroquinolines derivatives can bind, disrupting the normal action of this hormone, because they have structure similar to hormone 20-hydroxyecdysone (20E). In addition, studies show that this class of compounds interacts strongly in the potassium channel activated by calcium (BK channel). Thus, the goal is to study the action of compounds (tetrahydroquinolines) as insecticides and evaluate their larvicidal action (action on the ecdysone receptor) or adulticide (action on the BK channel) through homology modeling techniques, molecular docking and molecular dynamics simulations and aiming to propose a compound that presents both actions (larvicide / adulticide).

Keywords: *Aedes aegypti*; Ecdysone receptor; Potassium channel activated by calcium (BK channel); *Docking*; Molecular dynamics.

### **1. Introduction**

Mosquitoes are associated with various health problems. These include yellow fever, malaria, dengue, filariasis, chikungunya, Japanese encephalitis, among others, causing millions of deaths each year. [1,2] *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) (Diptera: Culicidae), in turn, is the vector responsible for transmitting four major diseases: yellow fever, dengue, chikungunya and zika. [2,3]

There are two types of insecticides that are used to combat this vector: adulticides and larvicides. Adulticides are the insecticides used in the fight against adult insects, among these, the pyrethroid Allethrin, the halogenated BHC and Dieldrin, the Malathion phosphide and organochlorine DDT. [4] On the other hand, larvicides can combat immature stages of insects. [4] Chemical and biological larvicides containing a variety of active ingredients like Temephos, BTI and Insect Growth Regulators (IGRs) have been developed and recommended for the control of *Aedes aegypti* larvae. [5,6]

Regarding insect growth regulators, the two main hormones involved in this process, development and reproduction are the 20-hydroxyecdysone steroid hormone (20E) (Figure 1) and juvenile hormone (J ). Interference with these hormones or mechanisms by which they manifest their action results in abnormal development or detrimental growth and reproduction. [7-9]

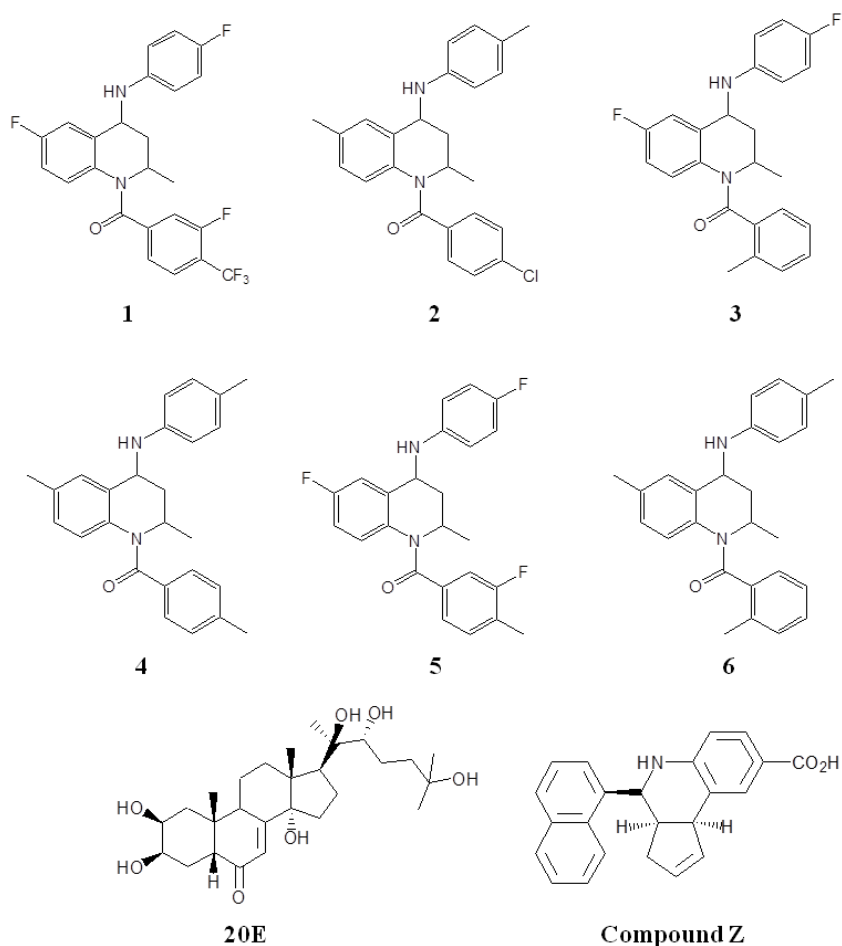


Figure 1. Tetrahydroquinolines studied (1-6) (Palli et al<sup>24</sup> and Smith et al<sup>25</sup>). Chemical structure of  $\beta$ -Ecdysone or 20-hydroxyecdysone (20E) and structure of compound Z[(3*aR*,4*S*,9*bS*)-4-(Naphthalen-1-yl)-3*a*,4,5,9*b*-tetrahydro-3*H*-cyclopenta[*c*]quinoline-8-carboxylic acid] (Ponte et al. [14]).

Thus, any influence on the action of hormones involved in the change and development processes, either by exogenous sources of hormones or their synthetic analogues, could result in the interruption or even abnormality in the development of insects.



Note that ecdysone has a specific receptor (EcR), belonging to the family of nuclear receptors, which are widely distributed throughout the body, in embryos, and several pre-pupal tissues such as imaginal discs, body fat, the trachea, salivary glands, the central nervous system, the intestine and cells associated with cuticular structures. [11]

This receptor plays a critical role in metamorphosis, and development in insects. Despite the similarity, and homologous domains of the nuclear receptors in mammals, the ecdysone receptor and its ligands are orthogonal to receptors of mammals. This property has made EcR an attractive target for environmentally benign insecticides. [11]

It is known that some compounds derived from tetrahydroquinoline work in gene expression performed by this receptor in *Aedes aegypti* (AaEcR) and its action as a larvicide is known. [12,13] Namely, these compounds have structure similar to the 20E hormone (20-hydroxyecdysone), thus affecting its action mechanism. In contrast, studies show that these types of compounds also activate [14] or block [15] the potassium channel activated by calcium (BK channel), which raises the question whether there is thus a possible adulticide action of tetrahydroquinolines.

The BK channel is found throughout the brain. [16,17] It is responsible for regulating smooth muscle tone, neuronal excitability and expertise in the activities of the secretory glands of saliva and electrolytes, among others. [18] It is a homo-tetramer composed of four  $\alpha$  subunits, alone or linked to auxiliary  $\beta$  subunits. In contrast to other voltage dependent potassium channel which have six transmembrane helices (S1-S6), the  $\alpha$  subunit of BK channels has an additional transmembrane domain (S0 at the N -terminus) and a single tail length, intracellular, the C-terminal. [19-21]

Studies show that S0 is responsible for expression and function of the channel. [22] It is also important to note that the S4 portion shows the positively charged residues that are responsible for sensitivity to voltage. [15] The  $\beta$  subunits ( $\beta$ 1-  $\beta$ 4) can modulate the sensitivity to calcium and the voltage of the  $\alpha$  subunit. [23]

Based on this, our goal is to study the action of some tetrahydroquinolines derivatives as insecticides and evaluate their larvicidal (action on the ecdysone receptor) and/or adulticidal action (action on the BK channel) using homology modeling techniques, molecular docking and molecular dynamics simulations. In addition, a new compound has been proposed with both actions, larvicidal and adulticidal, to control the *Aedes aegypti*.

## 2. Methodology

## 2.1 Biological data

We conducted a literature search of some tetrahydroquinoline derivatives, which are insecticides acting on the ecdysone receptor and presenting experimental values. These compounds were synthesized and studied by Palli et al [24] and Smith et al. [25] Their respective experimental data are shown in Figure 1 and Table 1.

Table 1. Experimental values of  $EC_{50}$  (half maximal effective concentration) and  $pEC_{50}$  ( $pEC_{50} = -\log EC_{50}(M)$ )

Compound	$EC_{50}(\mu M)$	$pEC_{50}$
1 <sup>a</sup>	0.45	6.34
2 <sup>b</sup>	2.15	5.67
3 <sup>b</sup>	3.19	5.50
4 <sup>b</sup>	5.01	5.30
5 <sup>a</sup>	5.95	5.22
6 <sup>b</sup>	8.71	5.06

<sup>a</sup> Based on Palli et al. [24]

<sup>b</sup> Based on Smith et al. [25]

## 2.2 Homology modeling

### 2.2.1 *Aedes aegypti* Ecdysone receptor (AaEcR)

The 3D structure of the *Aedes aegypti* ecdysone receptor (AaEcR) was constructed by homology modeling techniques. The receptor modeling began with the request for templates in the Protein Data Bank (PDB) [26] using the BLAST [26,27] as search engine. The template sequence selected to build AaEcR was 1R1K with resolution of 2.90Å and factor R=0.243 and bound to ligand, indicating the binding spot

The validation of the generated models was performed through the Ramachandran [28] chart in which it was possible to analyze the distribution of torsional angles of the backbone  $\phi$  and  $\psi$  responsible for the stereochemical quality of the studied protein.

The assembly of complex [EcR ligand (hormone 20E)], after the model construction, was performed using the overlay in the Swiss-PdbViewer program [29]. In this procedure, the coordinates of the crystal structure of the ligand format (.pdb) are copied to the .pdb file template, forming the complex (model-ligand).

### 2.2.2 BK channel

The three-dimensional structure of the interaction model between the BK channel subunits (S0, S3 and S4) was modeled by our group in a previous study starting from the crystal structure deposited in the PDB (code-3EB3). The S0 portion was introduced through modeling. The literature suggests that this portion is essential for the function of the channel.

It is noteworthy that this target has as active ligand compound Z [(3*aR*,4*S*,9*bS*)-4-(Naphthalen-1-yl)-3*a*,4,5,9*b*-tetrahydro-3*H*-cyclopenta[*c*]quinoline-8-carboxylic acid] synthesized and studied by Ponte et al [14] (Figure 1).

### ***2.3 Molecular Docking of the compounds***

The structures of the tetrahydroquinoline derivatives shown in Figure 1 were constructed by the PC Spartan Pro program. [30] For the molecular anchoring procedure was used the Molegro Virtual docker program (MVD) [31-35], through which the most probable conformation of the ligand receptor/channel was determined. The conformation of the ligand is identified through energy prediction of its interaction with the receptor/channel.

The binding sites were restricted to spheres with 8Å of radius for the receptor and 7Å for the BK channel. For best results, the residue flexibility was kept at 11Å in the docking procedure for both protein and BK channel.

Because of the stochastic nature of the docking algorithm, there were around 20 runs for each compound, resulting in 30 poses each (binder conformation and orientation) that were used to the analysis of receptor/channel-ligand interactions and overlaps with the binding spot into each target.

The best conformation of each ligand was selected according to their position in the active site and the energy value. Selected conformations were used for the analysis of interactions with residues of the active site.

### ***2.4 Molecular dynamics of the compounds***

The molecular dynamic simulations were carried out using AMBER [36] package with the FF03 non-polarized force field. [37]

Analysis of solvation in explicit solvent was performed using the model TIP3P (Transferable Intermolecular Potentials) for water [38] with addition of a cubic box of 7Å distant from the border of the molecule and Na<sup>+</sup> counter ions for neutralization.

These systems were minimized using Steepest Descent method, unrestricted position at first, to relieve highly unfavorable comparisons, followed by minimization by conjugate gradient, which is significantly slower, however most effective in achieving a minimum of energy after the serious clashes were relieved.

System optimization then took place by minimizing energy, conducted with 25000 steps, aiming to reduce unwanted contacts between atoms, minimizing the potential energy of the system. [39] Subsequently the gradual heating from 0K to 310K in six steps was performed for the studied system in order to avoid the formation of "hot spots", that is, regions of the system with highly unstable atoms.

In Steps 1-5, there was an increase in temperature of 50k each and the last step 60k, totaling 310K. Each heating was performed with 25000 steps of 0.0008 ps of time step. Equilibration was then performed with 500000 steps of 0.0008 ps to balance the system at the new temperature using the NVT ensemble. Finally the production of molecular dynamics in 6 series was held, with a time step of 0.0008, totaling 16 ns, using the NPT ensemble.

After the further molecular dynamics analysis for each system, total energy graphics, temporal and spatial standard deviation and hydrogen bonds formed and maintained along the dynamics will be generated. In addition, frames were extracted at set intervals along the dynamics to analyze and compare the dynamic behavior of each ligand in each active site.

### **3. Results and discussion**

#### ***3.1 Homology modeling***

The sequences of the monomeric primary *AaEcR* and template were aligned using the BLAST server. [40, 41] After alignment (Figure 2), we observed that the target receptor showed 74.8% sequence identity with the template receptor. These results are valid, since according to the literature [42], reliable models have identical values greater than 25%.



After the overlay target receptor with the template receptor (Figure 1S-Supplementary Material), it was possible to observe a RMSD (Root Mean Square Deviation) value equal to 0.84Å, showing the major sequence similarity between target and template receptor.

### ***3.2 Docking validation***

The redocking results for hormone 20E in the *AaEcR* active site and compound Z in the BK channel active site are shown in Figure 2S (see Supplementary Material). The RMSD found was 1.08Å and 1.26Å, respectively. Whereas the literature reports that RMSD values under 2.00Å values are acceptable [43-45], these results validate the docking protocol that was used for the calculations.

### ***3.3 Molecular docking in the ecdysone receptor***

Figure 3S (See Supplementary Material) shows the three dimensional structure of the ecdysone receptor obtained by homology modeling, where the  $\alpha$ -helices are shown in red, the ligand (hormone 20E) in yellow and the *loops* are represented in gray.

The volume of the *AaEcR* active site cavity calculated by MVD [31] was 74.59Å<sup>3</sup>. The theoretical results of the molecular docking of the ecdysone receptor were evaluated and compared to the experimental data described by Palli et al. [24] and Smith et al. [25] The poses generated by docking were compared to the 20E hormone from the crystal structure deposited in the PDB. The energies of the intermolecular interaction, the ligand-receptor interaction and hydrogen binding were estimated are reported in Table 2.

Table 2. Values of  $pEC_{50}$  [ $pEC_{50} = -\log EC_{50}(M)$ ] (Palli et al.<sup>24</sup> and Smith et al.<sup>25</sup>), intermolecular interaction energy ( $kcal\ mol^{-1}$ ) receptor/ligand and hydrogen bond ( $kcal\ mol^{-1}$ ) obtained from the docking.

Compound	$pEC_{50}$	$\Delta E.I^*$	Hydrogen binding energy *
<b>Hormone 20E</b>	-	-199.61	-18.78
<b>1</b>	6.34	-161.94	-4.01
<b>2</b>	5.65	-150.18	-5.00
<b>3</b>	5.50	-149.01	-5.00
<b>4</b>	5.30	-146.08	-5.00
<b>5</b>	5.22	-143.03	-3.81
<b>6</b>	5.06	-140.35	-5.00

\* Intermolecular energy interaction

By analysing Table 2 it is possible to conclude that the theoretical results obtained from the *AaEcR* docking procedure are in good agreement ( $R^2=0.98$ ) (Figure 4S - Supplementary Material) with the experimental data described by Palli et al. [24] and Smith et al. [25]

The redocking of the 20E hormone was performed to obtain a model, since this compound acts in the course of the ecdysone receptor. It features the most stable energy ( $-199.61\ kcal\ mol^{-1}$ ) compared to the others. This favorable result is due to the increased number of hydrogen interactions (Table 3) that this compound formed with the receptor site. The Compounds 1, 2 and 3 are those that showed the most promising energy values and Compound 6 the less favorable ( $-140.35\ kcal\ mol^{-1}$ ).

Table 3. Values of angle length (Å) the hydrogen interactions, energy of hydrogen interactions (kcal mol<sup>-1</sup>) and amino acid residues with which the interactions are formed between the compound and the receptor studied.

<b>Compounds</b>	<b>Connection Length</b>	<b>Hydrogen bond energy</b>	<b>Amino acid residues</b>
<b>Hormone 20E Re-docking</b>	2.63	<b>-2.50</b>	Glu23
	3.08	<b>-2.50</b>	Glu23
	2.68	-2.47	Thr56
	2.09	-1.84	Arg96
	2.60	<b>-2.50</b>	Arg100
	2.67	<b>-2.50</b>	Ala111
	2.93	-2.01	Tyr121
	2.71	-2.07	Asn217
<b>1</b>	3.05	<b>-2.50</b>	Thr56
	3.26	-1.51	Tyr121
<b>2</b>	2.61	<b>-2.50</b>	Thr56
	2.96	<b>-2.50</b>	Tyr121
<b>3</b>	2.71	<b>-2.50</b>	Thr56
	2.83	<b>-2.50</b>	Tyr121
<b>4</b>	2.75	<b>-2.50</b>	Thr56
	3.08	<b>-2.50</b>	Tyr121
<b>5</b>	2.84	<b>-2.50</b>	Thr56
	3.35	-0.97	Tyr121
<b>6</b>	2.60	<b>-2.50</b>	Thr56
	2.84	<b>-2.50</b>	Tyr121

According to the results described in Table 3, all compounds studied showed interactions with Thr56 and Tyr121 residues, which were also observed with the 20E hormone (besides others: Glu23, Arg96, Arg100, Ala111 and Asn217) (Figure 4). These residues are certainly contribute to the stabilization of the compounds in the ecdysone receptor binding site. We also verified if other interactions are present, such as electrostatic, but none were observed with significant energy values.



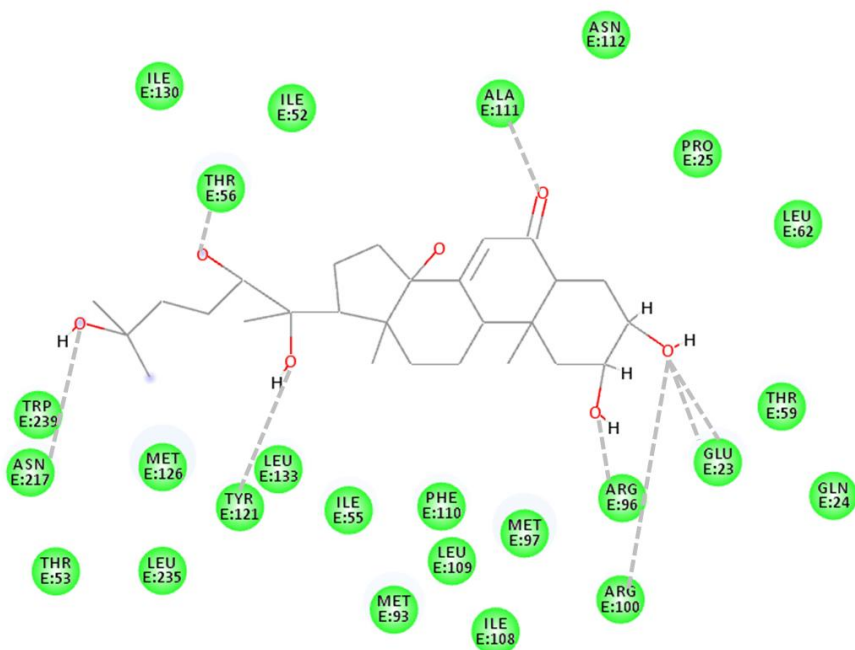


Figure 4. Hydrogen Interactions observed between the hormone 20-hydroxyecdysone (20E) and AaEcR.

We also analyzed the accommodation of compounds within the receptor cavity. Through Figure 5(a), it can be inferred that all of the compounds followed the same trend as well as being accommodated inside this cavity. After that, the  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions were also analysed. After analysis, it was observed that there is a possible interaction with Phe110 amino acid residue that contributes to an extra stability, which was observed with all compounds (1 to 6) (Figure 5(b)).

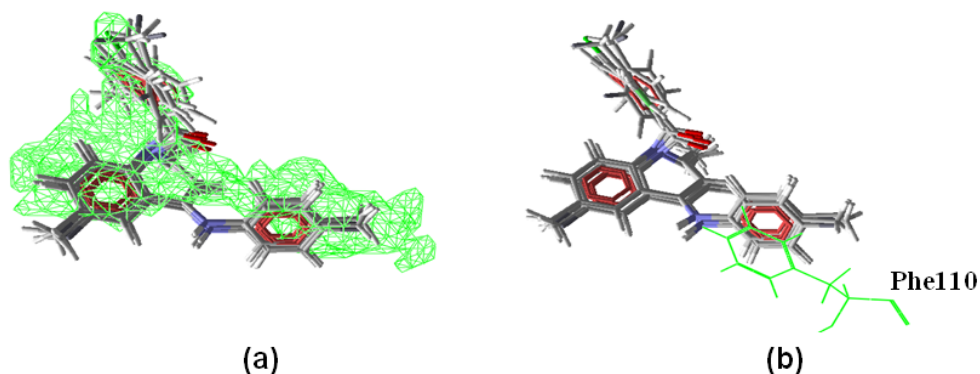


Figure 5. (a) All test compounds within the cavity. (b) Possible interaction  $\pi$ - $\pi$  stacking between Phe110 and the compounds under study.

Our findings have highlighted Compound 1 with presenting the most promising results (Table 2) for both experimental and theoretical (energy values). Their interactions are detailed in Figure 5S (Supplementary Material).

The difference in energy values could not be explained taking into account only the docking results. It is noticeable that hydrogen interactions, alone, do not explain this difference. Thus, the molecular dynamics (MD) results, which will be discussed later, could, in principle, be useful for that rationalization.

### 3.4 Molecular docking in the BK channel

Figure 6S shows the three-dimensional structure of the interaction model between the BK channel subunits (S0, S3 and S4) where the  $\alpha$ -helices are shown in red, the patterned S0 subunit ( $\alpha$ -helix) in orange, the  $\beta$ -sheet in blue and the loops are represented in gray.

The volume of the cavity of the active site of the BK channel calculated by MVD [31] was 67.07 Å<sup>3</sup>. The theoretical results of molecular docking in the channel were evaluated and the poses generated were compared with active ligand Z. The intermolecular interaction energies, such as hydrogen bond and electrostatic energies in the channel were calculated and are reported in Table 4.

Table 4. Interaction (kcal mol<sup>-1</sup>), electrostatic, long-range electrostatic (kcal mol<sup>-1</sup>) and hydrogen binding energy values as well as bond length values (Å) and main amino acid residues responsible for the interaction between compounds and the channel.

Compound	$\Delta E.I^*$	$\Delta E_{Elet}^*$	$\Delta E_{EletLong}^{**}$	Hydrogen binding energy	Connection Length	Amino acid residue
1	-138.83	-0.36	-0.07	-2.50	2.65	S0
2	-137.68	-2.00	1.83	-0.44	2.73	Gln215
				-2.50	3.07	S0
3	-113.12	0.16	0.14	-0.93	3.41	S0
4	-141.92	0.39	-0.30	-0.15	3.31	Gln215
				-2.50	2.76	S0
5	-139.11	-0.01	-0.18	-2.08	3.18	S0
6	-127.06	0.74	-0.53	-1.78	3.24	S0

\* Energy intermolecular interaction

\*\*Electrostatic Energy  $r < 4.5 \text{ \AA}$  between the protein and the ligand (EElect)

\*\*\* Electrostatic Energy  $r > 4.5 \text{ \AA}$  between the protein and the ligand (EElectLong)

As shown in Table 4, Compound 4 stands out with respect to the energy values, followed by 5 and 1. Note also that all of the compounds anchored in the channel have an interaction with an amino acid present in the S0 portion (Figure 7S – Supplementary Material). These interactions with the S0 portion seem to be actively contributing to the

stabilization of compounds within the channel. Moreover, these interactions with that portion can thereby lead to changes in channel function and damage to *Aedes aegypti*, since according to the literature [22] S0 is responsible for the function and expression of the BK channel.

It can also be observed in Table 4 that in most cases, lower interaction energy values are accompanied by lower hydrogen bond energy values. In this case, it can be inferred that the hydrogen interactions are contributing to compound stabilization in the channel active site.

We can also point out that Compounds 2 and 4 can also perform a weak interaction with amino acid residue Gln215. This feature belongs to the S4 portion responsible for the channel voltage. This interaction may influence the normal operation of the channel. In addition to those mentioned, there were no significant interactions with other amino acids.

Electrostatic interactions have also been observed in the docking study and are represented in Figure 6.

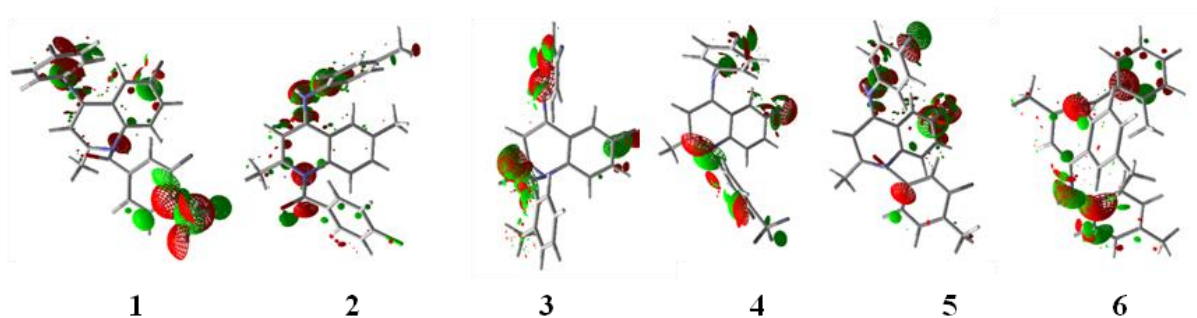


Figure 6. In electrostatic interactions of the studied compounds. In green are the negative and red positive interactions.

