



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS**

KLLYSMANN SANTOS RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *in silico*, REPELENTE E BIOCIDA DE DERIVADOS
DO BENZILIDENOMALONONITRIL FRENTE A *Periplaneta americana* (BARATA
DOMÉSTICA)**

Macapá/AP
2018

KLLYSMANN SANTOS RIBEIRO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *in silico*, REPELENTE E BIOCIDA DE DERIVADOS DO BENZILIDENOMALONONITRIL FRENTE A *Periplaneta americana* (BARATA DOMÉSTICA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá, na área de concentração Ensaio Biológicos, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes.

Macapá/AP
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborado por Mara Patrícia Corrêa Garcia – CRB-2/1248

Ribeiro, Killysmann Santos

Avaliação da atividade *in silico*, repelente e biocida de derivados do benzilidenomalononitril frente a *Periplaneta americana* (barata doméstica) / Killysmann Santos Ribeiro ; orientador, Madson Ralide Fonseca Gomes. – Macapá, 2018.

48 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Periplaneta americana. 2. Barata doméstica. 3. Inseticida. 4. Repelente. 5. Biocida. I. Gomes, Madson Ralide Fonseca, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

615.321 R818a
CDD. 22 ed.

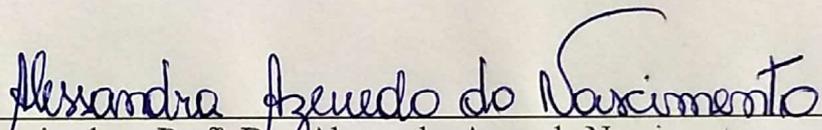
KLLYSMANN SANTOS RIBEIRO

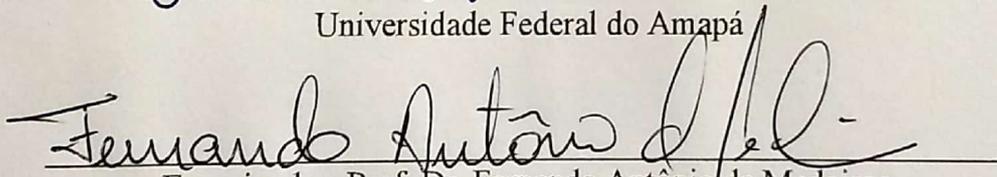
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *in silico*, REPELENTE E BIOCIDA DE DERIVADOS DO BENZILIDENOMALONONITRIL FRENTE A *Periplaneta americana* (BARATA DOMÉSTICA)

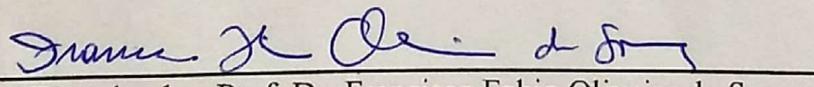
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá, na área de concentração Ensaio Biológicos, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

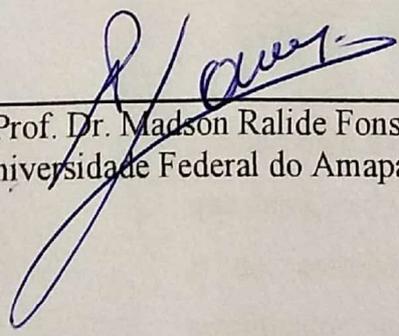
Orientador: Prof. Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes.

DATA DE APROVAÇÃO: 28 / 05 / 18


Examinadora: Prof.^a Dra. Alessandra Azevedo Nascimento
Universidade Federal do Amapá


Examinador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Medeiros
Universidade Federal do Amapá


Examinador: Prof. Dr. Francisco Fabio Oliveira de Sousa
Universidade Federal do Amapá - PPGCF


Orientador: Prof. Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes
Universidade Federal do Amapá

Dedico esse trabalho à minha mãe, Terezinha, que desde cedo me ensinou o valor do trabalho e do esforço, meu maior exemplo dos sentimentos mais nobres e que sempre me mostrou que não importa onde ou vá e nem por quanto tempo, sempre terei para onde voltar.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes, pela disponibilidade e acompanhamento durante a execução desse trabalho.

A Leticia Machado, pela cooperação indispensável, sem a qual esse trabalho não seria possível.

A Deonice Tomaz, pela amizade e por estar sempre disposta a me ajudar no que precisar.

À Prof Lorane, Lucilene Rocha e todos do LabPharmChem, pelos conhecimentos e cooperação.

Ao Prof. Irlon, Andréia Amorim e todos do BIORG, pelas moléculas cedidas e conhecimentos compartilhados.

A Gustavo França, por estar do meu lado, compartilhando os momentos felizes e tornando os não muito felizes, suportáveis.

Às minhas amigas/irmãs Talita Neulls e Beatriz Amorim, por estarem ao meu lado, me acolherem quando preciso e por mencionarem que estou chato bem menos vezes do que eu mereço ouvir.

A todos que me ajudaram até esse momento, muitíssimo obrigado! Minha gratidão eterna!

RESUMO

A barata doméstica (*Periplaneta americana*) representa um importante problema para a saúde pública, pois transmite doenças e promove alergias. A toxicidade e crescente resistência desses insetos aos inseticidas comumente empregados, faz necessário procurar por novas substâncias que auxiliem no combate a essa praga. Dessa forma, esse trabalho objetiva avaliar a atividade inseticida de seis compostos derivados do 2-benzilidenomalononitril frente à *P. americana*, dada a versatilidade desse composto e síntese bem estabelecida. Para tanto, utilizou-se inicialmente uma triagem virtual através do *docking* molecular, usando como ferramenta o programa GOLD frente à acetilcolinesterase, acompanhada de uma triagem utilizando baratas adultas. As substâncias selecionadas foram submetidas aos testes de repelência e toxicidade. No *docking*, observou-se interações das seis substâncias com a enzima, porém só foi observada mortalidade em quatro, que foram selecionadas para os testes posteriores. Observou-se que nenhuma das substâncias mostrou efeito repelente, mas três delas mostraram efeito atraente. O 2-benzilidenomalononitril demonstrou efeito tóxico, levando até 54% das baratas expostas à morte. Esses resultados demonstram que os derivados do 2-benzilidenomalononitril tem potencial inseticida frente a *P. americana*, sendo necessários mais testes a fim de potencializar esse efeito e viabilizar seu uso no controle da população desses insetos.