It is known that electrostatic interactions with the polarization and van der Waals force fundamentally contribute to the intermolecular interactions [46]. These interactions observed in our study can contribute to an extra stabilization of the compound inside the channel.

### ***3.5 Molecular dynamics simulations on targets***

After the docking studies on the ecdysone receptor, all compounds were subjected to molecular dynamics simulation in order to analyze their behavior in the interior of the receptor and compare it with the docking results, thereby obtaining information for proposing a new potential insecticide.

One of the most common measures to assess the protein behavior along the simulation is the quantification of the structural deformation compared to the initial reference point. This

assessment is done by RMSD (Root Mean Square Deviation). In this sense, RMSD analyses were made with different focuses to make it possible to evaluate the behavior of different regions and not just of the whole.

The RMSD graphs were generated with reference to the following groups of atoms: all atoms; only the alpha carbon atoms; only the binder atoms; and finally the ligand atoms and the amino acid atoms considered as belonging to the active site of the receptor (for RMSD of alpha carbons see Supplementary Material).

Regarding the ecdysone receptor, Figure 7 reports the temporal RMSD results. These calculations were performed on all atoms of the complex for all simulation time 16ns.

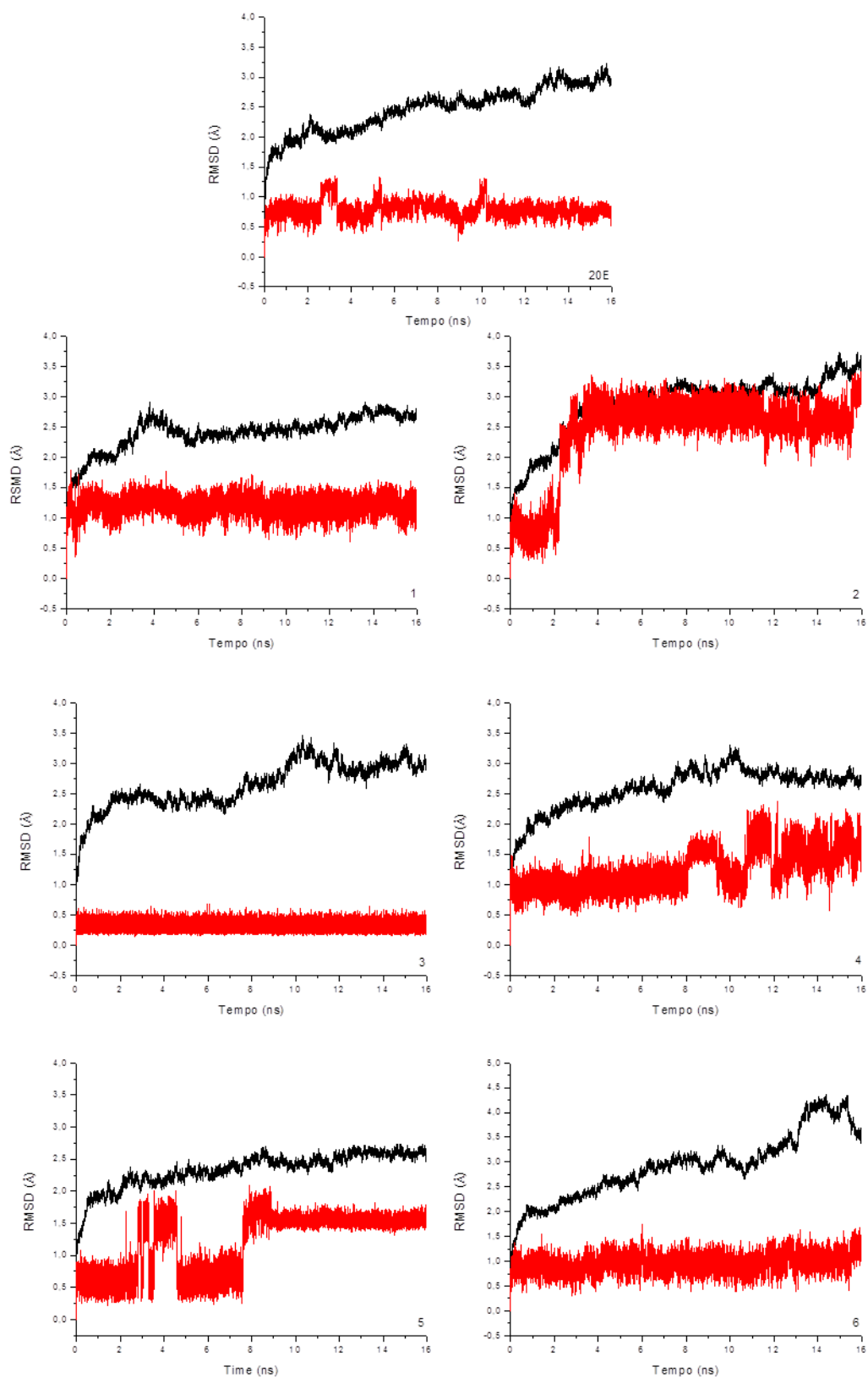


Figure 7. DRMQ *versus* Time for the simulation of compounds 1, 2, 3 , 4, 5, 6 and 20E hormone / *AaEcR*. The receptor curve is represented in black and the compounds in red.

Based on the analysis of RMSD binding of Figures 1, 3, 6 and the 20E hormone, it can be concluded that they meet the requirement proposed in the literature [47] which suggests that an ideal RMSD variation is not greater than 3Å. Furthermore, there was an abrupt variation compared to other systems. These compounds seem to be better accommodated in the active site of the ecdysone receptor.

Among all results, Compound 3 deserves special attention. As can be seen in Figure 7, the RMSD tends to stabilize in the first nanoseconds, not exceeding 0.75Å. This result suggests that there is a good interaction between the ecdysone receptor and this compound, which settles well in the active site cavity for the simulated time, showing system stabilization.

It is also worth noting that Compound 3 stabilizes in less time than the 20E hormone (model) and has less variation over time. However, the total energy (Figure 8S - Supplementary Material) was higher than all other studied systems (around -64375 KJ mol<sup>-1</sup>) (see Figures 8S to 15S - Supplementary Material). In all other graphics (2, 4 and 5), it is possible to see a greater variation of RMSD values resulting in a non-stabilized system during the simulation time.

It is important to note that the active site do not show large structural modifications, which indicate that, despite the behavior of the ligands that have major changes (compounds 2, 4 and 5), the structure of the binding spot is well defined, suggesting that the contributions to the activity is only due to the prototype compounds itself.

By analyzing of pharmacophore maps (Figure 16S to 23S-Supplementary Material) obtained after the dynamic, it can be inferred that the hydrogen interactions are not the only interactions responsible for the molecule stability differences, which is consistent with the docking results. It should be kept in mind that in the docking study we observed only hydrogen interactions and possible  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions. Besides these, in the MD simulation it was also possible to observe other interactions.

From the pharmacophore map, it can be inferred that the Compounds 2, 3 and 6 show  $\pi$ - $\pi$  stacking interaction with Tyr121 amino acid residue (Supplementary Material), which can contribute to the stabilization of the studied compound inside the receptor. In addition, six hydrogen interactions were observed between the 20E hormone and protein (Figure 16S – See Supplementary Material) with the amino acids Glu23, Thr56, Ala111, Tyr121, Asp217. Compound 3 also presents an interaction with Leu109 (Figure 8(a)). For the other compounds no hydrogen interactions along the dynamic simulation was observed. There

were also interactions between fluorine atoms present in the Compounds 1 (Figure 8(b)) and 5 (Figure 20S - Supplementary Material) with the protein.

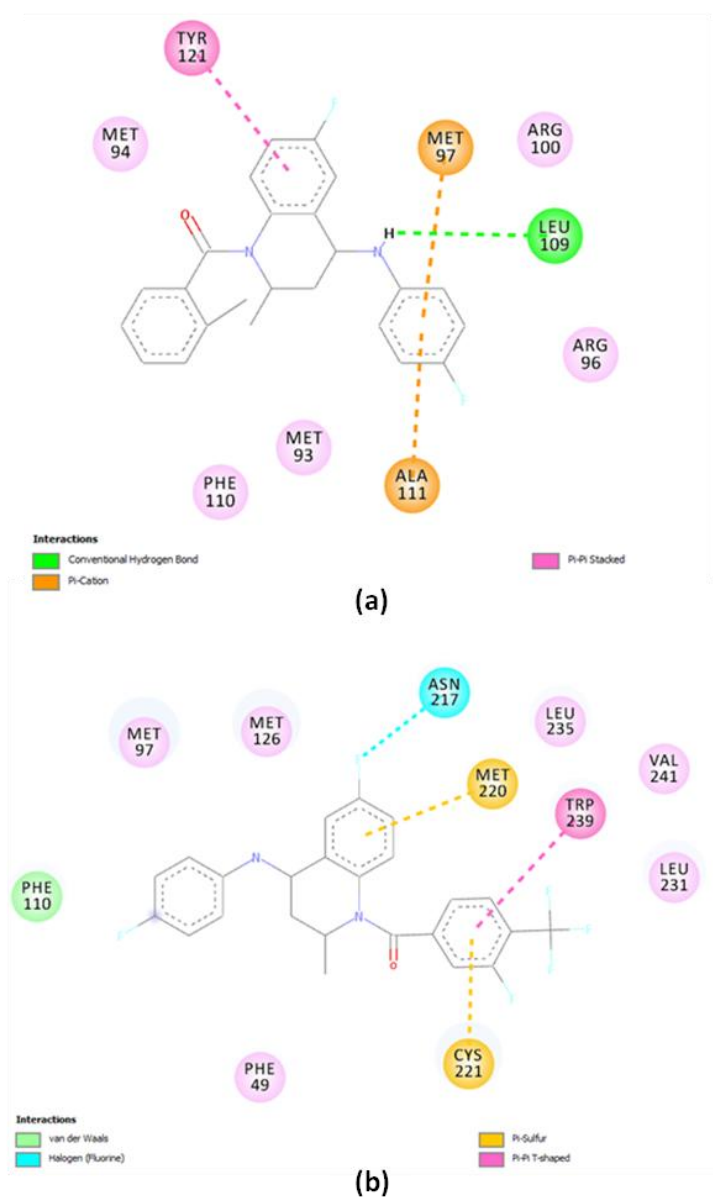


Figure 8. (a) Map pharmacophore after the dynamic of compounds 3 and 1 (b).

It is noteworthy that the unavailability of the complete structure of the BK channel and information as to its modeling resulted in non-realization of molecular dynamics studies in this target.

#### 4. Prototype pesticide proposal

For proposing new structures, two compounds were selected as a starting point. The selection was promoted based on the experimental and the theoretical (*dockings* and molecular dynamics) results in both the receptor and the channel. The selected compounds were 1 and 3. These compounds have excelled in both targets and as one of the objectives of this work is to propose a new compound with both actions, larvicidal and adulticidal, they were chosen.

According to Tables 2 and 4, Compound 1 showed significant intermolecular interaction energy values compared to the other compounds both on the receptor and channel. It is noteworthy that other compounds, like 4 and 5, showed energy values even lower than the 1 in the channel, but this difference is not as significant as the energy value for 1 in the receptor. Thus this compound was selected as the starting point for the formulation of new structures. DM results in the receptor suggest that this compound is well anchored (stable) in the active site of the target.

However, Compound 3 showed a significant difference between the values observed in the docking of the receptor and the channel. In the receptor docking it presented one of the most favorable results, because of the less favorable channel. Thus, this compound was also selected to be analyzed, and was verified that promotes this stability difference guiding us also to key positions in the structure of a good insecticide. It is noteworthy that this compound was that which stood out in the results of RMSD in MD simulations on the receptor.

Initially, a structural analysis was performed of all compounds studied (1 to 6) to select some important information to be used in modifications of Compounds 1 and 3.

When comparing Compounds 1 and 5 (Figure 1), for example, it can be seen that their structures differ only in the substituent at the  $R_4$  position, 1 ( $R=CF_3$ ) and 5 ( $R=CH_3$ ) (Figure 9), but it is possible to notice a significant difference in  $EC_{50}$  values. [48] It is the same occurs with Compounds 2 ( $R=Cl$ ) and 4 ( $R = CH_3$ ). Therefore, this position was selected to carry out the modifications aiming to develop other possible new insecticide target groups (Figure 9).





**Table 5.** Changes performed and estimated values of the intermolecular interaction energy (kcal mol<sup>-1</sup>) obtained in anchoring for the ecdysone receptor and BK channel.

Compound	AaEcR	BK Channel	R
	I.E. (kcal mol <sup>-1</sup> )*	I. E. (kcal mol <sup>-1</sup> )*	
<b>3</b>	-149.02	-113.12	H
JG1**	-166.10	-157.28	F
<b>JG2**</b>	<b>-185.47</b>	<b>-144.20</b>	<b>CF<sub>3</sub></b>
JG3**	-164.27	-106.16	CH <sub>3</sub>
JG4**	-171.69	-130.53	Cl
JG5**	-167.54	-106.32	NH <sub>2</sub>
<b>1</b>	-161.94	-138.83	CF <sub>3</sub>
JG6**	-114.84	-110.01	NH <sub>2</sub>
JG7**	-106.51	-138.00	F
JG8**	-148.40	-125.51	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
JG9**	-103.34	-108.06	Cl

\* I.E.: Intermolecular energy \*\* Novel compounds proposed.

The changes made in the structure of the compound 1 resulted in JG6 the JG9 structures. It is important to note that there was a significant increase in the energy of interaction of these compounds in both targets under study. With this, once again it was proven the importance of the CF<sub>3</sub> group in position R.

The modifications made in the structure of the compound 3 resulted in compounds JG1 to JG5. Through the study in AaEcR noted that all groups inserted in the position R contributed to an increase in the stability of the compounds formed in the study at the receptor, these values even lower than the compound 1 which was the most promising experimentally and theoretically. In the anchoring in the channel, it was observed that the modification with substituents F, Cl and CF<sub>3</sub> promoted a significant reduction in energy values which would certainly influence the increased stability of these compounds on BK.

Based on this, we can highlight the results of JG1 and JG2 compounds with promising chances synthesis and subsequent biological test. Among these stands out the JG2 for further analysis through molecular dynamics simulations, since both results presented in both the modification of compound 1 as the 3 became evident the importance of the CF<sub>3</sub> group at the R position and this was confirmed by significant interaction energy values. Furthermore, as the objective is to propose a compound with both actions, larvicide (acting in ecdysone receptor) and adulticide (acting on BK), this compound satisfy the objective of the work.

About anchoring study in AaEcR, JG2 presented two strong hydrogen interactions. One to Thr56 (-2.50 kcal mol<sup>-1</sup>) and the other with Tyr121 (-2.50 kcal mol<sup>-1</sup>) residues (Figure 24S – Supplementary Material), the same interactions observed in compounds 1 to 6. In the

BK this same compound also conducted two interactions, strong ( $-2.50 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) with Tyr203 and a weak ( $-0.13 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) with the Gln215 residue. Note that these two residues, Tyr203 and Gln215 are part of the S4 portion of the BK channel. These interactions may influence the control channel voltage and consequently causing an abnormality in the operation of this channel in *Aedes aegypti*.

It is noteworthy that the interaction with Tyr203 was not observed in any of the studies with Compounds 1 to 6 (Table 4). Thus, this is contributing to greater stability of the proposed compound in the BK channel. Figure 26S (Supplementary Material) presents the RMSD graph resulting *from* the MD simulation in the ecdysone receptor.

One can infer that the result meet the requirement proposed in the literature. The value is only  $2.5 \text{ \AA}$ , but there is no stabilization in simulation time. Figure 25S (Supplementary Material) shows the total energy value for simulation with JG2. It was observed that the values obtained for other compounds was very close to (around  $-64375 \text{ KJ mol}^{-1}$  Supplementary Material) except Compound 3, which had a value of around  $-54375 \text{ KJ mol}^{-1}$ .

After the dynamic it was possible to see that the JG2 (Figure 10) held one  $\pi$ - $\pi$  interaction stacking with Phe110 amino acid, which has been indicated as a possible interaction in the *docking* calculations. Surely this interaction is contributing to greater stability of these compounds.

Furthermore, a hydrogen interaction was observed with the interaction of Arg96 and a fluorine compound added to the amino acid Met220. So these interactions can explain the best energy values (*docking*) presented in the proposed JG2 compound.

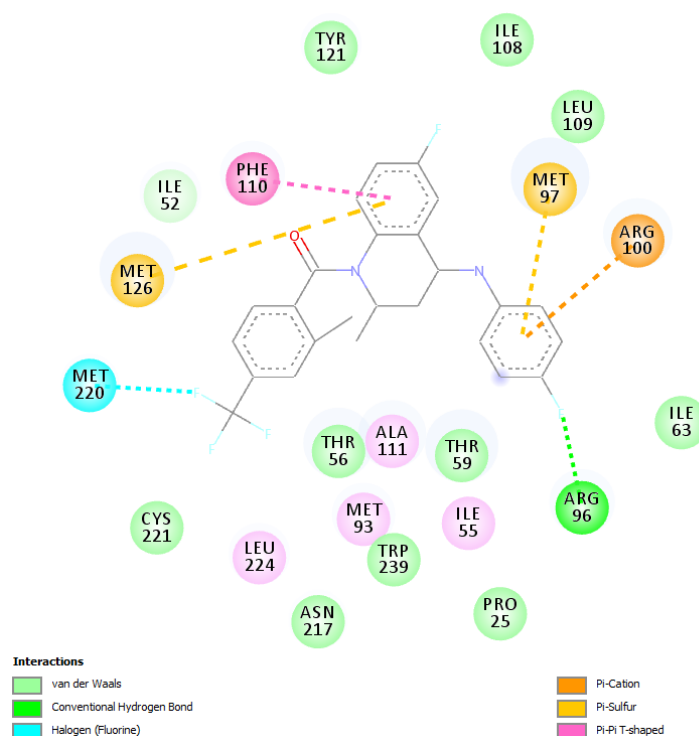


Figure 10. Map pharmacophore after dynamic - JG2.

It is noteworthy that it was not possible to perform dynamics studies in the BK channel due to non-availability of the full channel structure.

## 5. Conclusions

Due to the high sequence identity between the mold receptor and target, it was possible to build a consistent model for the *AaEcR* three dimensional structure. This modeled receptor allow the realization of the docking procedures of this study whose results showed that Compound 1 is more stable on its site than the other compounds, which explains its best  $EC_{50}$  value and consequently its action as an insecticide. RMSD results of this compound confirmed its stability within the ecdysone receptor.

In the docking results for the channel, Compound 4 stands out in theoretical results, followed by Compounds 5 and 1. Compound 3 presents the least favorable results. However Compounds 1 and 3 were selected as the starting point for the design of new structures, because both compounds present good results for both targets. Compound 3 revealed a significant difference energy values and formed the most stable complex (RMSD values) with the protein during the simulation time.

Nine new structures were generated with that. By presenting better results from docking on both targets the JG2 compound was selected. Dynamic studies in the receptor show  $\pi$ - $\pi$  stacking-type interaction with Phe110 amino acid, a interaction of the fluoride present in the compound with amino acid Met220 and a hydrogen interaction with the Arg96 which contribute to this compound to stabilize the receptor binding site. It was not feasible to perform dynamic studies in BK channel due to currently unavailability full channel structure, but the docking studies show good results which can then be better assessed.

Our theoretical findings indicate this prototype to better research with promising chances for synthesis and further biological testing.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank the Brazilian financial agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Federal University of Lavras (UFLA) for providing the physical infrastructure and working space. This work was also supported by Excellence project FIM.

### **References**

- [1] Vatandoost H, Vaziri M. Larvicidal activity of neem extract (*Azadirachta indica*) against mosquito larvae in Iran. *Pestology*. 2001; 25: 69–72.
- [2] Bosire CM, Deyou T, Kabaru JM, et al. Larvicidal activities of the stem bark extract and rotenoids of *Millettia usaramensis* subspecies *usaramensis* on *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *J Asia Pac Entomol*. 2014; 17:531-535.
- [3] Simoy MI, Simoy MV, Canziani GA. The effect of temperature on the population dynamics of *Aedes aegypti*. *Ecolog Model*. 2015; 314:100–110.
- [4] Costa FM. Avaliação da atividade inseticida do regulador de crescimento de insetos Diflubenzuron contra *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera, Culicidae), em condições de laboratório. Dissertação. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2007.
- [5] Mulla MS, Thavara U, Tawatsin A, et al. Procedures for evaluation of field efficacy of slow release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water storage containers. *J Am Mosq Control Assoc*. 2004; 20:64-73.
- [6] Thavara U, Tawatsin A, Kong-Ngamsuk W, et al. Efficacy and longevity of a new formulation of temephos larvicide tested in trials against larval *Aedes aegypti* in water storage containers. *J Am Mosq Control Assoc*. 2004; 20:176-82.

- [7] Smaghe G, Gomez LE, Dhadialla TS. Bisacylhydrazine Insecticides for Selective Pest Control. In Tarlochan S. Dhadialla, editor: *Advances in Insect Physiology*, v. 43, Burlington: Academic Press, 2012.
- [8] Riddiford LM. Hormone action at cellular level. In *Comprehensive insect Physiology. Biochem Pharmacol* (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert, L. I.), 1985; 8:37-84.
- [9] Cho WL, Kapitskaya MZ, Raikhel AS. Mosquito ecdysteroid receptor: Analysis of the cDNA and expression during vitellogenesis. *Insect Biochem Molec Biol.* 1995; 25:19-27.
- [10] Hoffmann KH, Lorenz MW. Recent advances in hormones in pest control. *Phytoparasitica.* 1998; 26: 1-8.
- [11] Koelle MR, Talb WS, Segraves WA, et al. The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell.* 1991; 67:59–77.
- [12] Sridharan V, Suryavanshi PA, Menéndez JC. Advances in the chemistry of tetrahydroquinolines. *Chem Rev.* 2011; 111:7157-7259.
- [13] Smith HC, Cavanaugh CK, Friz JL, et al. Synthesis and SAR of cis-1-benzoyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline ligands for control of gene expression in ecdysone responsive systems. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003; 13:1943-1946.
- [14] Ponte C.G, McManus OB, Schmalhofer WA, et al. Selective, Direct Activation of High-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channels Causes Smooth Muscle Relaxation. *Mol Pharmac.* 2012; 81:567-577.
- [15] Yu M, Liu SL, Sun PB, et al. Peptide toxins and small-molecule blockers of BK channels. *Acta Pharmacol Sin.* 2016; 37: 56-66.
- [16] Sausbier U, Sausbier M, Sailer CA, et al. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of the BK-type in the mouse brain. *Histochem Cell Biol.* 2006; 125:725–741.
- [17] Cox, DH. Modeling a Ca<sup>2+</sup> Channel/BKCa Channel Complex at the Single-Complex Level. *Biophys J.* 2014; 12:2797-2814.
- [18] Perry MD, Sandle GI. Regulation of colonic apical potassium (BK) channels by camp and somatostatin. *Am J Phys-Gastr L.* 2009; 297:159-167.
- [19] Meera P, Wallner M, Song M, Toro L. Large conductance voltageand calcium-dependent K<sup>+</sup> channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94: 14066–14071.
- [20] Wallner M, Meera P, Toro L. Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels: an additional

transmembrane region at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 14922–14927.

- [21] Koval OM, Fan Y, Rothberg BS. A role for the S0 transmembrane segment in voltage-dependent gating of BK channels. *J Gen Physiol.* 2007; 129: 209–20.
- [22] Liu G, Zakharov SI, Yang L, et al. Position and Role of the BK Channel Subunit S0 Helix Inferred from Disulfide Crosslinking. *J Gen Physiol.* 2008; 6: 537-48
- [23] Contreras GF, Castillo K, Enrique N, et al. A BK (Slo1) channel journey from molecule to physiology. *Channels (Austin).* 2013; 7: 442-58.
- [24] Palli SR, Hormann RE, Schlattner U, et al. Ecdysteroid receptors and their applications in agriculture and medicine. *Vitam Horms.* 73:59-100.
- [25] Smith HC, Cavanaugh CK, Friz JL, et al. Synthesis and SAR of cis-1-benzoyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline ligands for control of gene expression in ecdysone responsive systems. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003; 11:1943-1946.
- [26] Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al. The protein data bank. *Nucleic Acids Research,* 2000; 28: 235-242.
- [27] Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Bio.* 1990, 215: 403-410.
- [28] Ramachandran, G. N.; Sasisekharan, V. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv Protein Chem,* 1968; 23:283-437.
- [29] Guex, N.; Peitsch, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 1997; 18:2714-2723.
- [30] Hehre WJ, Deppmeier, BJ, Klunzinger PE. *PC Spartan Pro.* Wavefunction Inc. Irvine, California, 1999.
- [31] Thomsen R, Christensen MH. MolDock: a new technique for highaccuracy molecular docking. *J Med Chem,* 2006. 49:3315-3332.
- [32] Cunha EFF, Ramalho TC, Reynolds RC. Binding mode analysis of 2,4-diamino-5-methyl-5-deaza-6-substituted pteridines with *Mycobacterium tuberculosis* and human dihydrofolate reductases. *J Biomol Struct Dyn.* 2008; 25:377-385.
- [33] Lima WEA, Pereira AF, Castro AA, et al. Flexibility in the Molecular Design of Acetylcholinesterase Reactivators: Probing Representative Conformations by Chemometric Techniques and Docking/QM Calculations. *Lett Drug Des Discov.* 2016; 13:360-371.
- [34] Castro AA, Caetano MS, Silva TC, et al. Molecular Docking, Metal Substitution and Hydrolysis Reaction of Chiral Substrates of Phosphotriesterase. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2016; 19:334-344.

- [35] Martins TLC, Ramalho TC, Figueroa-Villar JD, et al. Theoretical and experimental C-13 and N-15 NMR investigation of guanyldiazones in solution. *Magn Reson Chem.* 2003; 41:983-988.
- [36] Case D, Darden T, Cheatham TI, et al. AMBER 11, San Francisco: University of California; 2010.
- [37] Duan Y, Wu C, Chowdhury S, et al. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J Comput Chem.* 2003; 24:1999–2012.
- [38] Åqvist, J. Ion-water interaction potentials derived from free energy perturbation simulations. *J Phys Chem.* 1990; 94:8021–8024.
- [39] Namba AM, Silva VB; Silva, CHTP. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclet Quim.* 2008; 33:13-24.
- [40] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research.* 1997; 25:3389-3402.
- [41] Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al. The protein data bank. *Nucleic Acids Research.* 2000; 28:235-242.
- [42] Santos Filho AO, Alencastro RB. Modelagem de proteínas por homologia. *Quim Nova.* 2003; 26: 253-259.
- [43] Kontoyanni M, McClellan LM, Sokol GS. Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms. *J Med Chem.* 2004; 47: 558-565.
- [44] Leach AR, Shoichet BK, Peishoff CE. Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps. *J Med Chem.* 2006; 49:5851-5855.
- [45] Warren GL, Andrews CW, Capelli AM, et al. A critical assessment of docking programs and scoring functions. *J Med Chem.* 2006; 49: 5912-5931.
- [46] Guimarães CRW. As Múltiplas Contribuições para a Complexação Proteína-Ligante: Consequências em Drug Design. *Rev Virtual Quim.* 2012; 4: 348-364.
- [47] Shamim A, Abbasi SW, Azam SS. Structural and dynamical aspects of *Streptococcus gordonii* FabH through molecular docking and MD simulations. *J Mol Graph Model.* 2015; 60:180-96.
- [48] Assis TM, Gajo GC, de Assis, LC, et al. QSAR Models Guided by Molecular Dynamics Applied to Human Glucokinase Activator. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2016; 19:334-344.
- [49] Kitamura S, Harada T, Hiramatsu H, et al. Structural requirement and stereospecificity of tetrahydroquinolines as potent ecdysone agonists. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014; 7: 1715-1718.



## Supplementary on line Material

**Toward the understanding of the action of tetrahydroquinolines in *Aedes aegypti*: larvicide or adulticide?**



Figure 1S. Target receptor Backbones of overlap (*AaEcR*) and the mold receptor (1R1K) .

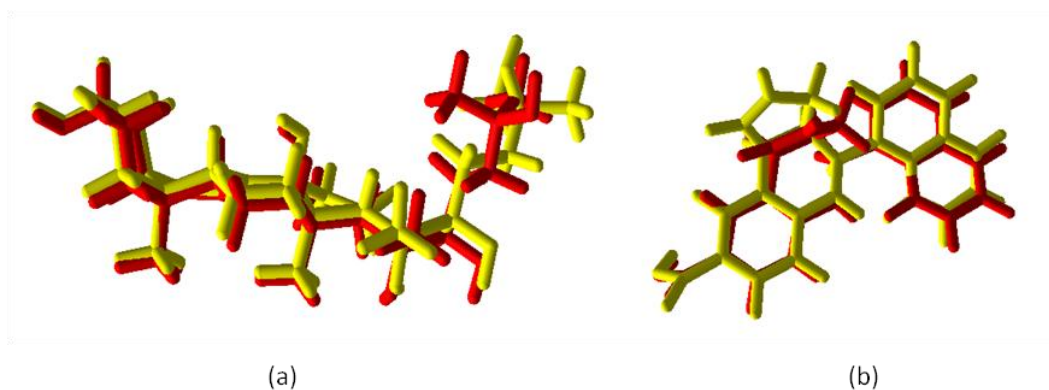


Figure 2S. Docking validation. Redocking of the 20E hormone within the *AaEcR* (a) and the compound Z within the BK channel (b).

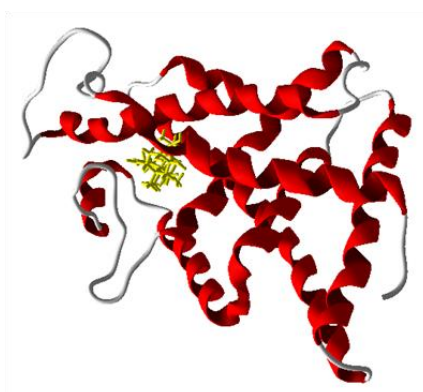


Figure 3S. *AaEcR* obtained by homology modeling.

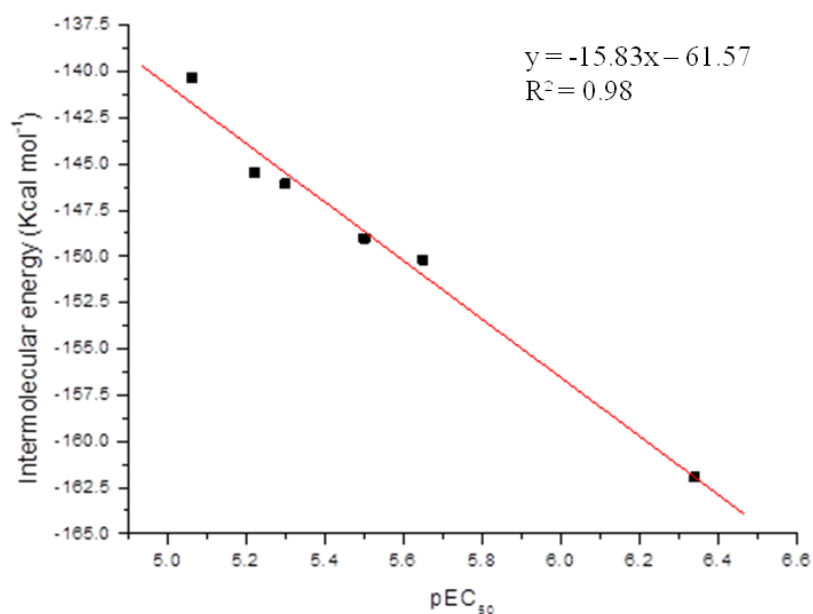


Figure 4S. Energy values intermolecular estimated the docking analysis in comparison to experimental data\* (SOIN et al., 2010 e PALLI et al., 2005)

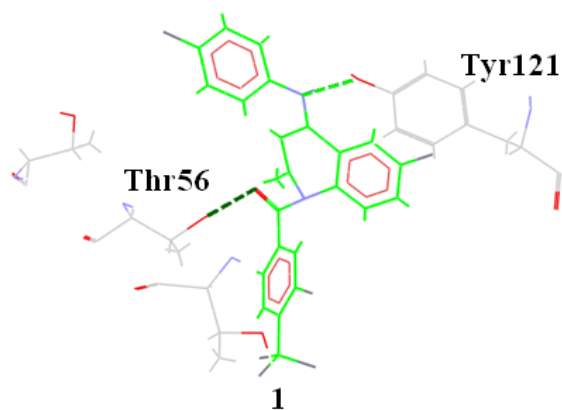


Figure 5S. Interactions observed between the compound 1 and *AaEcR* receiver.

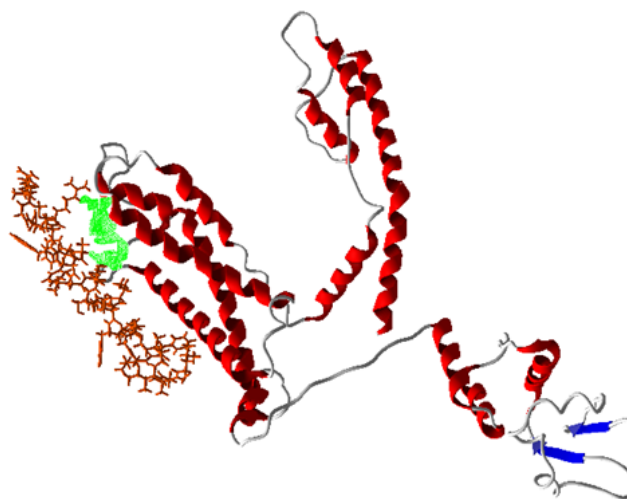


Figure 6S. The three-dimensional structure of the interaction model between the BK channel subunits. The cavity is represented in green.

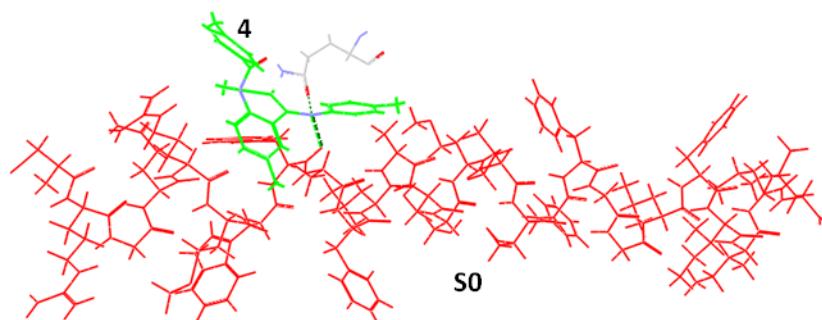


Figure 7S. Compound 4 (Green) docked inside the BK channel and S0 portion (red) introduced by modeling.

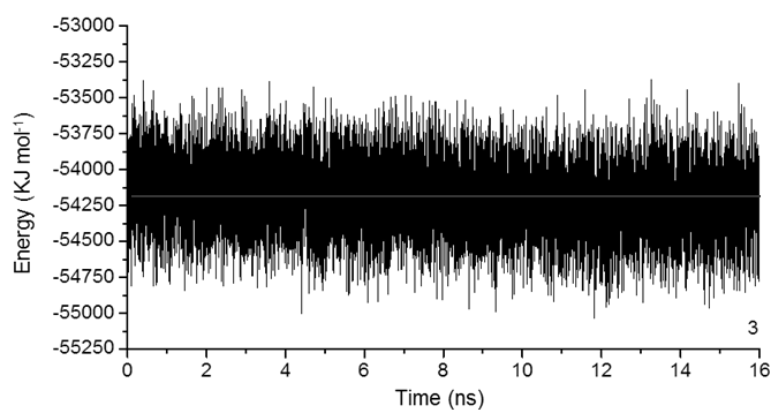


Figure 8S. Variation of total energy for the system 3/AaEcR.

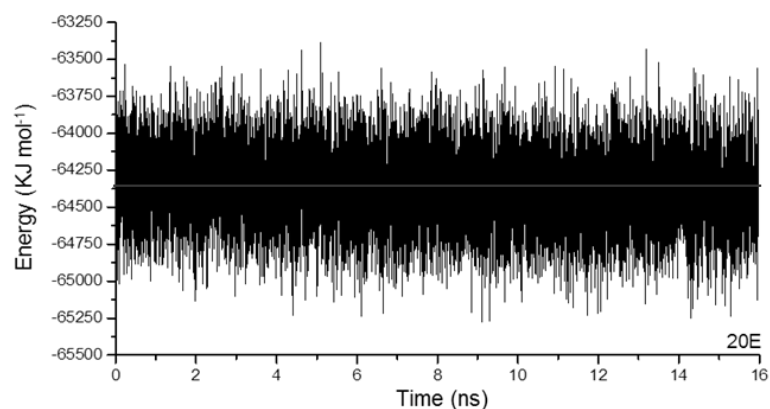


Figure 9S. Change in the total energy to the system 20E/AaEcR.

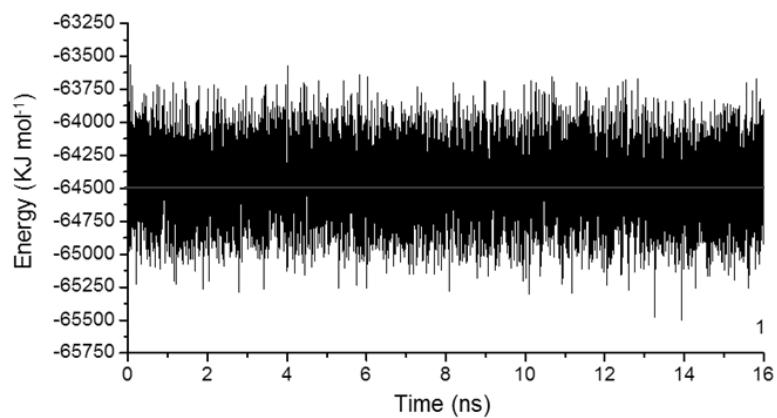


Figure 10S. Change in the total energy to the system 1/AaEcR.

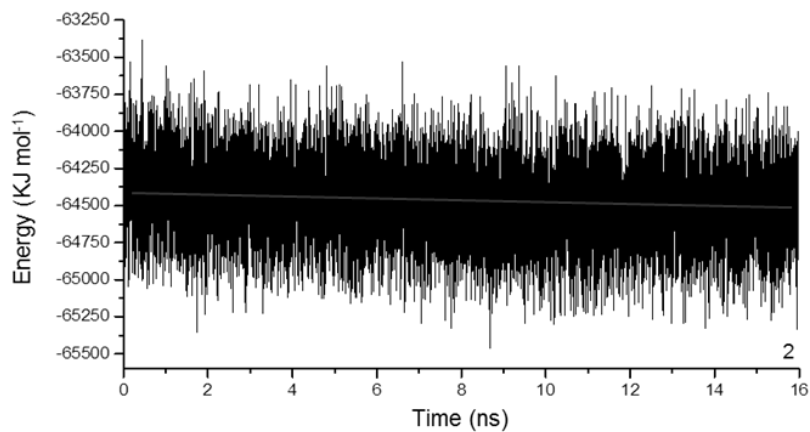


Figure 11S. Change in the total energy to the system 2/AaEcR.

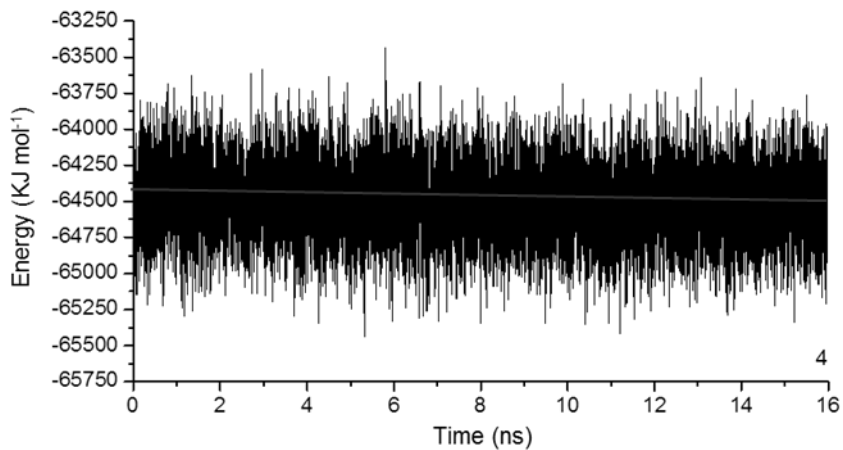


Figure 12S. Change in the total energy to the system 4/AaEcR.

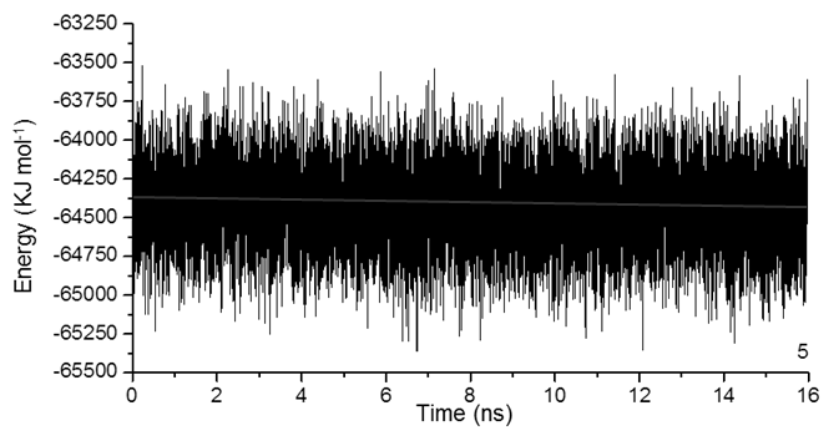


Figure 13S. Change in the total energy to the system 5/AaEcR

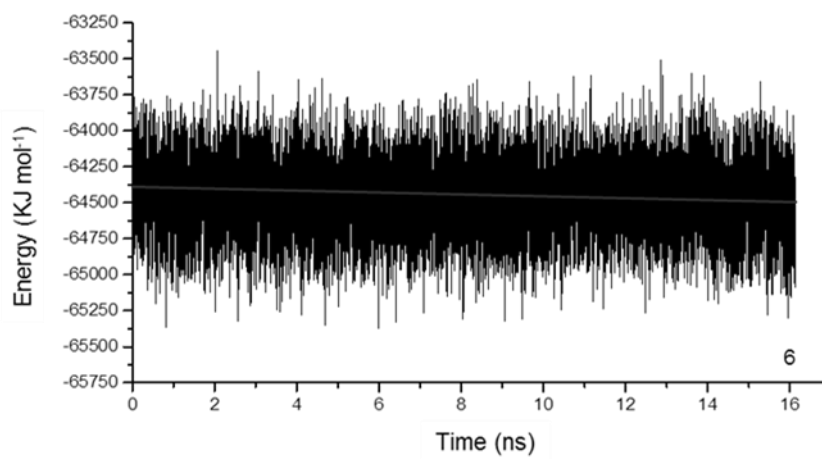


Figure 14S. Change in the total energy to the system 6/AaEcR.

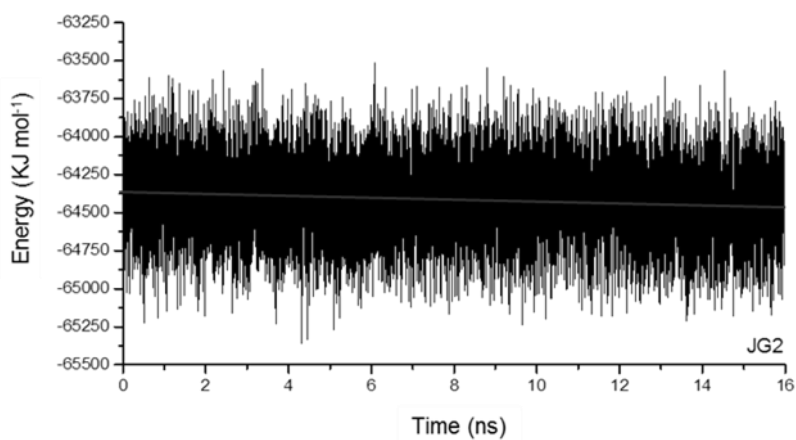


Figure 15S. Change in the total energy to the system JG2/AaEcR.

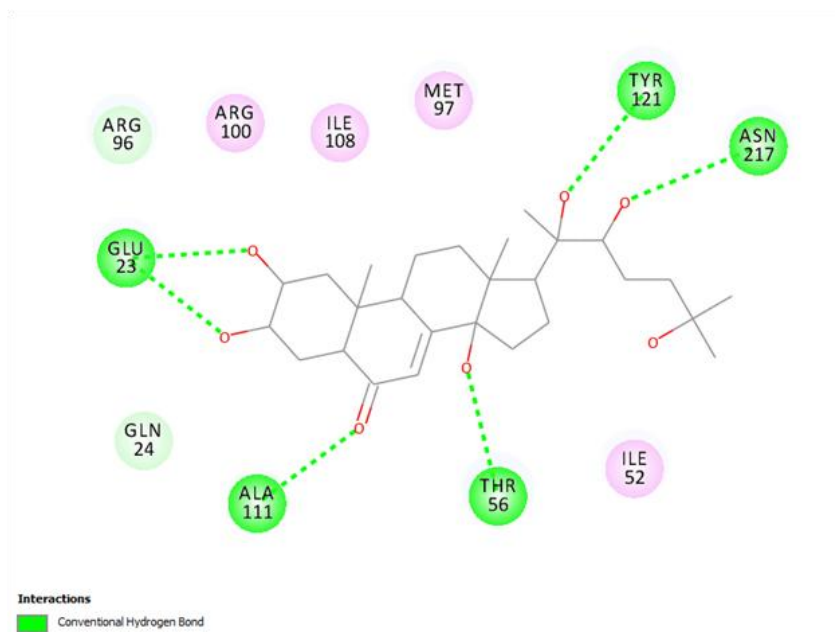


Figure 16S. Map pharmacophore after dynamics. Compound 20E.

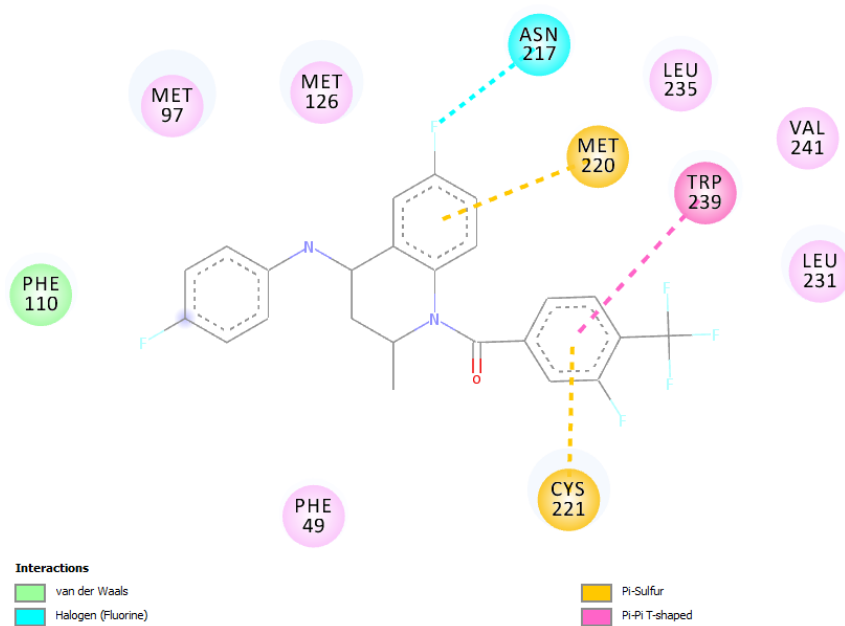


Figure 17S. Map pharmacophore after dynamics. Compound 1.

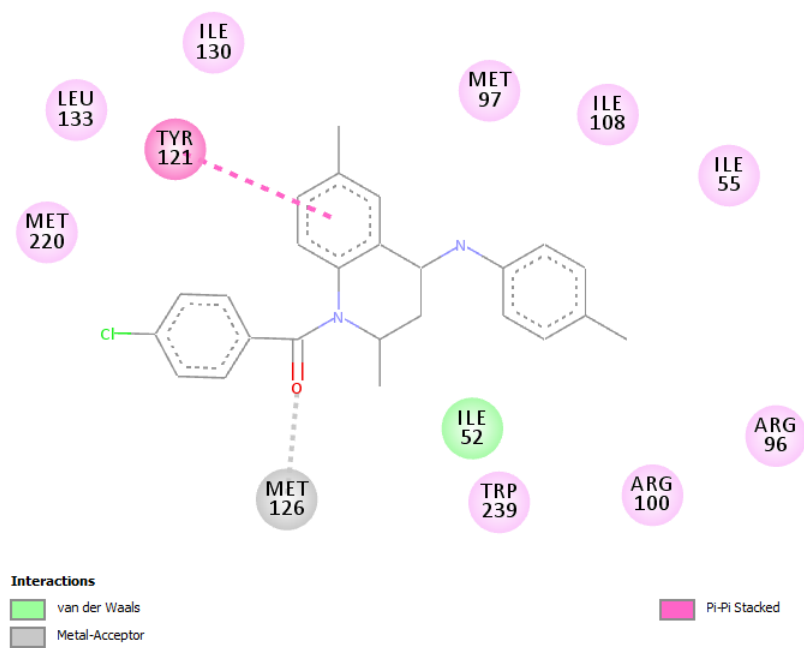


Figure 18S. Map pharmacophore after dynamics. Compound 2.

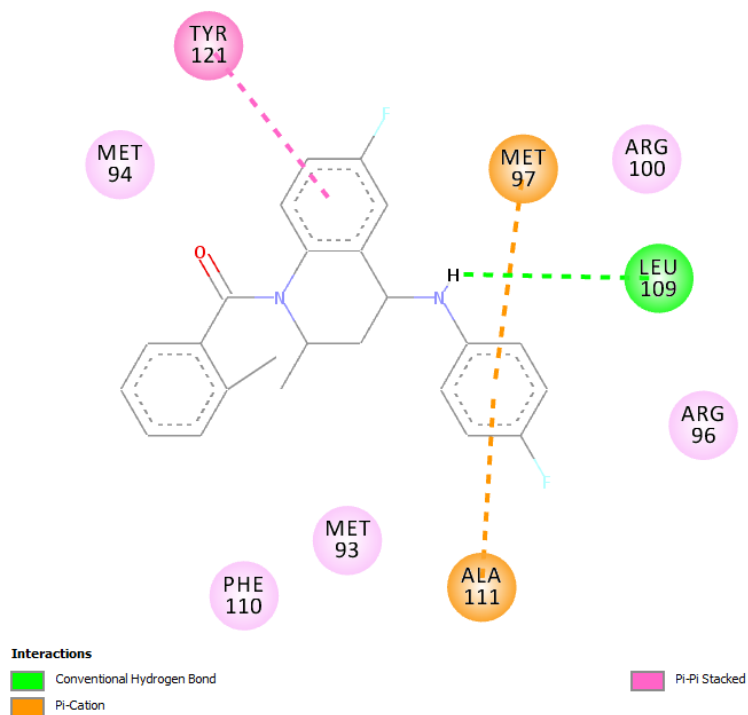


Figure 19S. Map pharmacophore after dynamics. Compound 3.

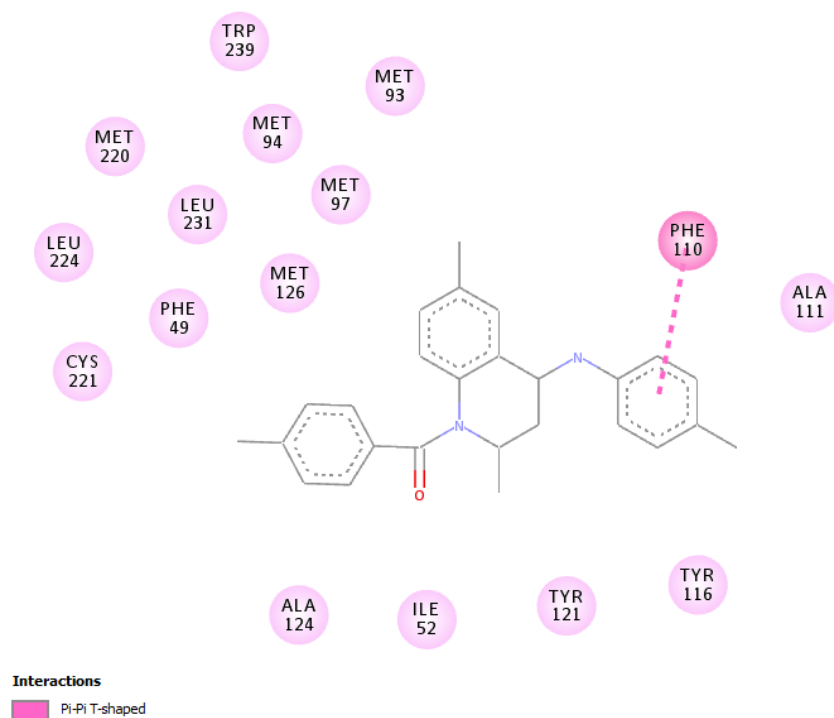


Figure 20S. Map pharmacophore after dynamics. Compound 4.

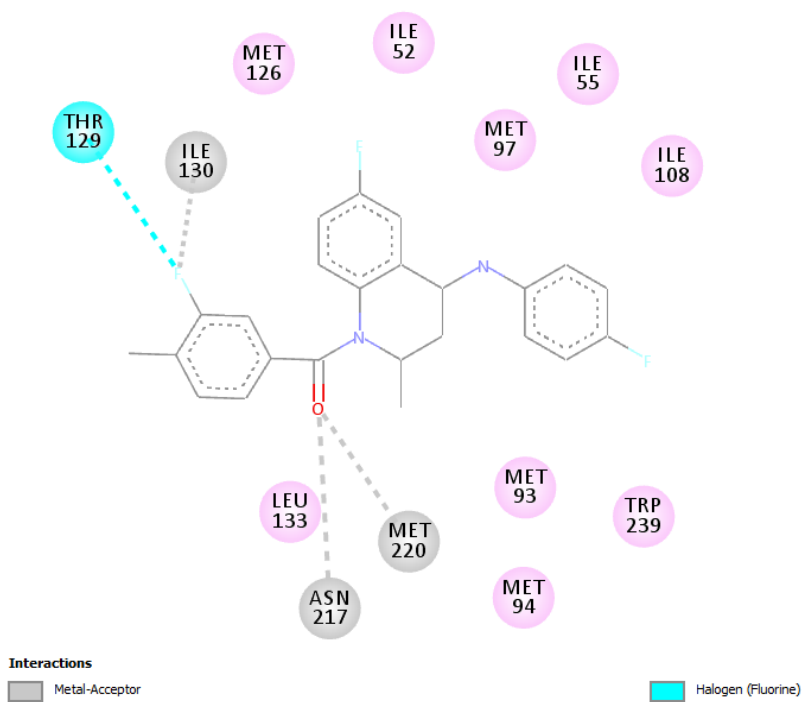


Figure 21S. Map pharmacophore after dynamics. Compound 5.



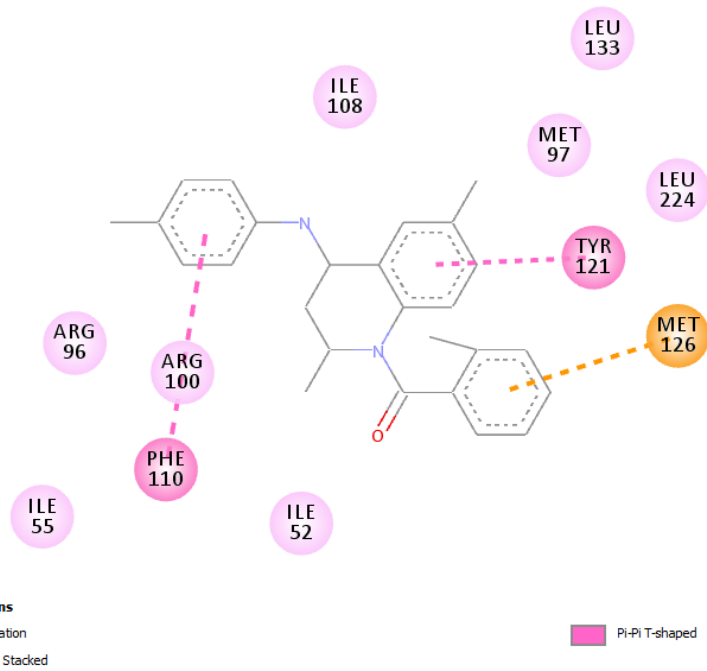


Figure 22S. Map pharmacophore after dynamics. Compound 6.

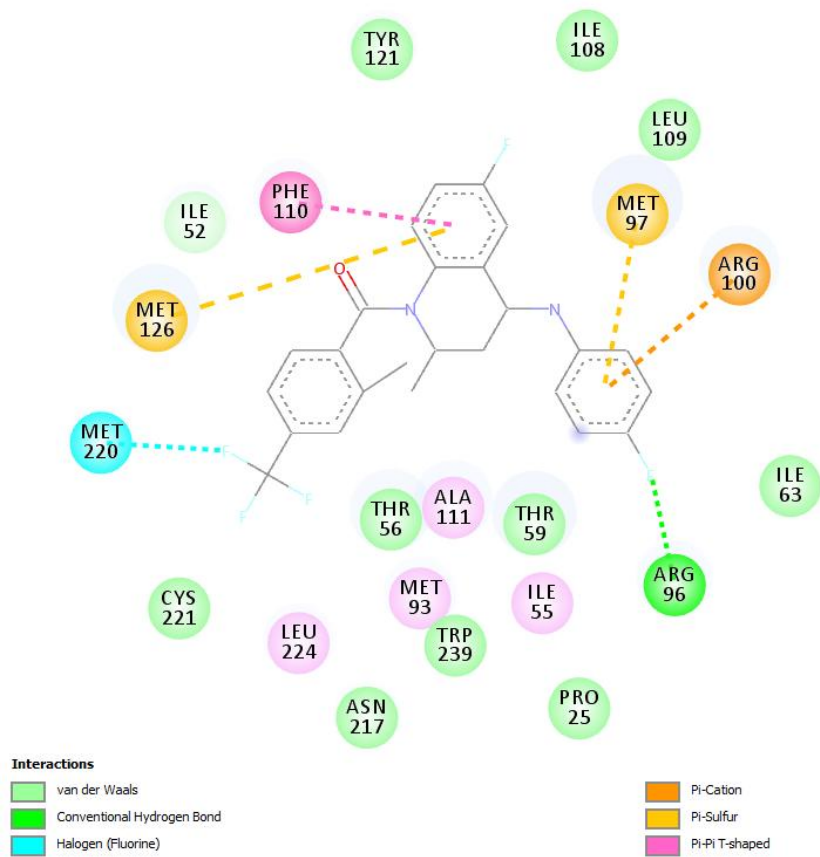


Figure 23S. Map pharmacophore after dynamic JG2.

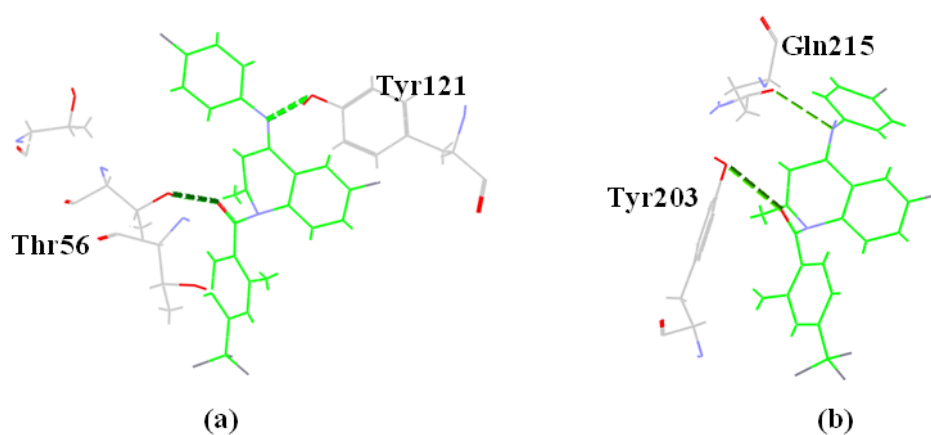


Figure 24S. Interaction between hydrogen and amino JG2 the ecdysone receptor (a) and BK channel (b).

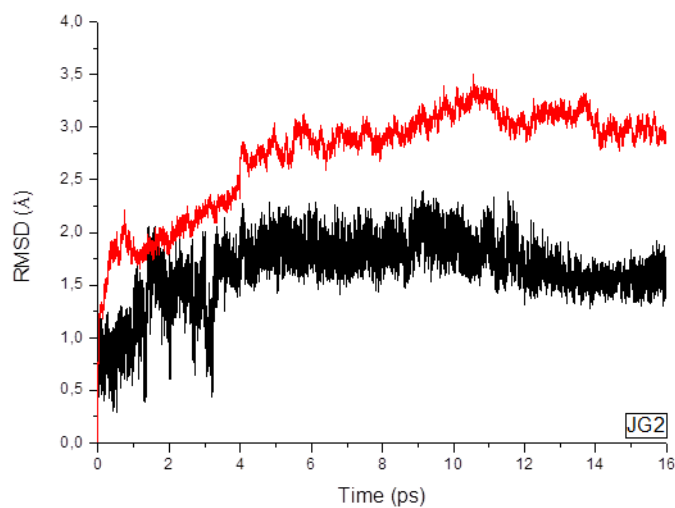


Figure 25S. DRMQ versus Time for the simulation of compound JG2/*AaEcR*. The receptor curve is represented in black and the compounds in red.

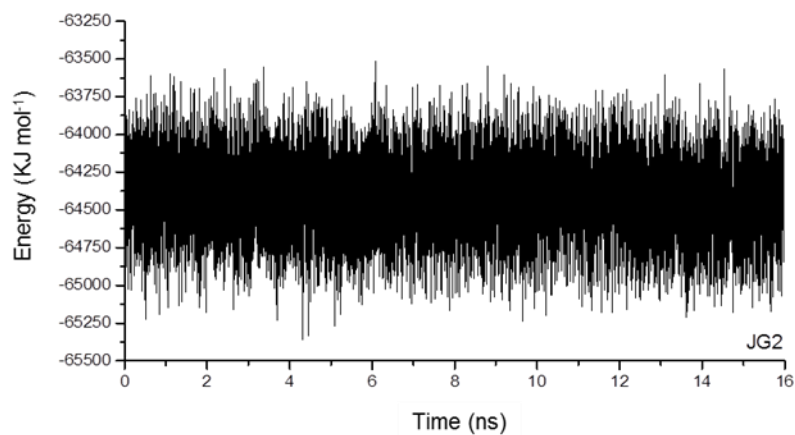


Figure 26S. Variation of total energy for the hormonal system JG2 / *AaEcR*.

## ARTIGO 2

Interaction between tetrahydroquinolines and *Aedes aegypti* and human acetylcholinesterases: Design of Potential insecticides

*Versão preliminar submetida ao periódico Combinatorial  
Chemistry & High Throughput Screening*

## **Interaction between tetrahydroquinolines and *Aedes aegypti* and human acetylcholinesterases: Design of Potential insecticides**

**Abstract:** Mosquitoes are associated with various public health problems. This includes the transmission of various diseases causing millions of deaths each year. The *Aedes aegypti* is responsible for transmitting four major diseases: yellow fever, dengue, chikungunya and zika. On the one hand, the importance of these synthetic insecticides for mosquito control is known, on the other, one must consider how they are harmful to the environment and to humans. Thus it is necessary to search for new compounds that are more effective and less toxic. Based on this, we are committed to study a very versatile class that make up the tetrahydroquinoline derivatives, which have shown activity in various studies, including anticholinesterase activity (most common action of insecticides). Therefore our objective was to study the interaction of some derivatives of the proposed tetrahydroquinolines in the literature and others proposed by our group with the enzyme acetylcholinesterase of the *Aedes aegypti* (AaAChE) and to study the selectivity of these compounds to human acetylcholinesterase (HssAChE). For this, anchoring and molecular dynamics studies were conducted thus seeking to collaborate with the discovery of more potent drugs to be used in combating the mosquito *A.aegypti*. Our results show that Compounds 1 and JG2 are promising to be studied more thoroughly and to be tested on AaAChE. The selectivity in the docking studies, although the molecular dynamics studies suggest good interaction of compounds with the active site of HssAChE, show that these compounds are most preferred (energy) by the *A.aegypti* mosquito enzyme.

**Keywords:** *Aedes aegypti*; Tetrahydroquinolines; Acetylcholinesterase; selectivity; Molecular dynamics.

### **1. INTRODUCTION**

Vector-borne diseases are still a major public health problem in tropical and subtropical regions of the world [1]. *Aedes aegypti* Linnaeus is the main vector of arboviruses that cause dengue, chikungunya, yellow fever and zika [2-4].

Currently, the contribution of synthetic insecticides to control mosquitoes is undeniable. On the other hand, they are harmful to the environment and also affect other organisms associated with it [1]. Moreover, several mosquito species have been developed

resistance to these insecticides [5,6]. Thus, it is important to search for new compounds that are more effective and less toxic.

A recent study by our research group has explored new molecular targets in the search for new insecticides against *A. aegypti* [2]. It should be kept in mind, however that the acetylcholinesterase (AChE) enzyme is the most widely explored insecticide target [7-10]. In fact, it is believed that almost all organophosphorus agents and commercial carbamates have their effects by reversible/irreversible inhibition of this enzyme [11, 12]. More recently, researchers in this area have focused on two primary goals, 1) to study selective inhibitors of the mammalian enzyme for effective treatment of Alzheimer's disease and 2) selective inhibitors of insect enzymes in order to avoid problems of toxicity to humans [11].

Inhibition of insect AChE, stands out as a promising method for insect control. Therefore, the discovery of new inhibitors and AChE inhibition mechanisms are important tasks [13,14]. The most common type of inhibition is that which occurs for organophosphates and carbamates, the affects the transmission of nerve impulses resulting in acetylcholine accumulation in insect neuromuscular tissue causing paralysis and then death [15-18].

A very versatile class of compounds, which had been extensively studied due to its high applicability, is a group of tetrahydroquinoline derivatives [19]. In addition to presenting insecticidal action acting on the ecdysone receptor [20, 21], they also act on neurotransmitter receptors and membranes [22-24]. They can also act at steroid hormone receptors [25, 26] and as antiviral, antibacterial, antimalarial, and antifungal agents [19; 27-29]. Furthermore, several tetrahydroquinoline derivatives have been found to interact with retroviral targets relevant to anti-HIV therapy (KIMURA et al., 1996; HAYASHI et al., 1996). In addition to the described functions there are several others (SRIDHARAN et al. 2011).

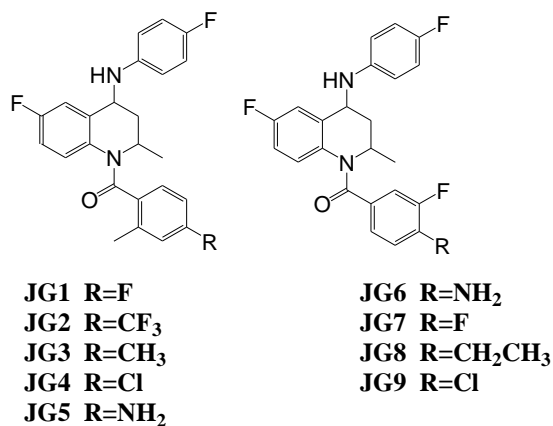
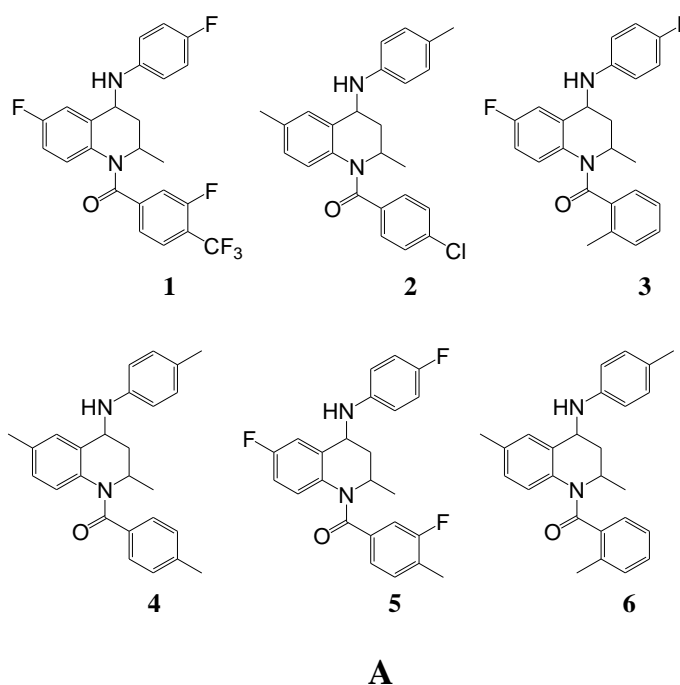
In addition, many tetrahydroquinoline derivatives have shown anticholinesterase activity, for exemple: Gatta et al. [30] reported the synthesis of THQ derivatives as potential inhibitors of AChE and Fink et al. [31] reported the synthesis and evaluation of 5-amino-5,6,7,8-tetrahydroquinolinones also as AChE inhibitors.

Thus, the goal of this work is to study the interaction of some derivatives of the proposed tetrahydroquinolines in literature and others proposed by our group, with the AChE enzyme *Aedes aegypti*, in addition to studying the selectivity of these compounds to the human enzyme (*HssAChE*). For this, molecular docking and molecular dynamics studies will be conducted seeking to contribute to the development of more potent drugs to be used in combating the *Aedes aegypti* mosquito.

## 2. MATERIALS AND METHOD

### 2.1 Compounds in study

Compounds 1 and 5 were synthesized by Palli et al [20] and Compounds 2, 3, 4 and 6 by Smith et al. [21], their chemical structures are depicted in Figure 1A. The compounds from JG1 to JG9 (Figure 1B) have been proposed in an earlier study by structural modification of Compounds 1 and 3 [2]. It is important to note that in the literature there are no biological data of these compounds acting on the enzymes under study. There are no results for this model.



**Figure 1.** (A) Structures of the tetrahydroquinoline studied. (B) Structures studied by Giacoppo et al. (2016).

By the homology modeling technique it was possible to build the three-dimensional structure of the enzyme acetylcholinesterase of *Aedes aegypti* (*AaAChE*). We first carried out a search for patterns in the Protein Data Bank (PDB) [32] using the BLAST server [32, 33] as a search tool. The template sequence selected to build *AaAChE* was 1ODC with a resolution of 2.2Å and factor  $R = 0.240$ . The choice of this enzyme as a template was based on the fact that it has the highest of sequence identity percentage, (48.6%), with *AaAChE*, than other AChEs available in the PDB.

After defining the template monomer sequence alignment of the target enzyme was conducted, with the following monomeric template enzyme previously in a FASTA format, using the Expasy website (<http://au.expasy.org/>). The validation of the generated templates was performed by the Ramachandran plot [34], in which it was possible to analyze the distribution of the torsion angles of the main chain  $\phi$  and  $\psi$  responsible for the stereochemical quality of protein.

The assembly of complex [AChE-linker (tacrine)], after the model construction, was performed using the overlap model for the crystal enzyme selected template, using Discovery Studio software [35]. Thus, we obtained Compound C-4-quinoly1-N-9-(1,2,3,4-tetrahydroacridine)-1,8-diaminooctane as active binder. However due to more literature information on the inhibition of acetylcholinesterase by tacrine, this compound became our binder reference for the docking procedure.

In this context, we also perform the overlapping of the enzymes in order to compare the amino acid residues present in the active site and determine the degree of identity. For this, RMSD calculation was performed by selecting all the atoms. In this case, the Discovery Studio software was again used [35].

### **2.2.2 Human Acetylcholinesterase**

The three dimensional structure of the human enzyme acetylcholinesterase was downloaded from the Protein Data Bank (PDB) with the code having 4BDT resolution 3.1Å and  $R$  factor = 0.219. This enzyme was complexed with the compound (7S, 11S) - huprine W, but for the same reason stated above this compound was replaced by the compound tacrine.

This enzyme was complexed with the compound (7S, 11S) -huprin W (PDB), however, because it was easy to obtain data from the tacrine literature it was replaced once again with

the active ligand. For substitution, the docking of tacrine on (7S, 11S) - huprin W was carried out, so that the pose that was most preferred to the crystallized binder was chosen.

### 2.3 Molecular Docking of the studied compounds

For the *Docking* procedure, the Molegro Virtual Docker program (MVD) [36] was used. The structures of the tetrahydroquinoline derivatives shown in Figure 1 were constructed and optimized using the program PC Spartan Pro [37]. In this same program the load correction was done using the semi-empirical PM3 method.

The binding sites were restricted within spheres of 5 Å radii for the study of both enzymes. For best results, the flexibility of the amino acid residues within 11 Å of the active ligand during the anchoring procedure for both targets was considered.

Because of the stochastic nature of the anchoring algorithm, there were around 15 races for each compound, with 30 poses each (conformation and orientation of the ligand) returned to the analysis of interactions (*AaAChE/HssAChE*-tacrine) and overlaps with the binding in each target.

The best conformation of each binder was selected according to its position in the active site, its interactions and the energy value. Selected conformations were used for the analysis of interactions with residues of the active site.

### 2.4 Molecular dynamics of the compounds

The molecular dynamic simulations (MD) were performed using the package GROMACS 5.1 [38]. Inhibitors were parameterized using Automated Topology Builder (ATB) and Repository Version 2.2 available on site (<https://atb.uq.edu.au/index.py>). Through this site, we have can parameterized the binders for the force field the force field AMBER99SB [39] in the .pdb files and .itp which were used in the simulations.

The complexes were assembled into a cubic box of 10.87 Å to *AaAChE* system and 13.30 Å for the system *HssAChE*. The ions of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> were added to neutralize both systems and the explicit solvation model TIP3P (Transferable Intermolecular Potentials) was used [40].

These systems were then minimized using the *Steepest Descent* method unconstrained position, to alleviate the highly unfavorable comparisons. The minimization was performed with 50000 steps in order to reduce unwanted contact between the atoms thereby minimizing the potential energy of the system [41]. The complexes were minimized,



and afterwards submitted to a MD simulation of 10000 ps at 300K applying 2fs as integration time. In total 1000 conformations were generated during simulation.

To analyze the structures generated after optimization and dynamics calculations, we used the program VMD [42]. The graphics of the total energy variation, the variation of the temporal and spatial RMSD and hydrogen bonds formed along the dynamics were generated with Origin Pro 8.0 program [43].

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Homology modeling

The alignment (Figure 2) of the monomeric primary of the *AaAChE* sequences and template enzyme was performed by the BLAST server [32,33] and revealed that the target enzyme presented 48.6% sequence identity with the template enzyme. These results are valid, since according to the literature, reliable models have identical values above 25% [44].

The choice of this enzyme as a template was based on the fact that it has the highest of sequence identity percentage, (48.6%), with *AaAChE*, than other AChEs available in the PDB.

```

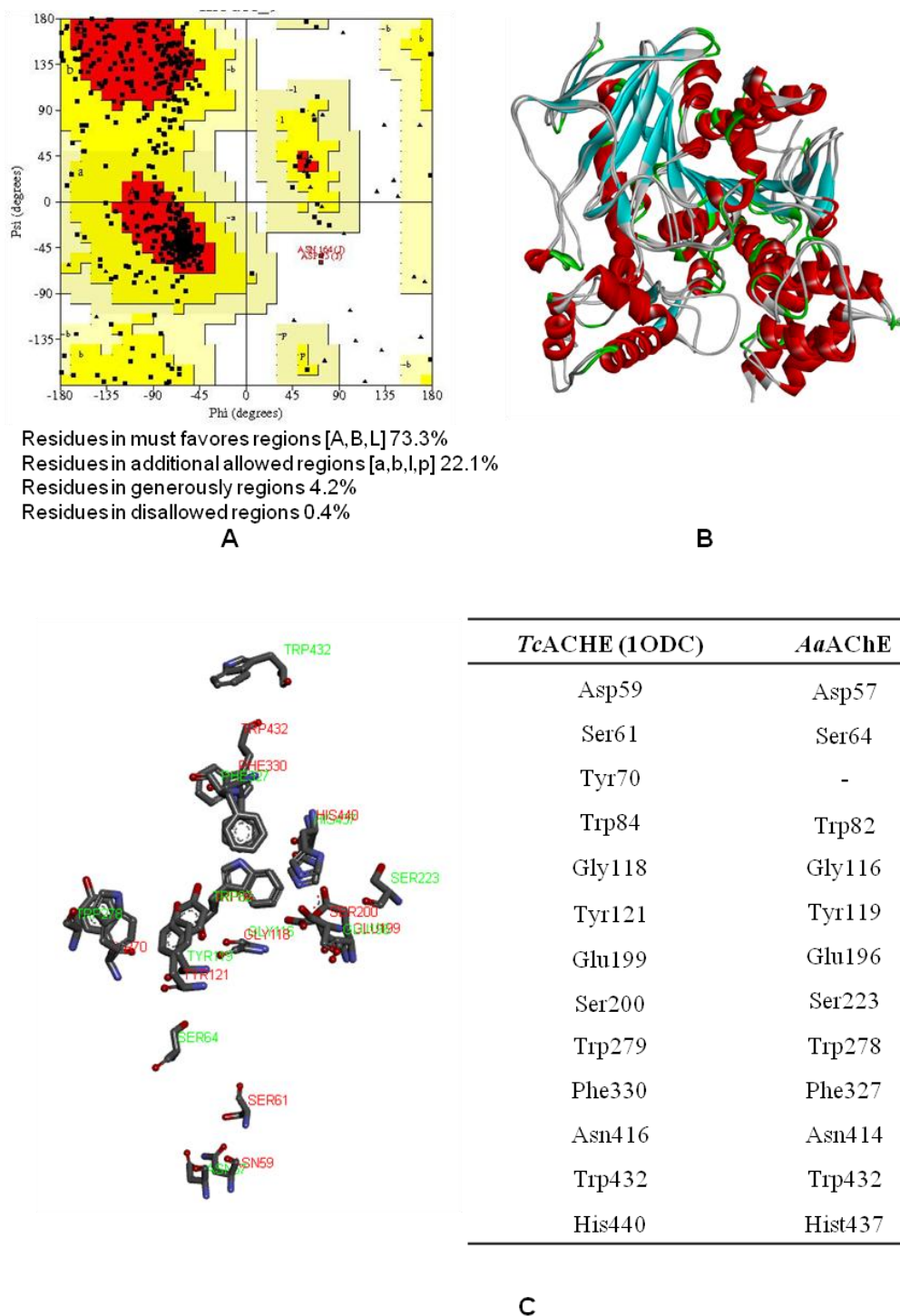
1ODC          SELLVNTKSGKVMGTRVPVLS--HISAF LGIPFAEPPVGNMRFRRPEPKKPWSGVWNAST
AaAChE        DPLLITTDKGVKVRGLTLEAPSGKKVDALWLGIPYAQPPLGPLRFRHPRPVEKWTGVLNATT
                ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1ODC          YPNNCQQYVDEQFPFGFSGSEMWNPNREMSDCLYLNIWVPSRPKSTTVMVWIYGGGFYS
AaAChE        PPNSCVQIVDTVFGDFPGATMWNPNTPLESDCLYINVVVPHPRPKNSAVMLWI FGGGFYS
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1ODC          GSSTLDVYNGKYLAYTEEVVLVLSYRVGAFGFALHGSQEAPGNVGLLDQRMALQWVHD
AaAChE        GTATLDVYDHRTLASEENVI VVSLQYRVASLGFLFL-GTPEAPGNAGLFDQNLALRWVRD
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1ODC          NIQFFGGDPKTVTIFGESAGGASVGMHILSPGSRDLFRRAILQSGSPNCPWASVSVAEGR
AaAChE        NIHKFFGGDPSRVTLFGEXXXXXXXXXXXXXXXXXXRDLFQRAILQSGSPTAPWALVXXXXX
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1ODC          RRAVELGRNLNCLNLSDE--ELIHCLREKKPQELIDVEWNVLPFDSIFRFSFVVIDGEF
AaAChE        XXXXXXXXXXXXCPHDATKLTDTVECLRTKDPNVLDNEWGTLGI---CEFPFVVPVDGAF
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1ODC          FPTSLESMLNSGNFKKTQILLGVNKDEGSFFLLYGAPG-FSKDSESKISREDFMSGVKLS
AaAChE        LDETPQRS LASGRFKKTDILTGSNTEEGYFIIYYLTELRLRKEEGVTVSREEFLQAVREL
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1ODC          VPHANDLGLDAVTLQYTDWMDNNGIKNRDGLDDIVGDHNVICPLMHFVNKYTKFGNGTY
AaAChE        NPYVNGAARQAI VFEYTDWTEPENPNNSNRDALDKMVG DYHFTCNVNEFAQRYAEEGNNVY
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1ODC          LYFFNHRASNLVWPEWMGVIHGYEIEFVFGFLPVKELNYTAEAEALSRRIMHYWATFAKT
AaAChE        MYLYTHRSKGNPWRWTGVMHGDEIN YVFGEP LNSDLGYMEDEKDFSRKIMRYWSNFAKT
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1ODC          GNPNEPXXXXS--KWPLFTTKEQK FIDLNTEPMKVHQRLRVQMCVFWNQFLPKLLNATA
AaAChE        GXXXXXXXXXDFPEWPKHTAHRHYLELGLNLT YVGRGPRLRQCAFWKYLPQLVAATS
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**Figure 2.** Simple alignment between *AaAChE* and 1ODC.

On the validation of the model *AaAChE*, the Ramachandran plot generated showed 99.6% of the enzyme's amino acid residues modeled in favorable regions (Figure 3A) which is suitable for models generated by homology. Regarding the properties of the main chain modeled enzyme, bad contacts, alpha carbon distortions or problems involving hydrogen bonds energies were not found. In addition, there were no side chain torsion angle distortions. The results of all other tests on the link for validation of available structures in the PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>) were consistent with the expected values for a good homology model.

In Figure 3B, it is possible to observe the superposition of the enzymes and Figure 3C presents the comparison among the amino acids that comprise the active sites of both enzymes.



**Figure 3.** (A) Ramachandran chart of *AaAChE*. The most favorable regions are shown in red, allowed in yellow, the generously allowed in light yellow and not allowed in white. (B) Overlay of target enzymes (*AaAChE*) and mold (*10DC*).

From Figure 3C, it can be seen that from a total of 13 amino acids of the active site *TcAChE*, 12 are identical to the active site of *AaAChE*, i.e. approximately 92% of the active sites are retained. As there is great similarity between residues, the generated *AaAChE* model can be used for the study of new inhibitors.

### 3.3 Molecular docking in the *AaAChE* and *HssAChE*

For validation, redocking calculations were performed of the ligand tacrine on both systems, *AaAChE* and *HssAChE* (Figure 4). The RMSD was found to be 0.23Å and 0.62Å, respectively. The literature reports that values under 2.00Å are acceptable [7, 45, 46], these results validate the docking protocol used for the calculations.

*HssAChE* enzymes were evaluated and the intermolecular interaction energies, hydrogen interaction, electrostatic or debris carried interactions are reported in Tables 1, 2 and 1S.

**Table 1.** Values of energy: the intermolecular interaction ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ), hydrogen bonding, electrostatic, and long-range electrostatic ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ).

	<i>AaAChE</i>				<i>HssAChE</i>			
	$\Delta E.I^*$	Total H-bond energy	$\Delta E_{\text{Elet}}^{**}$	$\Delta E_{\text{EletLong}}^{***}$	$\Delta E.I^*$	Total H-bond energy	$\Delta E_{\text{Elet}}^{**}$	$\Delta E_{\text{EletLong}}^{***}$
<b>Tacrina</b>	-103.68	0.00	-0.07	0.28	-99.88	0.00	0.00	0.00
<b>1</b>	-178.45	-2.02	-1.52	1.79	-23.85	0.00	0.00	0.00
<b>2</b>	-164.74	-0.24	-0.89	0.71	-25.50	-2.5	0.00	0.00
<b>3</b>	-152.64	-2.47	0.00	0.00	-27.21	0.00	0.00	0.00
<b>4</b>	-163.95	-1.37	0.00	0.00	-66.90	-0.40	0.00	0.00
<b>5</b>	-167.59	-2.99	-0.85	0.76	-28.62	0.00	0.00	0.00
<b>6</b>	-150.53	-3.40	0.00	0.00	-38.39	-1.91	0.00	0.00
<b>JG1</b>	-128.99	-0.31	0.82	-0.53	-43.69	0.00	0.00	0.00
<b>JG2</b>	-178.71	0.00	0.27	-0.50	-22.34	-2.44	0.00	0.00
<b>JG3</b>	-141.36	-0.13	-2.05	2.44	-3.74	-0.83	0.00	0.00
<b>JG4</b>	-138.62	-0.24	-0.81	0.92	-65.62	-2.26	0.00	0.00
<b>JG5</b>	-133.04	-2.86	-0.75	1.06	-4.81	-4.38	0.00	0.00
<b>JG6</b>	-154.47	-4.05	0.33	0.26	-56.70	-0.41	0.00	0.00
<b>JG7</b>	-149.16	-2.89	0.66	-0.29	-72.12	-2.92	0.00	0.00
<b>JG8</b>	-154.70	-1.83	-0.60	-1.14	-86.04	0.00	0.00	0.00
<b>JG9</b>	-142.07	0.00	-0.18	0.99	-58.15	0.00	0.00	0.00

\* Energy intermolecular interaction ( $\text{Kcal mol}^{-1}$ )

\*\*Electrostatic Energy  $r < 4.5\text{\AA}$  between the protein and the ligand (EElect)

\*\*\* Electrostatic Energy  $r > 4.5\text{\AA}$  between the protein and the ligand (EElectLong)

**Tabela 2.** Hydrogen binding energy values as well as bond length values (Å) and main amino acid residues responsible for the interaction between compounds and the targets.

<i>AaAChE</i>				<i>HssAChE</i>			
Compound	Residue	Connection Length (Å)	Bond strength (kcal mol <sup>-1</sup> )	Compound	Residue	Connection Length (Å)	Bond strength (kcal mol <sup>-1</sup> )
<b>Tacrina</b>	-	-	-	<b>Tacrina</b>	-	-	-
<b>1</b>	Tyr119	2.70	-2.02	<b>1</b>	-	-	-
<b>2</b>	Hist437	3.48	-0.24	<b>2</b>	Ser125	3.01	-2.5
<b>3</b>	Tyr119	2.91	-2.47	<b>3</b>	-	-	-
<b>4</b>	Tyr119	3.20	-1.37	<b>4</b>	Tyr124	3.46	-0.40
<b>5</b>	Tyr119	2.89	-1.65	<b>5</b>	-	-	-
	Hist437	3.35	-1.34	<b>6</b>	Tyr341	3.22	-1.91
<b>6</b>	Tyr119	3.19	-1.62	<b>JG1</b>	-	-	-
	Hist437	3.08	-1.78	<b>JG2</b>	Tyr124	3.11	-2.44
<b>JG1</b>	Hist437	3.47	-0.31	<b>JG3</b>	Tyr124	3.43	-0.83
<b>JG2</b>	-	-	-	<b>JG4</b>	Tyr124	2.82	-2.26
<b>JG3</b>	His437	3.54	-0.13	<b>JG5</b>	Tyr124	3.22	-1.91
<b>JG4</b>	Hist437	3.50	-0.24		Ser203	2.80	-2.50
<b>JG5</b>	Tyr325	2.93	-2.50	<b>JG6</b>	Ser125	3.52	-0.41
	Hist437	3.44	-0.36	<b>JG7</b>	Gly82	3.51	-0.42
<b>JG6</b>	Tyr119	2.61	-1.06		Ser125	2.84	-2.50
	Tyr325	2.60	-2.50	<b>JG8</b>	-	-	-
	Tyr326	3.24	-0.49	<b>JG9</b>	-	-	-
<b>JG7</b>	Trp82	3.01	-0.77				
	Tyr119	2.71	-1.13				
<b>JG8</b>	Tyr119	2.74	-1.83				
<b>JG9</b>	-	-	-				

Our model compound, tacrine, showed no hydrogen interaction with *AaAChE*, but presented the electrostatic interactions with various residues, including the Trp82 and His437 (Table 1S). Doucet-Personemi et al. [47] in study with *TcAChE* visualized hydrogen interactions with the same amino acids, which shows us that although Tacrine is not of the same class of compounds studied (tetrahydroquinolines derivatives) and is used for different studies (Alzheimer's Disease), its structure is similar that of to these compounds and we can use there as a model in order to position our inhibitors and make sure that they are interacting with the amino acids present in the active site.

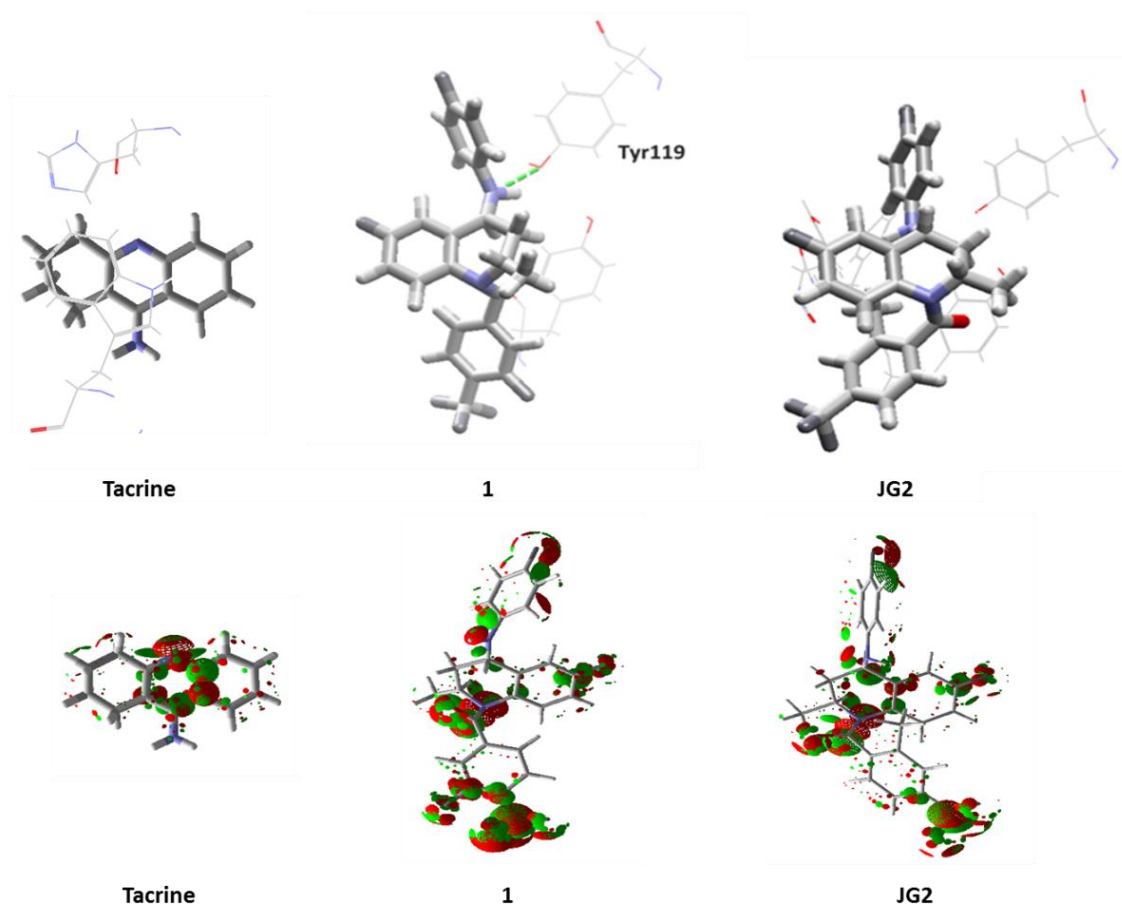
In the study of *Aedes aegypti* acetylcholinesterase, Table 1 shows that all compounds showed greater interaction with this enzyme than the compound tacrine, especially the Compounds 1 and 5 and JG2, JG6 and JG8 (compounds studied by Giacoppo et al., [2]),

which had the lowest intermolecular interaction energy values. From Table 2 it can be inferred that all compounds had interactions with at least one amino acid except Tacrine, JG2 and JG9 compounds that did not perform any interaction. Amino acids which interacted with the compounds are Trp82, Tyr119, Tyr325, Tyr326 or His437. Note that in this case at least one type of interaction was observed, either hydrogen, either electrostatic and in some cases, both. These interactions are certainly contributing to the permanence of these compounds in the active site of the enzyme in question. Regarding the electrostatic interactions, Table 1S demonstrates there are various interactions of this type with most compounds.

In *HssAChE*, in general, the interaction energy values were all higher compared to those found in the study of *Aedes* with the enzyme, which indicates that these compounds exhibit greater selectivity to the mosquito enzyme (see Table 1). Regarding the hydrogen interactions with amino acid residues, Table 2 shows that seven of the studied compounds (Tacrine, 1, 3, 5, JG1, JG8 and JG9) never conducted a hydrogen interaction with the amino acids and even showed electrostatic interactions with *HssAChE*. From our results, other compounds have performed at least one hydrogen interaction (with amino acids Gly82, Tyr124, Ser125, Ser203 or Tyr341) and none electrostatic interaction. These data can explain the greater selectivity of the compounds studied in the mosquito enzyme than the human, which is excellent in terms of selectivity and reinforces the importance of this research.

Based on previous findings, in terms of stability and selectivity, the most promising chemical structures, compounds 1 and JG2, as well as the reference compound were selected for molecular dynamics simulations. Figures 4 and 1S represent the three compounds and their hydrogen and electrostatic interactions in *AaAChE* and hydrogen interactions in *HssAChE*, respectively.

It is important to notice that although during the docking study with *HssACHE* no electrostatic interaction was observed, by Figure 1S presents a possible  $\pi$ - $\pi$  stacking interaction with Tyr337 represented in the three compounds. It is expected that the molecular dynamics studies gather more information about this and other possible interactions.



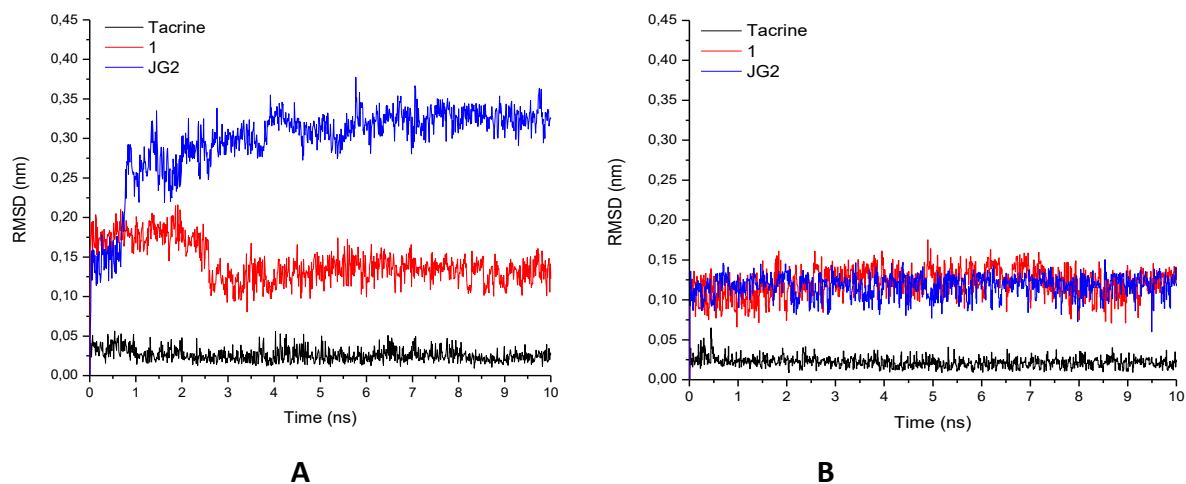
**Figure 4.** Compounds Tacrine, 1 and JG2 and its hydrogen and electrostatic interactions with *AaAChE*. Red (positive) and green (negative).

It is important to keep in mind that the Compounds 1 and JG2 also excelled in the previous study of the ecdysone receptor and BK channel, both of *Aedes aegypti* (Giacoppo et al.[2]), which reinforces the idea that these are promising compounds to advance the research derived from tetrahydroquinoline insecticides.

### 3.5 Molecular dynamics simulations on targets

After *docking* studies, the inhibitors Tacrine, 1, and JG2 were subjected to MD simulations in order to observe their dynamic behavior inside *AaAChE* and *HssAChE* and compare to the *docking* results, obtaining additional information to support the proposition of new potential inhibitors of AChE.

The temporal RMSD calculations were performed on all the atoms of each complex studied to 1000 frames during the 10 ns of simulation. Figure 5A shows the results of the temporal RMSD for systems Tacrine/1/ JG2-*AaAChE* and Figure 5B for the systems Tacrine/1/JG2-*HssAChE*.

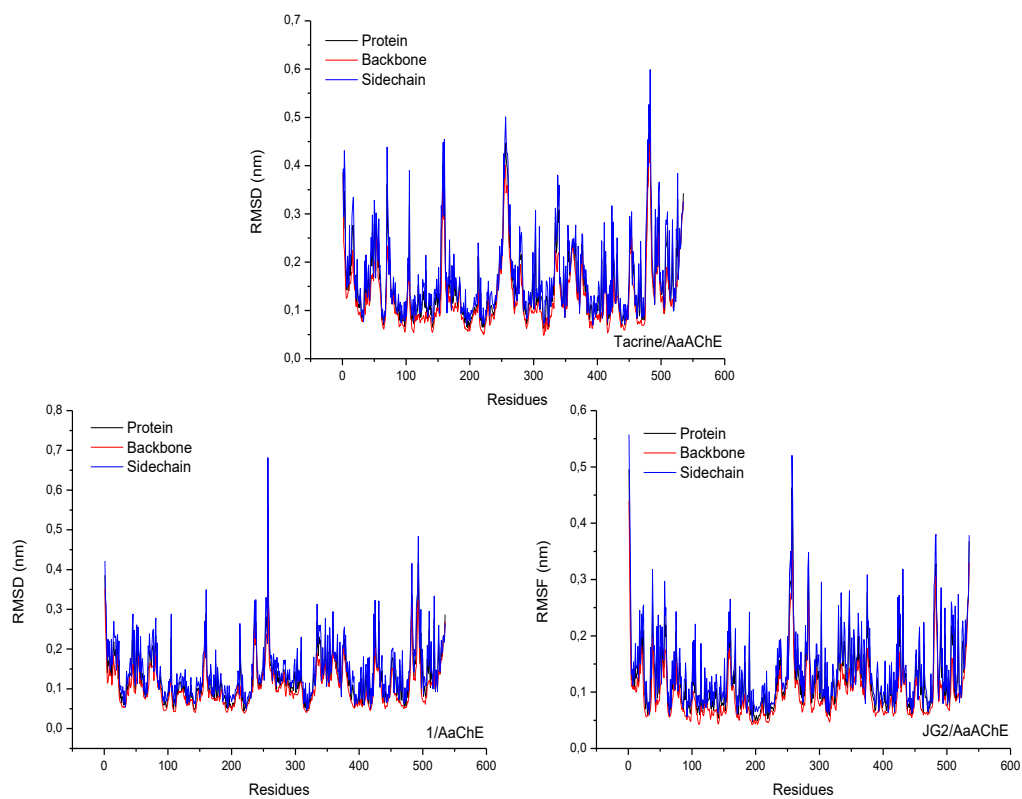


**Figure 5.** Temporal RMSD of compounds in *AaAChE* (A) and in *HssAChE* (B).

From Figures 5A and 5B, it can be seen that Tacrine was the compound that remained the most stable (less RMSD variation) during the simulation, about 0.03nm in both systems. Compound 1, although in *AaAChE* stabilized only around 4ns, presented RMSD values very similar in both systems. Compound JG2 had higher values in *AaAChE*, however these values keep around 0.3nm, which is acceptable [48].

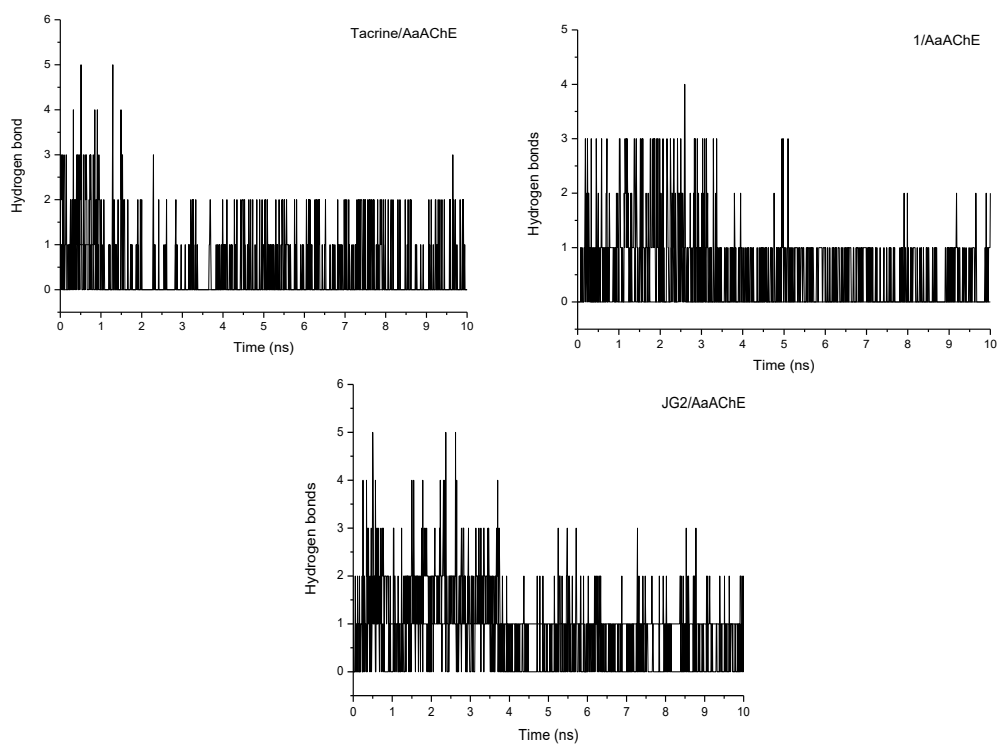
In order to confirm the structural stabilization in the simulation environment the spatial RMSD was calculated from the average position of each amino acid residue of *AaAChE* (Figure 6) and *HssAChE* (Figures 2S to 4S). Higher RMSD values indicate the residues that have undergone major changes and corresponding regions of loops. In the residues of the active site region of the alpha helices and beta sheets, there is a lower RMSD value, thereby revealing the increased stability of these areas.





**Figure 6.** Variation of spatial RMSD to systems: Tacrine, 1 and JG2 /AaChE.

Figure 7 shows the average number of hydrogen bonds formed along the simulation.



**Figure 7.** Number of H-bonds. Interactions between compound Tacrine, 1, JG2 and AaChE during the MD simulation.

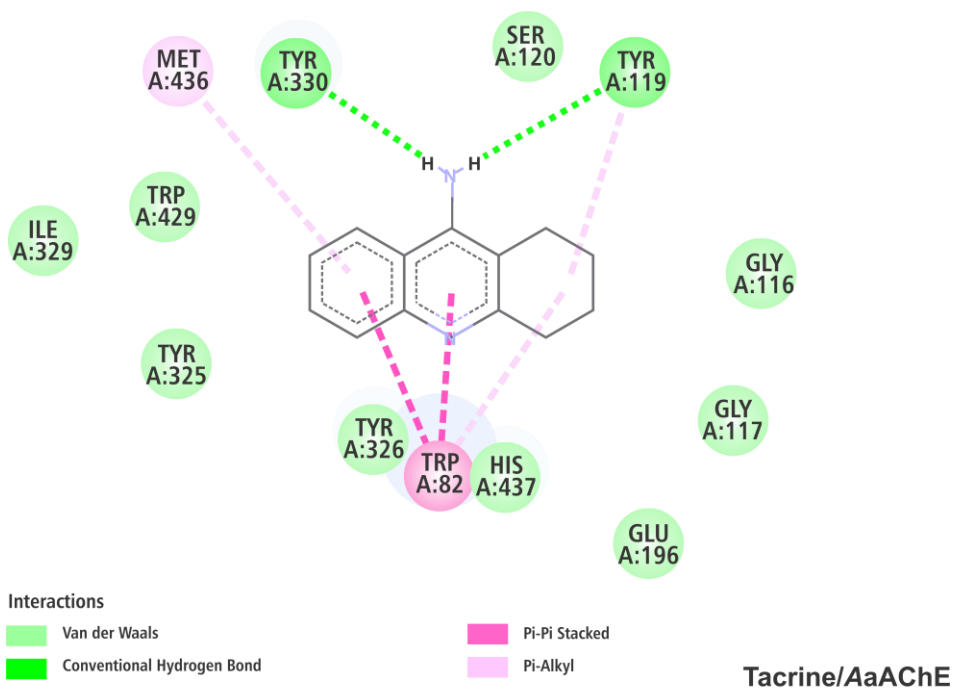
In the case of hydrogen interactions in the *docking* in AaAChE, for Tacrine and JG2 compounds, no interaction were observed with amino acid residues present at the active site and Compound 1 only one interaction. From the MD calculations, the formation of up to four amino acids of interactions with Compound 1 (Figure 7) were observed, but there was permanence in simulated time of only one interaction, which is consistent with the docking results. The pharmacophore map (Figure 8B), which presents the average interactions in simulated time, presents interactions with Tyr119 and Tyr326 amino acids.

For Compounds JG2 and Tacrine, two hydrogen bonding interaction keep stable along the simulation (Figure 7). Tacrine presented interactions with Tyr119 and Tyr330 (Figure 8A), while JG2 presented with Tyr119 and Tyr326 (Figure 8C).

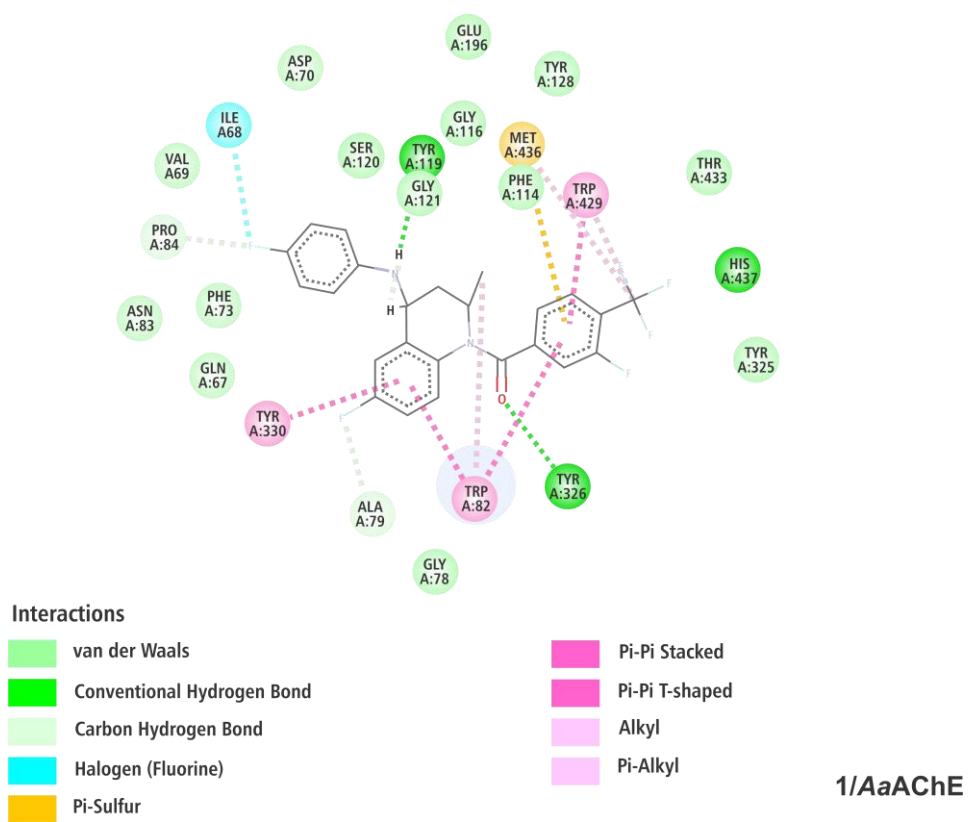
Based on the map, it is possible to see other types of interactions that were formed during the simulation. Overall interactions with Fluorine, the  $\pi$ -sulfur,  $\pi$ - $\pi$  stacking, among others were observed.

In *HssAChE* during the docking procedure, only one interaction with the Tyr124 for the JG2 compound was observed. The compounds Tacrine and 1 did not perform any hydrogen interactions with the amino acids present in the active site of this enzyme. During the MD simulation, interactions were observed for Tacrine (Figure 5S). In pharmacophore map (Figure 8S), interactions with residues Asp74, Thr83 and Tyr341 are represented. For Compound 1 4 interactions were formed, but just two interactions with Tyr337 (Figure 6S and 9S) keep stable along the simulation where the map can observe two interactions with. As for the JG2 compound, Figure 7S presents up to three intetactions, only one continuing during simulation, which is shown on the map (Figure 10S).

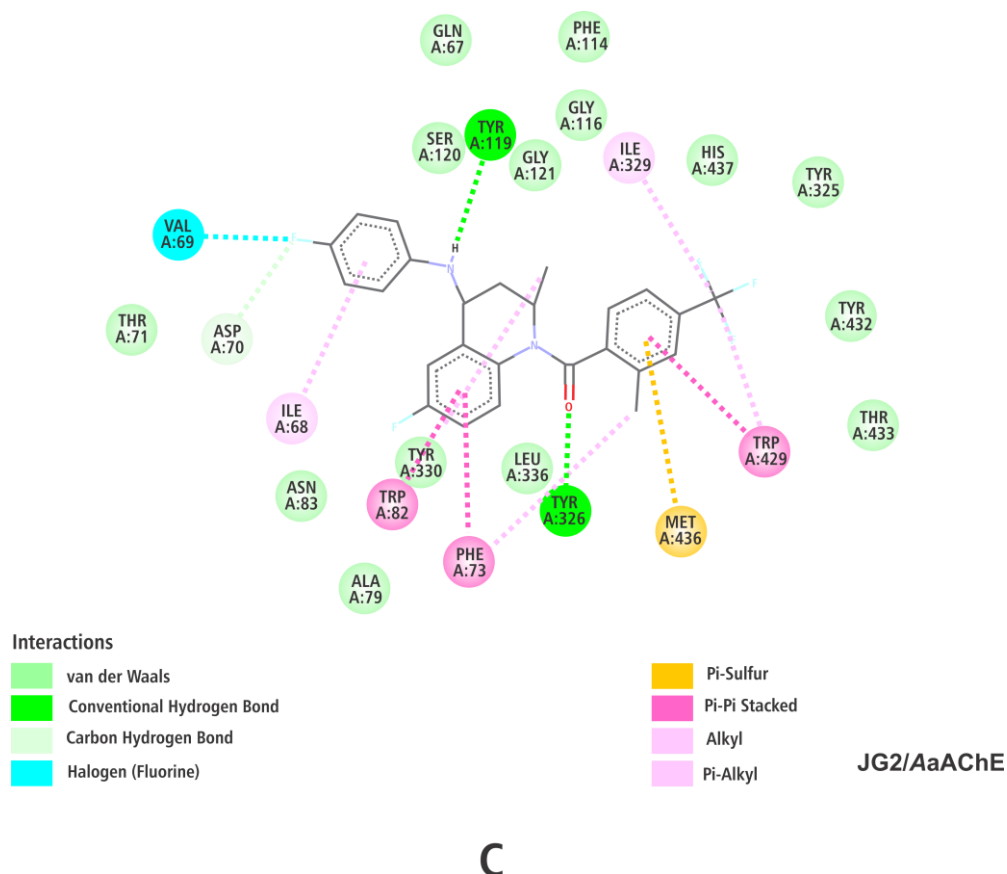
From the docking procedure, no electrostatic interaction type was detected, but from the maps, we can see that there were interactions that are important contributors to retention of binding in the active site, such as interactions with Fluorine and  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions.



A



B



**Figure 8.** Map pharmacophore of compounds Tacrine (A), 1 (B) and JG2 (C).

## CONCLUSIONS

The tertiary structure of *Aedes aegypti* acetylcholinesterase was obtained by homology modeling technique. From this 3D structure, docking simulations with all 15 studied compounds revealed that compounds 1 and JG2 are promising structures in terms of stability for AaAChE as well as selectivity in HssAChE. In addition, based on the docking results, the great influence of electrostatic interactions on this stability became noticeable.

Turning now to dynamics, we can infer that the compound JG2 had greater variation of RMSD compared to other compounds in AaAChE and presented a lower total energy value compared to other studied compounds in HssAChE. From the docking study, Compound 1 showed good results and selectivity, on the other hand, in MD simulations this compound revealed similar results in both target enzymes.

Note that 1 and JG2 were previously investigated by our group, indicating both promising larvicide and adulticide action. Furthermore, those compounds have good selective between insect and human enzyme.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors wish to thank the Brazilian financial agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Federal University of Lavras (UFLA) for providing the physical infrastructure and working space.

## REFERENCES

- [1] Reegan, A. D.; Stalin, A.; Paulraj, M. G.; Balakrishna, K.; Ignacimuthu, S.; Al-Dhabi, N. A. In Silico Molecular Docking of Niloticin with Acetylcholinesterase 1 (AChE1) of *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*): A Promising Molecular Target. *Med. Chem. Res.*, **2016**, 25 (7), 1411–1419.
- [2] Giacoppo, J. O. S.; Carregal, J. B.; Junior, M. C.; Cunha, E. F. F. da; Ramalho, T. C. Towards the Understanding of Tetrahydroquinolines Action in *Aedes aegypti*: Larvicide or Adulticide? *Mol. Simul.*, **2017**, 43 (2), 121–133.
- [3] Bosire, C. M.; Deyou, T.; Kabaru, J. M.; Kimata, D. M.; Yenesew, A. Larvicidal Activities of the Stem Bark Extract and Rotenoids of *Millettia Usaramensis* Subspecies *Usaramensis* on *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*). *J. Asia. Pac. Entomol.*, **2014**, 17 (3), 531–535.
- [4] Simoy, M. I.; Simoy, M. V.; Canziani, G. A. The Effect of Temperature on the Population Dynamics of *Aedes aegypti*. *Ecol. Modell.*, **2015**, 314, 100–110.
- [5] Costantini, C.; Badolo, A.; Ilboudo-Sanogo, E. Field Evaluation of the Efficacy and Persistence of Insect Repellents DEET, IR3535, and KBR 3023 against *Anopheles Gambiae* Complex and Other Afrotropical Vector Mosquitoes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **2004**, 98 (11), 644–652.
- [6] Garcia, L.S Malaria. A review. *Clin. Lab. Med.*, **2010**, 30 (1), 93–129
- [7] Giacoppo, J. O. S.; Mancini, D. T.; Guimarães, A. P.; Gonçalves, A. S.; Da Cunha, E. F. F.; França, T. C. C.; Ramalho, T. C. Molecular Modeling toward Selective Inhibitors of Dihydrofolate Reductase from the Biological Warfare Agent *Bacillus Anthracis*. *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, 91, 63–71.
- [8] de Almeida, J. S.; Cuya Guizado, T. R.; Guimarães, A. P.; Ramalho, T. C.; Gonçalves, A. S.; de Koning, M. C.; França, T. C. C. Docking and Molecular Dynamics Studies of Peripheral Site Ligand–oximes as Reactivators of Sarin-Inhibited Human Acetylcholinesterase. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2016**, 34 (12), 2632–2642.
- [9] Lima, W. E. A. de; Pereira, A. F.; Castro, A. A.; da Cunha, E. F. F. C.; Ramalho, T.C. Flexibility in the Molecular Design of Acetylcholinesterase Reactivators: Probing

Representative Conformations by Chemometric Techniques and Docking/QM Calculations. *Lett. Drug Des. Discov.*, **2016**, *13* (5) 360–371.

- [10] da Cunha, E.F. F.; Resende, J.E., França, T. C. C.; Gonçalves, M. A.; de Souza, F.R.; Garcia, L.S.; Ramalho, T.C. Molecular Modeling Studies of Piperidine Derivatives as New Acetylcholinesterase Inhibitors against Neurodegenerative Diseases. *J. Chem.*, **2013**, 1-7.
- [11] Doucet-Personeni, C.; Bentley, P. D.; Fletcher, R. J.; Kinkaid, A.; Kryger, G.; Pirard, B.; Taylor, A.; Taylor, R.; Taylor, J.; Viner, R.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Greenblatt, H. M.; Lewis, T. A Structure-Based Design Approach to the Development of Novel, Reversible AChE Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44* (20), 3203–3215.
- [12] Aldridge, W. N. Some Properties of Specific Cholinesterase with Particular Reference to the Mechanism of Inhibition by Diethyl P-Nitrophenyl Thiophosphate (E 605) and Analogues. *Biochem. J.*, **1950**, *46* (4), 451–460.
- [13] Casanova, H.; Ortiz, C.; Peláez, C.; Vallejo, A.; Moreno, M. E.; Acevedo, M. Insecticide Formulations Based on Nicotine Oleate Stabilized by Sodium Caseinate. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50* (22), 6389–6394.
- [14] Liu, Y.-Q.; Zhao, Y.-L.; Yang, L.; Zhou, X.-W.; Feng, G. Design, Semisynthesis and Insecticidal Activity of Novel Podophyllotoxin Derivatives against *Brontispa Longissima* in Vivo. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **2012**, *102* (1), 11–18.
- [15] Carreño Otero, A. L.; Vargas Méndez, L. Y.; Duque L., J. E.; Kouznetsov, V. V. Design, Synthesis, Acetylcholinesterase Inhibition and Larvicidal Activity of Girgensohnine Analogs on *Aedes aegypti*, Vector of Dengue Fever. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *78*, 392–400.
- [16] Speck-Planche, A.; Kleandrova, V. V; Scotti, M. T. Fragment-Based Approach for the in Silico Discovery of Multi-Target Insecticides. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **2012**, *111* (1), 39–45.
- [17] De Castro, A.A; Caetano, M.S.; c. Silva, T.C.; Mancini, D.T; Rocha, E.P; da Cunha, E. F. F; Ramalho, T.C. Molecular Docking, Metal Substitution and Hydrolysis Reaction of Chiral Substrates of Phosphotriesterase. *Com. Chem. High T. Screen.*, **2016**, *19* (4) 334-344, 2016.
- [18] Matos, K. S. ; Da Cunha, E.F.F. ; Abagyan, R. ; Ramalho, T. C. . Computational Evidence for the Reactivation Process of Human Acetylcholinesterase Inhibited by Carbamates. *Com. Chem. High T. Screen.*, **2014**, *17*, 554-564, 2014.
- [19] Sridharan, V.; Suryavanshi, P. A.; Menéndez, J. C. Advances in the Chemistry of Tetrahydroquinolines. *Chem. Rev.*, **2011**, *111* (11), 7157–7259.
- [20] Palli, S. R.; Hormann, R. E.; Schlattner, U.; Lezzi, M. Ecdysteroid Receptors and Their Applications in Agriculture and Medicine. In *Insect Hormones; Hormones*, B. T.-V. & Ed.; Academic Press, **2005**; *73*, 59–100.
- [21] Smith, H. C.; Cavanaugh, C. K.; Friz, J. L.; Thompson, C. S.; Saggars, J. A.; Michelotti, E. L.; Garcia, J.; Tice, C. M. Synthesis and SAR of Cis-1-Benzoyl-1,2,3,4-

Tetrahydroquinoline Ligands for Control of Gene Expression in Ecdysone Responsive Systems. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13* (11), 1943–1946.

- [22] Miller, J. F.; Turner, E. M.; Gudmundsson, K. S.; Jenkinson, S.; Spaltenstein, A.; Thomson, M.; Wheelan, P. Novel N-Substituted Benzimidazole CXCR4 Antagonists as Potential Anti-HIV Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20* (7), 2125–2128.
- [23] Skerlj, R. T.; Bridger, G. J.; Kaller, A.; McEachern, E. J.; Crawford, J. B.; Zhou, Y.; Atsma, B.; Langille, J.; Nan, S.; Veale, D.; Wilson, T.; Harwig, C.; Hatse, S.; Princen, K.; De Clercq, E.; Schols, D. Discovery of Novel Small Molecule Orally Bioavailable C–X–C Chemokine Receptor 4 Antagonists That Are Potent Inhibitors of T-Tropic (X4) HIV-1 Replication. *J. Med. Chem.*, **2010**, *53* (8), 3376–3388.
- [24] Bedoya, L. M.; Abad, M. J.; Calonge, E.; Saavedra, L. A.; Gutierrez C., M.; Kouznetsov, V. V.; Alcamí, J.; Bermejo, P. Quinoline-Based Compounds as Modulators of HIV Transcription through NF- $\kappa$ B and Sp1 Inhibition. *Antiviral Res.*, **2010**, *87* (3), 338–344.
- [25] Vargas M, L. Y.; Castelli, M. V; Kouznetsov, V. V; Urbina G, J. M.; López, S. N.; Sortino, M.; Enriz, R. D.; Ribas, J. C.; Zacchino, S. In Vitro Antifungal Activity of New Series of Homoallylamines and Related Compounds with Inhibitory Properties of the Synthesis of Fungal Cell Wall Polymers. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11* (7), 1531–1550.
- [26] Suvire, F. D.; Sortino, M.; Kouznetsov, V. V; Vargas M, L. Y.; Zacchino, S. A.; Cruz, U. M.; Enriz, R. D. Structure–activity Relationship Study of Homoallylamines and Related Derivatives Acting as Antifungal Agents. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14* (6), 1851–1862.
- [27] Schmeda-Hirschmann, G.; Hormazabal, E.; Astudillo, L.; Rodriguez, J.; Theoduloz, C. Secondary Metabolites from Endophytic Fungi Isolated from the Chilean Gymnosperm *Prumnopitys Andina* (Lleuque). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **2005**, *21* (1), 27–32.
- [28] He, J.; Lion, U.; Sattler, I.; Gollmick, F. A.; Grabley, S.; Cai, J.; Meiners, M.; Schünke, H.; Schaumann, K.; Dechert, U.; Krohn, M. Diastereomeric Quinolinone Alkaloids from the Marine-Derived Fungus *Penicillium Janczewskii*. *J. Nat. Prod.*, **2005**, *68* (9), 1397–1399.
- [29] Shen, L.; Ye, Y. H.; Wang, X. T.; Zhu, H. L.; Xu, C.; Song, Y. C.; Li, H.; Tan, R. X. Structure and Total Synthesis of Aspernigerin: A Novel Cytotoxic Endophyte Metabolite. *Chemistry*, **2006**, *12* (16), 4393–4396.
- [30] Gatta, F.; Del Giudice, M.R.; Pomponi, M.; Marta, M. Synthesis of 1,2,3,4-Tetrahydroacridine and 5,6,7,8-Tetrahydroquinoline Derivatives as Potential Acetylcholinesterase Inhibitors. *Heterocycles*, **1992**, *34* (5), 991–1004.
- [31] Fink, D. M.; Bores, G. M.; Effland, R. C.; Huger, F. P.; Kurys, B. E.; Rush, D. K.; Selk, D. E. Synthesis and Evaluation of 5-Amino-5,6,7,8-Tetrahydroquinolinones as Potential Agents for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *J. Med. Chem.*, **1995**, *38* (18), 3645–3651.
- [32] Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*

- (1), 235–242.
- [33] Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, **1990**, *215* (3), 403–410.
- [34] Ramachandran, G. N.; Sasisekharan, V. Conformation of Polypeptides and Proteins\*†; C.B. Anfinsen John T. Edsall and Frederic M. Richards BT - *Advances in Protein Chemistry*, M. L. A., Ed.; Academic Press, **1968**; Vol. 23, pp.283–437.
- [35] Accelrys Software. Discovery Studio Modeling Environment. San Diego 2012.
- [36] Thomsen, R.; Christensen, M. H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49* (11), 3315–3321.
- [37] Hehre, W. J.; Deppmeier, B. J.; Klunzinger, P. E.. PRO, P. S. Wavefunction. California 1999.
- [38] Páll, S.; Abraham, M. J.; Kutzner, C.; Hess, B.; Lindahl, E. Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS. In *Solving Software Challenges for Exascale: International Conference on Exascale Applications and Software*, EASC 2014, Stockholm, Sweden, April 2-3, 2014, Revised Selected Papers; Markidis, S., Laure, E., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 3–27.
- [39] Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Roitberg, A.; Simmerling, C. Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, **2006**, *65*, 712–725.
- [40] Åqvist, J. Ion-Water Interaction Potentials Derived from Free Energy Perturbation Simulations. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94* (21), 8021–8024.
- [41] Namba, A. M.; Da Silva, V. B.; Da Silva, C. H. T. P. Dinâmica Molecular: Teoria E Aplicações Em Planejamento de Fármacos. *Eclét. Quim.*, **2008**, *33* (4), 13–24.
- [42] Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.*, **1996**, *14* (1), 33–38.
- [43] Origin 8.OriginLab Corporation. pp 1-800-969–7720.
- [44] Santos Filho, A.O.; Alencastro, R.B. Modelagem de proteínas por homologia. *Quimica Nova*, **2003**; *26*, 253-259.
- [45] Leach, A. R.; Shoichet, B. K.; Peishoff, C. E. Prediction of Protein–Ligand Interactions. Docking and Scoring: Successes and Gaps. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49* (20), 5851–5855.
- [46] Warren, G. L.; Andrews, C. W.; Capelli, A.-M.; Clarke, B.; LaLonde, J.; Lambert, M. H.; Lindvall, M.; Nevins, N.; Semus, S. F.; Senger, S.; Tedesco, G.; Wall, I. D.; Woolven, J. M.; Peishoff, C. E.; Head, M. S. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49* (20), 5912–5931.
- [47] Doucet-Personeni, C; Bentley, Pd; Fletcher, Rj; Kinkaid, A; Kryger, G; Pirard, B; Taylor, A; Taylor, R; Taylor, J; Viner, R; Silman, I; Sussman, JI; Greenblatt, Hm;



Lewis, T (2001). A structure-based design approach to the development of novel, reversible AChE inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 3203-3215.

- [48] Shamim, A.; Abbasi, S. W.; Azam, S. S. Structural and Dynamical Aspects of Streptococcus Gordonii FabH through Molecular Docking and MD Simulations. *J. Mol. Graph. Model.*, **2015**, *60*, 180–196.

## Supplementary Material

Table 1S. Electrostatic interactions carried out with the active site of *AaAChE*.

	Tacrine	1	2	3	4	5	6	JG1	JG2	JG3	JG4	JG5	JG6	JG7	JG8	JG9
<b>Trp49</b>												x				
<b>Gln67</b>		x	x													
<b>Ile68</b>		x	x			x							x	x	x	x
<b>Val69</b>									x				x	x	x	x
<b>Asp70</b>						x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>Phe73</b>						x			x				x			x
<b>Gly78</b>	x	x	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>Ala79</b>			x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>Trp82</b>	x	x	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>Asn83</b>	x					x		x	x	x		x	x	x	x	x
<b>Pro84</b>	x		x													
<b>Gly116</b>	x		x													
<b>Gly117</b>	x															
<b>Tyr119</b>	x							x	x	x	x		x	x	x	x
<b>Ser120</b>		x	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>Gly121</b>																x
<b>Glu196</b>		x	x			x		x	x	x	x	x			x	x
<b>Glu322</b>						x			x							x
<b>Glu323</b>						x										x
<b>Gly324</b>		x				x										x
<b>Tyr325</b>	x	x	x			x		x	x			x	x	x	x	x
<b>Tyr326</b>	x	x	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>Ile329</b>								x	x	x	x	x	x	x	x	
<b>Tyr330</b>	x	x	x			x		x	x	x	x	x	x	x		x
<b>Trp429</b>	x	x	x			x		x	x	x	x		x	x	x	x
<b>Thr433</b>		x				x			x							
<b>Gly434</b>		x														
<b>Val435</b>		x				x										
<b>Met436</b>		x				x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>His437</b>	x	x	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>Gly438</b>						x						x				x

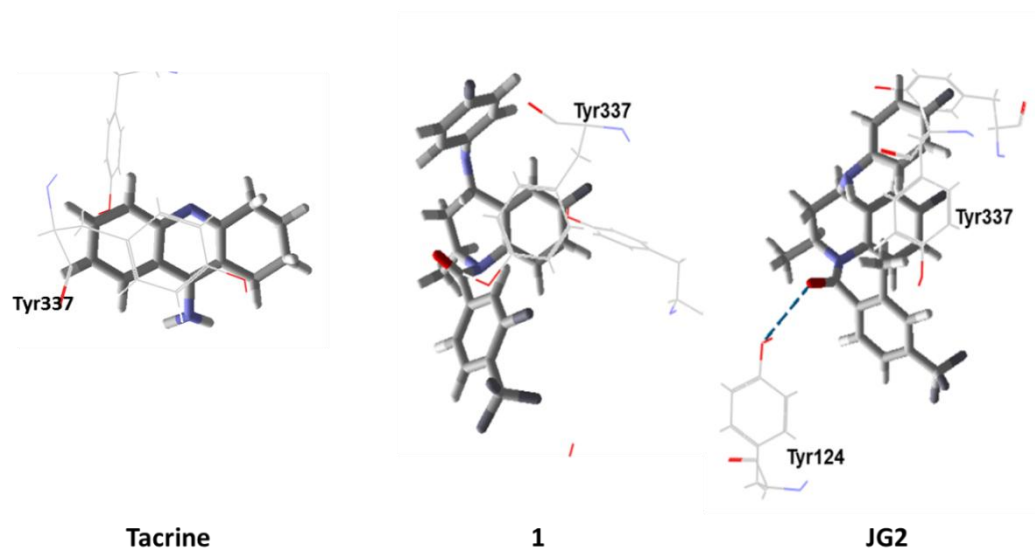


Figure 1S. Interactions observed between the compounds 1, JG2 and *HssAChE*.

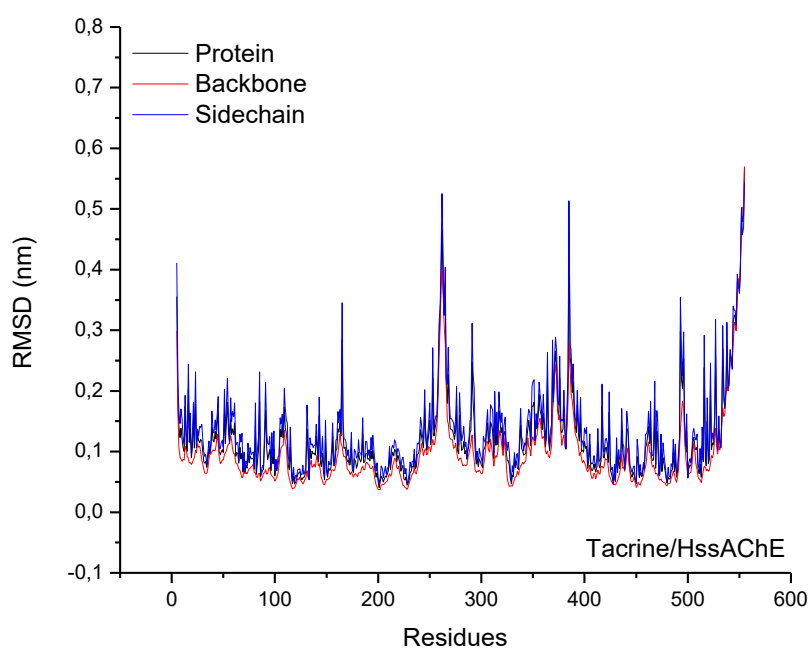
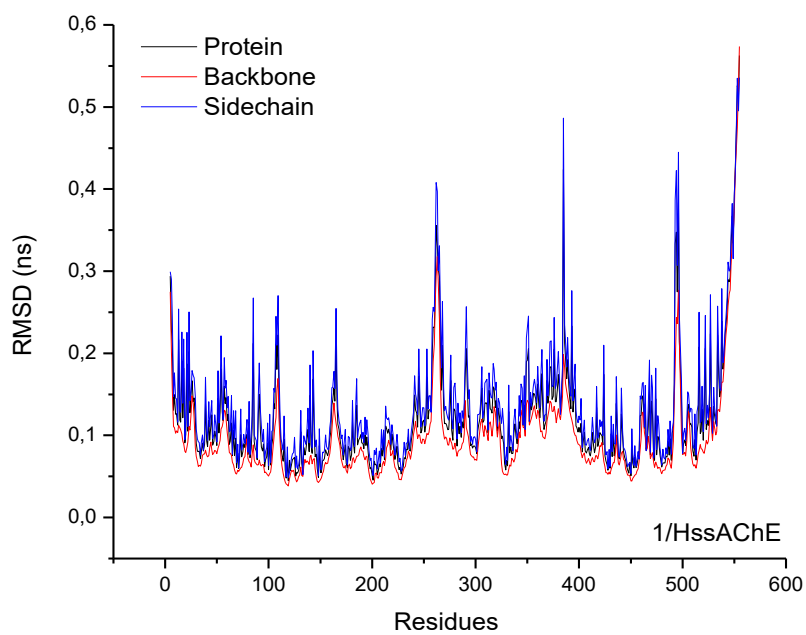
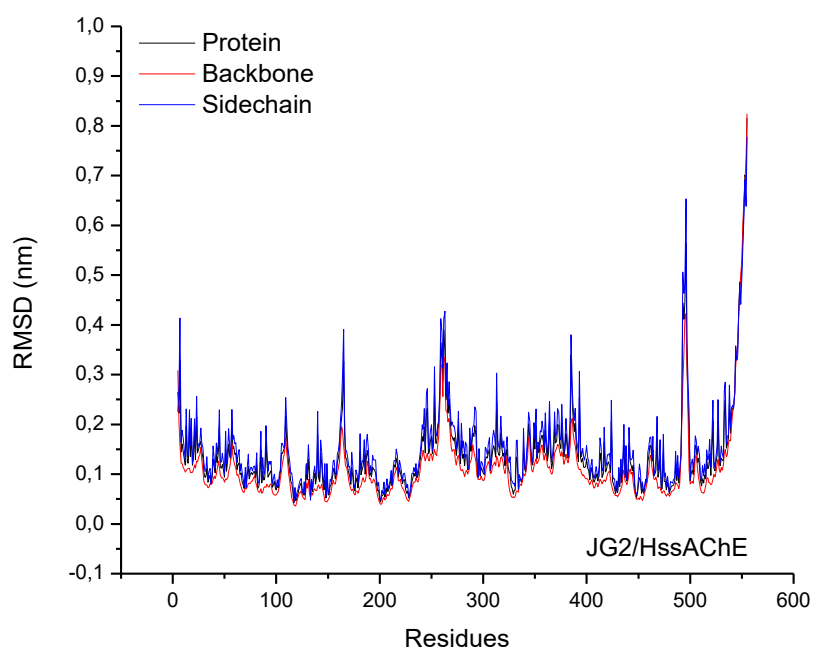


Figure 2S. Spatial RMSD Tacrine/*HssAChE*.

Figure 3S. Spatial RMSD 1/*HssAChE*.Figure 4S. Spatial RMSD JG2/*HssAChE*

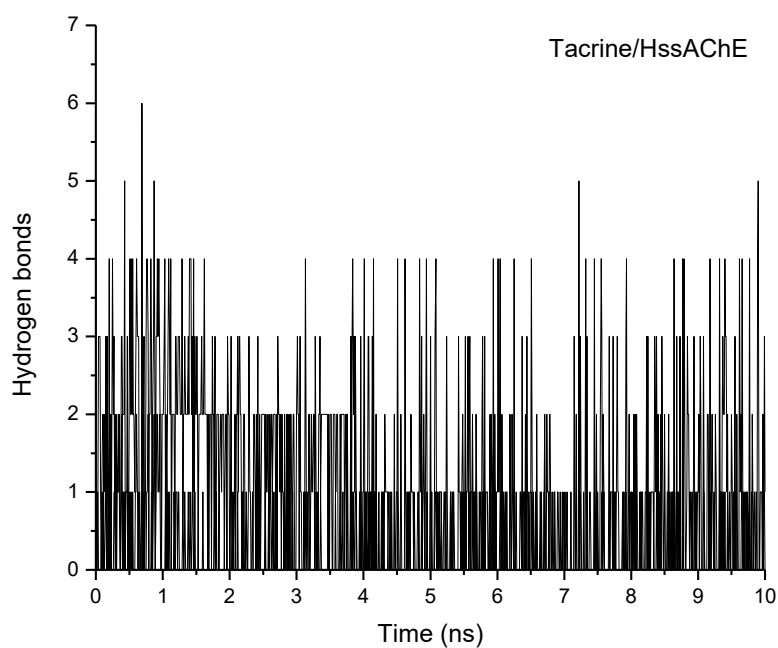


Figura 5S. Number of H-bonds. Interactions between compound Tacrine/*HssAChE* during the MD simulation.

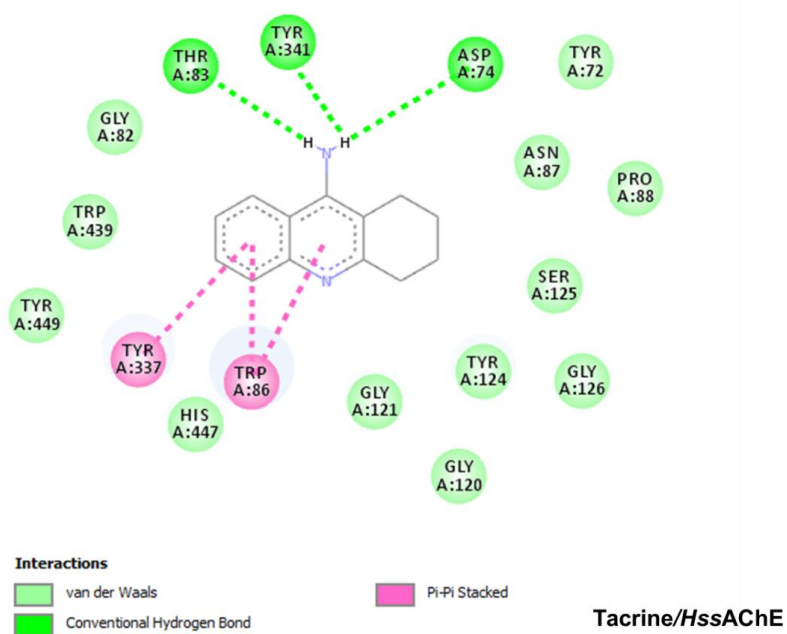


Figure 6S. Pharmacophoric map of Tacrine/*HssAChE*.

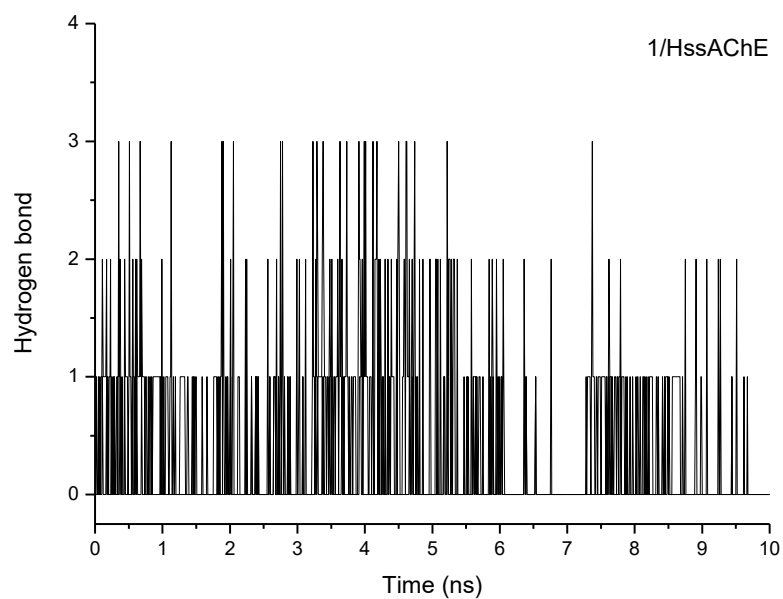


Figure 7S. Number of H-bonds. Interactions between compound 1/*HssAChE* during the MD simulation.

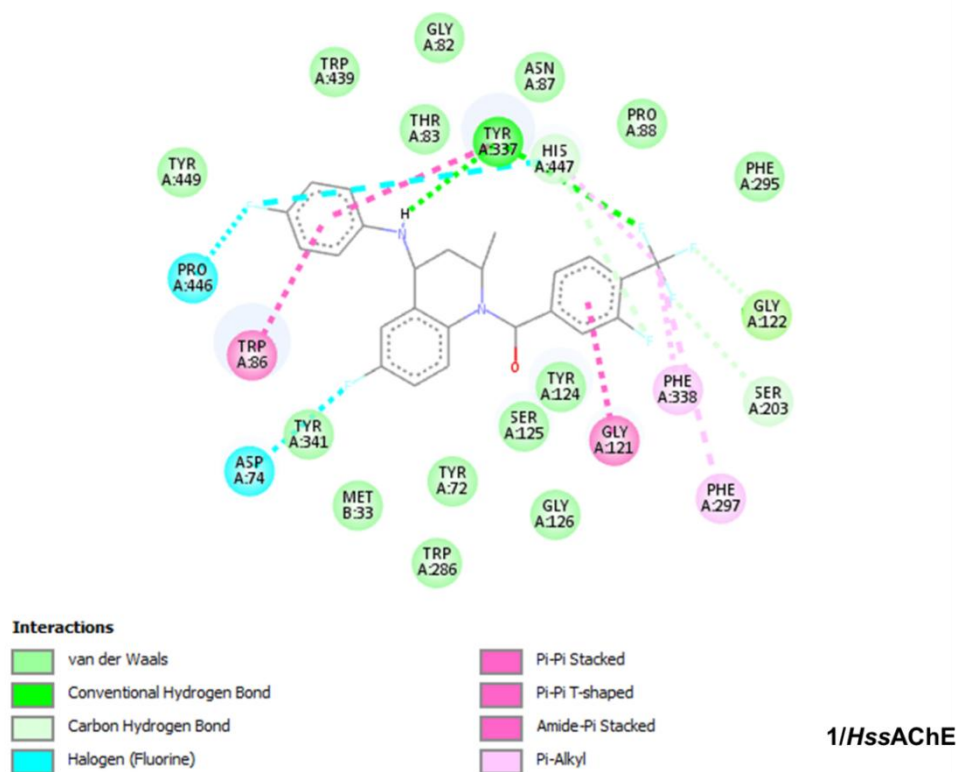


Figure 8S. Pharmacophoric map of 1/*HssAChE*.

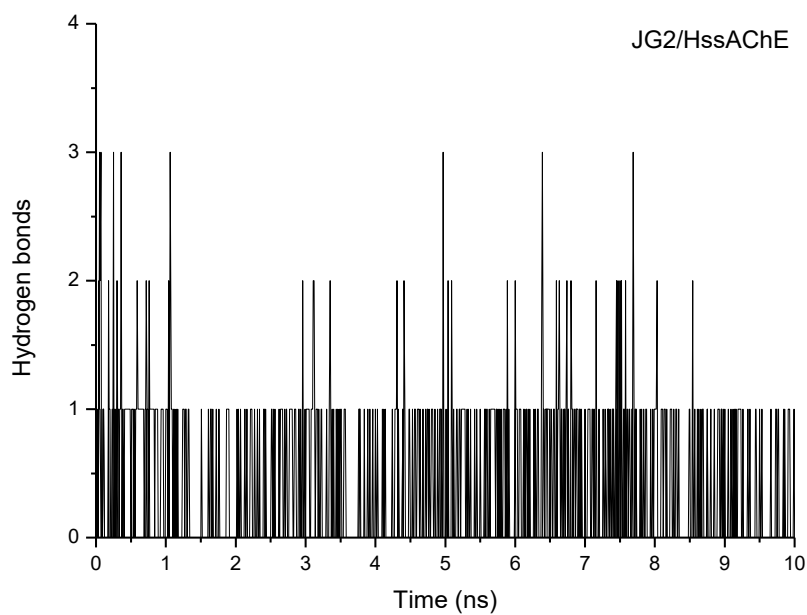


Figure 9S. Number of H-bonds. Interactions between compound JG2/*HssAChE* during the MD simulation.

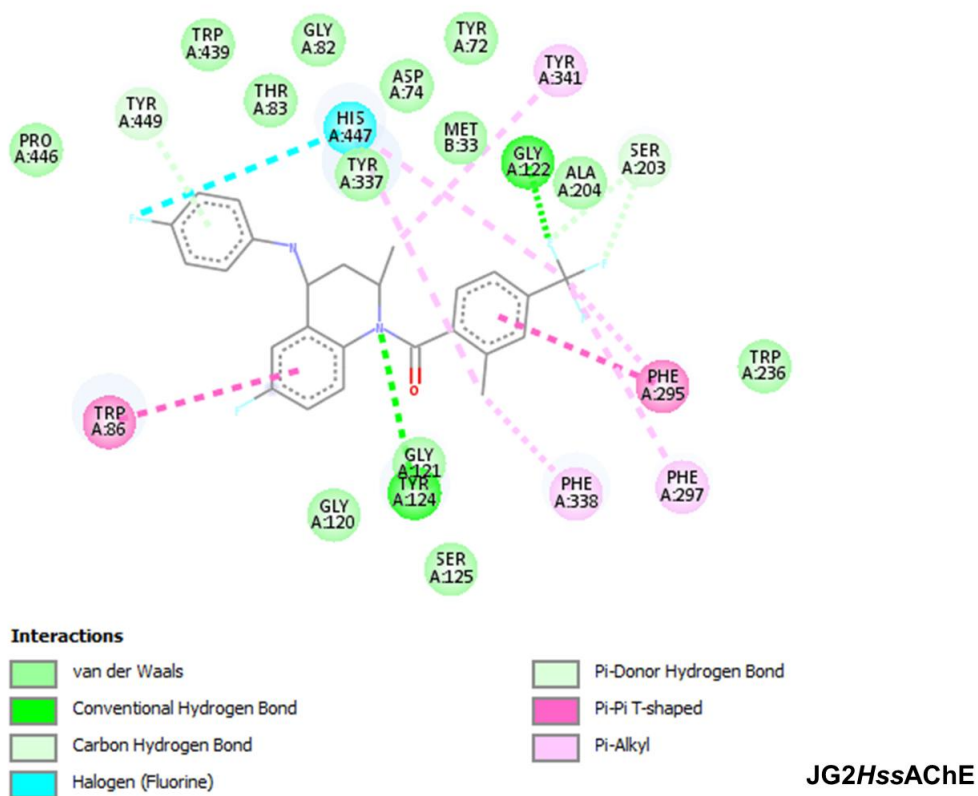


Figure 10S. Pharmacophoric map of JG2/*HssAChE*.

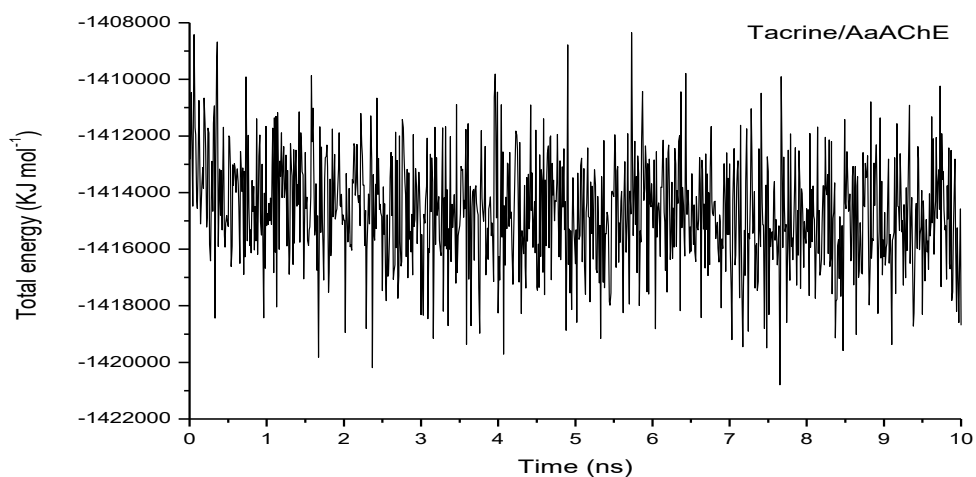


Figure 11S. Variation of total energy for the system Tacrine/AaAChE.

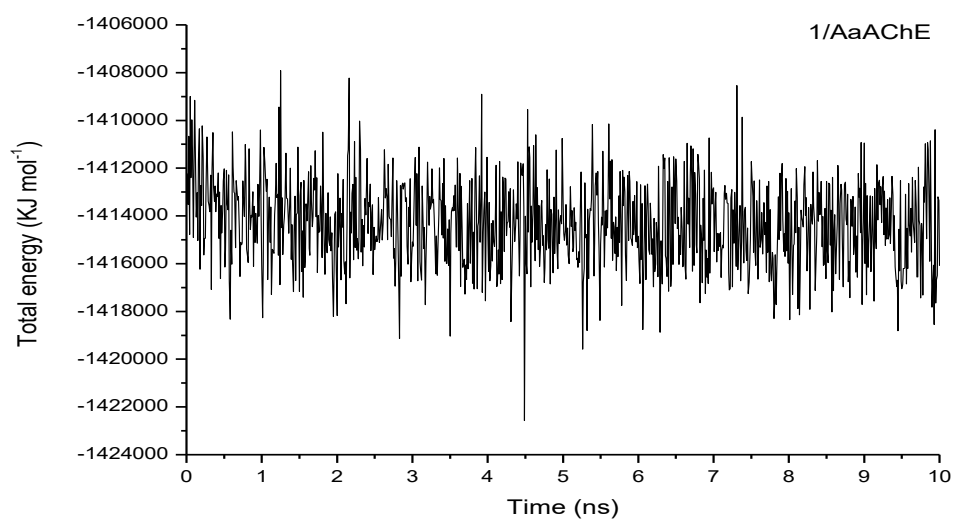


Figure 12S. Variation of total energy for the system 1/AaAChE.



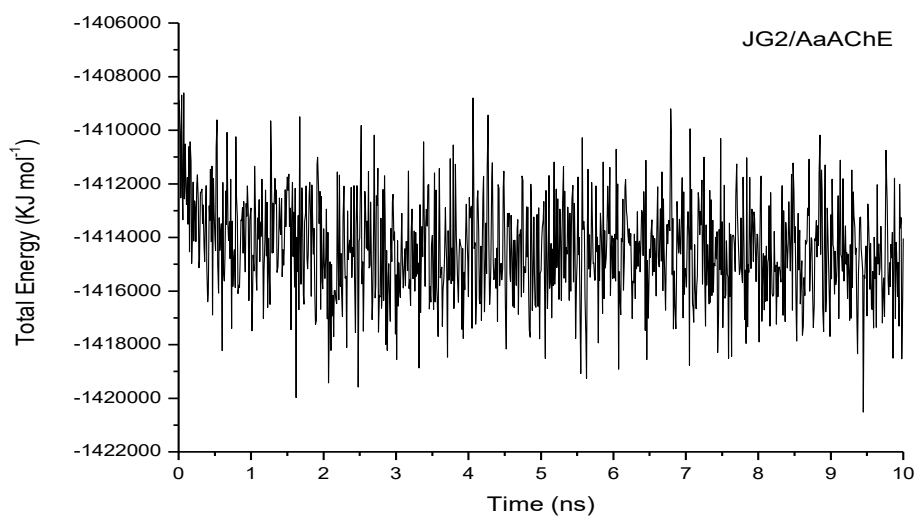


Figure 13S. Variation of total energy for the system JG2/AaAChE.

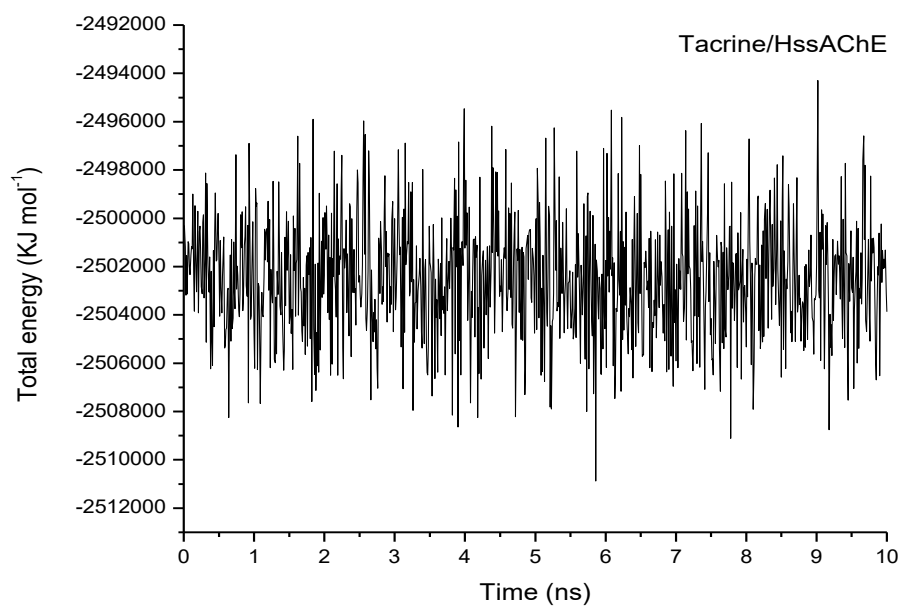


Figure 14S. Variation of total energy for the system Tacrine/HssAChE.

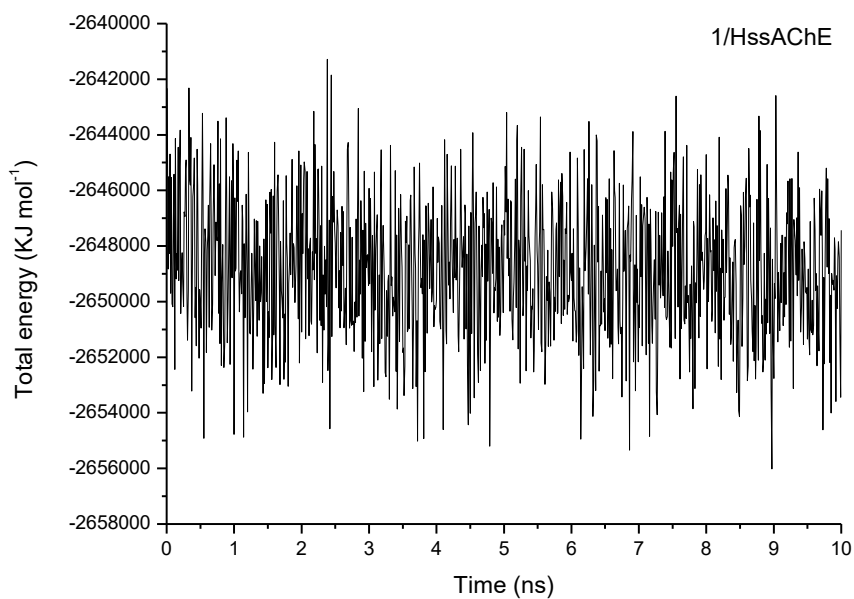


Figure 15S. Variation of total energy for the system 1/*HssAChE*.

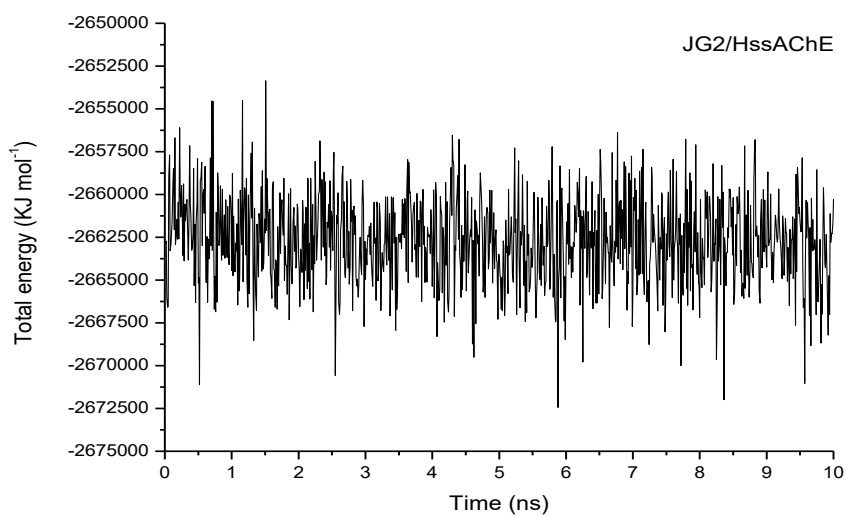


Figure 16S. Variation of total energy for the system JG2/*HssAChE*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, investigou-se a ação de compostos derivados das tetraidroquinolinas sobre o mosquito *Aedes aegypti*. Notou-se no primeiro artigo que os resultados teóricos corroboram com os dados experimentais para o estudo realizado com o receptor de ecdisona (*AaEcR*) (ação larvicida). Juntamente com os resultados obtidos para o canal BK (sugere-se ação adulticida) e a análise das estruturas em estudo, foi possível a proposição de novas moléculas, com potencial atividade inseticida. Por apresentar melhores resultados em ambos os alvos e como nosso objetivo era encontrar um composto com ambas ações (larvicida e adulticida), o composto JG2 foi selecionado.

Com relação ao estudo realizado entre os compostos já descritos no primeiro artigo e os propostos com as enzimas acetilcolinesterase do *Aedes aegypti* (*AaAChE*) e humana (*HssAChE*), observou-se através dos cálculos de ancoramento molecular que os compostos 1 e JG2 são estruturas promissoras em termos de estabilidade para *AaACHE*, bem como a seletividade em *HssAChE*. Embora nos estudos de dinâmica molecular JG2 tenha apresentado valores de RMSD maiores que os demais compostos, esse desvio não foi significativo e mesmo que o composto 1 tenha mostrado resultados semelhantes em ambas as enzimas, os resultados de ancoramento mostram que estes compostos interagem com maior facilidade, energeticamente falando, com a enzima do mosquito *Aedes aegypti*. É relevante lembrar que no estudo com a acetilcolinesterase os compostos 1 e JG2 podem estar agindo com as duas ações esperadas (larvicida e adulticida) uma vez que tanto larvas quanto o mosquito adulto possuem esta enzima.

Resumindo: o composto JG2, proposto por nosso grupo, apresenta tanto ação larvicida quanto adulticida, uma vez que interage bem com o receptor de ecdisona, com ao canal BK e com a acetilcolinesterase do *Aedes aegypti*. Baseados em tudo exposto, nossos resultados indicam este composto como um potencial inseticida a ser sintetizado e testado contra o mosquito *Aedes aegypti*.

**ANEXOS**  
(Trabalhos desenvolvidos durante pós-graduação)



*Revista Virtual de Química*

ISSN 1984-6835

**Artigo**

**Guerra Química: Perspectivas no Estudo de Reativadores da Enzima Acetilcolinesterase Inibida por Organofosforados**

Giacoppo, J. O. S.; Lima, W. E. A.; Kamil, K.; França, T. C. C.; da Cunha, E. F. F.; Ramalho, T. C.\*

*Rev. Virtual Quim.*, 2014, 6 (3), 653-670. Data de publicação na Web: 13 de abril de 2014

<http://www.uff.br/rvq>

**Chemical Warfare: Perspectives on Reactivating the Enzyme Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphates**

**Abstract:** Recent attacks on Syria using the nerve agent sarin warned once again the world and the scientists on the use of chemical weapons. It is known that nerve agents are potent inhibitors of acetylcholinesterase (AChE), the enzyme responsible for the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine and, thus, transmitting of nerve impulses. The process of AChE inhibition by organophosphate (OP) can be reversed by a nucleophile, responsible for dephosphorylation of the residue Ser203 in the active site of the enzyme. In this sense, oximes exhibit this characteristic and are able to remove the neurotoxic and reactivate the enzyme. Here, we review experimental and

Articles

**Molecular modeling and *in vitro* reactivation study between the oxime BI-6 and acetylcholinesterase inhibited by different nerve agents**

Juliana O.S. Giacoppo, Tanos C.C. França, Kamil Kuča, Elaine F.F. da Cunha, Ruben Abagyan, Dalana T. Mancini & ...show all  
Pages 2048-2058 | Received 12 Sep 2014, Accepted 15 Nov 2014, Accepted author version posted online: 19 Nov 2014, Published online: 18 Dec 2014  
Download citation <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2014.989408> Crossmark

Full Article   Figures & data   References   Citations   Metrics   Reprints & Permissions   [Get access](#)

**Abstract**

Nerve agents are organophosphates acting as potent inhibitors of acetylcholinesterase (AChE), the enzyme responsible for the hydrolysis of acetylcholine and, consequently, the termination of the transmission of nerve impulses. The inhibition of AChE by an organophosphate can be reversed by a nucleophilic agent able to dephosphorylate a serine residue in the active site of AChE. In this sense, the oximes are compounds capable of removing the nerve agent and reactivate the enzyme. Here, we have applied a methodology involving theoretical docking and Quantum Mechanics/Molecular Mechanics, using the softwares Molegro<sup>®</sup> and Spartan<sup>®</sup>, to evaluate the kinetic constants of reactivation and the interactions of the oxime BI-6 with AChE inhibited by different organophosphorus compounds in comparison to *in vitro* data. Results confirm that this method is suitable for the prediction of kinetic and



## Original article

Molecular modeling toward selective inhibitors of dihydrofolate reductase from the biological warfare agent *Bacillus anthracis*

Juliana O.S. Giacoppo<sup>a</sup>, Daiana T. Mancini<sup>a</sup>, Ana P. Guimarães<sup>b</sup>, Arlan S. Gonçalves<sup>c</sup>, Elaine F.F. da Cunha<sup>a</sup>, Tanos C.C. França<sup>b</sup>, Teodorico C. Ramalho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Computational Chemistry, Department of Chemistry, Federal University of Lavras (UFLA), Campus Universitário, PO Box 3037, 37200-000, Lavras, MG, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Molecular Modeling Applied to the Chemical and Biological Defense, Military Institute of Engineering, Praça General Tiburcio 80, Urca, 22290-270, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>c</sup> Federal Institute of Education Science and Technology of Espírito Santo (IFES), Avenida Ministro Salgado Filho S/Nº, 29106-010, Vila Velha, ES, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 February 2014

Accepted 12 June 2014

Available online 18 June 2014

## Keywords:

*Bacillus anthracis*

Inhibitors

Docking

Molecular dynamics

Biological warfare

## ABSTRACT

In the present work, we applied docking and molecular dynamics techniques to study 11 compounds inside the enzymes dihydrofolate reductase (DHFR) from the biological warfare agent *Bacillus anthracis* (BaDHFR) and *Homo sapiens sapiens* (HsDHFR). Six of these compounds were selected for a study with the mutant BaF96IDHFR. Our results corroborated with experimental data and allowed the proposition of a new molecule with potential activity and better selectivity for BaDHFR.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Bacillus anthracis*, one of the most dangerous biological warfare agents, has already been employed as a weapon by both military and terrorist groups and is capable of causing high mortality rates, despite the therapy available today [1–3]. This microorganism is a gram-positive, aerobic, spore-forming bacterium that causes anthrax mainly in herbivorous animals but can also cause acute disease in humans [4]. *B. anthracis* exists in two morphologically

requires these antibiotics being administered to patients before the onset of symptoms and the current vaccination strategies require the regular administration of reinforcements over a period of 18 months in order to maintain immunity [13,14]. This facts, together with the menace represented by the eventual use of *B. anthracis* as a biological agent, signal to the importance of the search for new targets to the drug design against anthrax.

The enzyme DHFR plays a key role in the folate pathway, responsible for the biosynthesis of deoxythymidine, most

Towards the understanding of tetrahydroquinolines action in *Aedes aegypti*: larvicide or adulticide?

Juliana de O. S. Giacoppo<sup>a</sup>, Juliano B. Carregal<sup>b</sup>, Moacyr C. Junior<sup>b</sup>, Elaine F. F. da Cunha<sup>a</sup> and Teodorico C. Ramalho<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry, Federal University of Lavras, Lavras, Brazil; <sup>b</sup>Department of Chemistry, Federal University of São João del Rey, Divinópolis, Brazil; <sup>c</sup>Center for Basic and Applied Research, University Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* is an important vector of arboviruses such as dengue, yellow fever, chikungunya and Zika. Among the various types of insecticides used to combat this vector, the insect growth regulators have been developed and recommended for control of their larvae. In this work compounds with proven regulatory action, tetrahydroquinolines will be studied. These regulators act on the hormones responsible for the insect development. Ecdysone, one of the main hormones involved in this process has a specific receptor (EcR), where tetrahydroquinolines derivatives can bind, disrupting the normal action of this hormone, because they have structure similar to hormone 20-hydroxyecdysone (20E). In addition, studies show that this class of compounds interacts strongly in the potassium channel activated by calcium (BK channel). Thus, the goal is to study the action of compounds (tetrahydroquinolines) as insecticides and evaluate their larvicidal action (action on the ecdysone receptor) or adulticide (action on the BK channel) through homology modelling techniques, molecular docking and molecular dynamics simulations and aiming to propose a compound that presents both actions (larvicide / adulticide).

## ARTICLE HISTORY

Received 14 May 2016

Accepted 19 September 2016

## KEYWORDS

*Aedes Aegypti*; ecdysone receptor; potassium channel activated by calcium (BK channel); docking; molecular dynamics

## 1. Introduction

Mosquitoes are associated with various health problems. These include yellow fever, malaria, dengue, filariasis, chikungunya, Japanese encephalitis, among others, causing millions of deaths each year. [1, 2] *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) (Diptera: Culicidae), in turn, is the vector responsible for transmitting four major diseases: yellow fever, dengue, chikungunya and Zika [2, 3]

Note that ecdysone has a specific receptor (EcR), belonging to the family of nuclear receptors, which are widely distributed throughout the body, in embryos, and several pre-pupal tissues such as imaginal discs, body fat, the trachea, salivary glands, the central nervous system, the intestine and cells associated with cuticular structures. [11]

This receptor plays a critical role in metamorphosis, and

## Interaction between tetrahydroquinolines and *Aedes aegypti* and human acetylcholinesterases: Design of Potential insecticides

Juliana de Oliveira Silva Giacoppo<sup>a</sup>, Elaine F. F. da Cunha<sup>1a</sup>, Leticia C. Assis<sup>2a</sup>, Daiana Teixeira Mancini<sup>3a</sup>, Teodorico C. Ramalho<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry, Federal University of Lavras, 37200-000 Lavras, MG, Brazil



**Abstract:** Mosquitoes are associated with various public health problems. This includes the transmission of various diseases causing millions of deaths each year. The *Aedes aegypti* is responsible for transmitting four major diseases: yellow fever, dengue, chikungunya and zika. On the one hand, the importance of these synthetic insecticides for mosquito control is known, on the other, one must consider how they are harmful to the environment and to humans. Thus it is necessary to search for new compounds that are more effective and less toxic. Based on this, we are committed to study a very versatile class that make up the tetrahydroquinoline derivatives, which have shown activity in various studies, including anticholinesterase activity (most common action of insecticides). Therefore our objective was to study the interaction of some derivatives of the proposed tetrahydroquinolines in the literatura and others proposed by our group with the enzyme acetylcholinesterase of the *Aedes aegypti* (AaAChE) and to study the selectivity of these compounds to human acetylcholinesterase (Hs:AChE). For this, anchoring and molecular dynamics studies were conducted thus seeking to collaborate with the discovery of more potent drugs to be used in combating the mosquito *Aedes aegypti*. Our results show that Compounds 1 and JG2 are promising to be studied more thoroughly and to be tested on AaAChE. The selectivity in the docking studies, although the molecular dynamics studies suggest good interaction of compounds with the active site of Hs:AChE, show that these compounds are most preferred (energy) by the *Aedes aegypti* mosquito enzyme.

**Keywords:** *Aedes Aegypti*; Tetrahydroquinolines; Acetylcholinesterase; selectivity; Molecular dynamics.

### 1. INTRODUCTION

search for new compounds that are more effective and less toxic.

## In silico studies of Y and Z isomers: Searching for new insecticides against *Aedes Aegypti* through research on different targets

Juliana de O. S. Giacoppo<sup>a</sup>, Leticia Assis<sup>a</sup>, Elaine F.F da Cunha<sup>a</sup>, Teodorico C. Ramalho<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry, Federal University of Lavras, 37200-000 Lavras, MG, Brazil

### INTRODUCTION

Insect-borne diseases are one of the world's most important health problems in the tropical and subtropical regions of the world. Mosquitoes are arthropod vectors, transmitting receptors of several terrible pathogens and their bite causes allergies and loss of sleep (Cecilia et al., 2014; Muthu et al., 2012). Thus, mosquito control plays an important role in any control of pathogen transmission (Cecilia et al., 2014).

Mosquito control was mainly based on the synthetic insecticides, a knowledge, the pyrethroids, organophosphates, organochlorines and carbamates. (Tikar et al., 2009. Mulyatno et al. 2012. Grisales et al.). The contribution of insecticides is undeniable, but large-scale application has resulted in lesser effectiveness and development of resistance (Reegam et al., 2016; Cecilia et al., 2014).

In addition to undesirable actions on other beneficial organisms, increasing the cost of insecticides and increasing public concern with an environmental requirement requires a

## Asymmetric biocatalysis of the nerve agent VX by human serum paraoxonase 1: molecular docking and reaction mechanism calculations

Jaqueline Sartorelli<sup>1</sup> · Alexandre A. de Castro<sup>1</sup> · Teodorico C. Ramalho<sup>1,2</sup> · Juliana O. S. Giacoppo<sup>1</sup> · Daiana T. Mancini<sup>1</sup> · Melissa S. Caetano<sup>3</sup> · Elaine F. F. da Cunha<sup>1</sup>

Received: 27 February 2016 / Accepted: 26 July 2016 / Published online: 8 August 2016  
© Springer Science+Business Media New York 2016

**Abstract** Organophosphorus compounds have been employed in agricultural activity for a long time, causing serious public health problems. Due to their toxic properties, these compounds have also been used as chemical weapons. In view of this scenario, the catalytic degradation and the development of bioremediation processes of organophosphorus compounds have been of wide interest. Among several enzymes capable of degrading organophosphorus compounds, the human serum paraoxonase 1 has shown good potential for this purpose. To evaluate the interaction mode between the human serum paraoxonase 1 (wild-type and mutants) enzymes and the VX compound, one of the most toxic organophosphorus compounds known, molecular docking calculations were conducted. In addition, seeking to analyze the reaction pathway and the stereochemistry preference by human serum paraoxonase 1

enantiomer in relation to the other. The current results indicate key points for designing new, more efficient mutant human serum paraoxonase 1 enzymes for VX degradation.

**Keywords** Molecular · docking · HuPON1 · VX · QM/MM · Mutation · Homology modeling

### Introduction

The overuse of organophosphorus compounds (OP) in the agricultural, domestic, and industrial applications has been a serious problem for many decades. Different OP, such as pesticides, are directly introduced into the environment with only 5 % of them reaching the target organism (Rea,

## Synthesis and in vitro evaluation of leishmanicidal activity of 7-hydroxy-4-phenylcoumarin derivatives

Isael A. Rosa<sup>1</sup> · Letícia de Almeida<sup>2</sup> · Karina F. Alves<sup>2</sup> · Marcos J. Marques<sup>2</sup> · Antônio M. Fregnan<sup>3</sup> · Claudinei A. Silva<sup>1,4</sup> · Juliana O. S. Giacoppo<sup>5</sup> · Teodorico C. Ramalho<sup>5</sup> · Diogo T. Carvalho<sup>3</sup> · Marcelo H. dos Santos<sup>6</sup>

Received: 29 March 2016 / Accepted: 30 September 2016 / Published online: 27 October 2016  
© Springer Science+Business Media New York 2016

**Abstract** Eight coumarin derivatives (2–8) were synthesized from 7-hydroxy-4-phenylcoumarin **1** and were evaluated for their in vitro leishmanicidal activity against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*, as well their toxicity in murine macrophages. Compounds **4** and **7** showed the most significant results against promastigote forms of *L. amazonensis*. They were at least three-fold more active than **1** and Compound **4** was as effective as Amphotericin B. Compound **4**, a 7-*O*-prenylated derivative, and **7**, a tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -*D*-glucopyr-

34.93  $\mu$ M, respectively against amastigote forms. Furthermore, they do not cause toxicity in mammalian or *Leishmania* cells in vitro. This study shows that these coumarin derivatives are potential prototypes for the development of novel drugs with leishmanicidal activity.

**Keywords** Coumarin derivatives · Leishmaniasis · *Leishmania amazonensis*