Palavras-chave: *Periplaneta americana*. Barata doméstica. Benzilidenomalononitril. Inseticida. Repelente.

ABSTRACT

The american cockroach (*Periplaneta americana*) represents a major public health problem because it transmits diseases and promotes allergies. The toxicity and increasing resistance of these insects to commonly used insecticides makes it necessary to look for new substances that will help to combat this pest. Thus, this work aims to evaluate the insecticidal activity of six compounds derived from 2-benzylidene malononitrile against *P. americana*, given the versatility of this compound and well-established synthesis. For this, a virtual screening was done using molecular docking, with the software GOLD as a tool against acetylcholinesterase, accompanied by a screening using adult cockroaches. The selected substances were submitted to repellency and toxicity tests. In molecular docking, all the six substances interacted with the enzyme, but mortality was observed only in four, which were selected for the following tests. It was observed that none of the substances showed repellent effect, but three of them showed attractive effect. 2-benzylidene malononitril showed a toxic effect, leading up to 54% of cockroaches exposed to death. These results demonstrate that the 2-benzylidene malononitril derivatives have an insecticidal potential against *P. americana*, and further tests are necessary to potentiate this effect.

Keywords: *Periplaneta americana*. American cockroach. Benzylidene malononitrile. Insecticide. Repellent.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida da <i>P. americana</i> , ilustrando os estágios de ooteca, ninfa e adulto	19
Figura 2 - Caixa plástica usada para a criação das baratas em laboratório.	22
Figura 3 - Teste de repelência, contendo as ninfas sobre o papel filtro.	26
Figura 4 - Teste da atividade biocida, contendo as baratas sobre a substância-teste.	27
Figura 5 - Resultado do docking molecular da substância 1a (no centro), mostrando as interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa) e as pontes de hidrogênio convencionais (linha tracejada em verde) e não convencionais (linha tracejadas em cinza).....	29
Figura 6 - Docking da substância 1b (abaixo), mostrando a interação hidrofóbica (linha tracejada em rosa).	30
Figura 7 - Docking da substância 1c (ao centro), mostrando as interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa).....	31
Figura 8 - Docking da substância 1d (ao centro), mostrando a interações hidrofóbicas Pi-Pi (linha tracejada em rosa), a ponte de hidrogênio convencional (linha tracejada em verde) e a ligação hidrofóbica do tipo pi-alquil (linha tracejada em lilás).	32
Figura 9 - Resultado do docking molecular da substância 1e (ao centro), mostrando as interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa).....	33
Figura 10 - Resultado do docking molecular da substância 1f (ao centro), mostrando a interação hidrofóbica (linhas tracejadas em rosa) e as pontes de hidrogênio convencionais (linhas tracejadas em verde).....	33
Figura 11 - Efeito repelente do 2-benzilidenomalononitril (1a) frente às ninfas de <i>Periplaneta americana</i> no decorrer de quatro horas.	36
Figura 12 - Efeito repelente do 2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitril (1b) frente às ninfas de <i>Periplaneta americana</i> no decorrer de quatro horas.	37
Figura 13 - Efeito repelente do 2-(4-metoxibenzilideno) malononitril (1c) frente às ninfas de <i>Periplaneta americana</i> no decorrer de quatro horas.	38
Figura 14 - Efeito repelente do 2-(4-fluorobenzilideno) malononitril (1e) frente às ninfas de <i>Periplaneta americana</i> no decorrer de quatro horas.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura química e identificação das substâncias utilizadas	16
Tabela 2 – Resumo das interações encontradas no docking entre os derivados do benzilidenomalononitril e a acetilcolinesterase	34
Tabela 3 – Mortalidade dos insetos após a triagem.....	35
Tabela 4 – Efeito repelente das substâncias testadas frente às ninfas de <i>Periplaneta americana</i>	36
Tabela 5 – Média \pm D.P.M. da atividade biocida frente a <i>P. americana</i> durante 72h com o 2- benzilidenomalononitril (1a).....	39

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIORG	Laboratório de Biocatálise e Biotransformação em Química Orgânica
GLY	Glicina
GOLD	<i>Genetic Optimisation for Ligand Docking</i>
HIS	Histidina
IP	Índice de Preferência
IPC	Insetos Sobre o Papel Controle
IPT	Insetos Sobre o Papel Teste
IV	Infravermelho
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PF	Ponto de Fusão
PHE	Fenilalanina
PM	Peso Molecular
PSA	<i>Polar Surface Area</i>
REA	Relação Estrutura-Atividade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	<i>Root Mean-Square Deviation</i>
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 A importância do docking molecular na descoberta de substâncias de interesse biológico.....	14
2.2 Considerações sobre o Benzilidenomalononitril e seus derivados	15
2.3 <i>Periplaneta americana</i>: características e comportamento.....	17
3 OBJETIVOS	21
3.1 Geral	21
3.2 Específicos	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Animais utilizados	22
4.2 Substâncias testadas	23
4.3 Emprego do <i>docking</i> molecular na seleção das substâncias	24
4.4 Triagem	24
4.5 Teste de repelência.....	25
4.6 Teste da atividade biocida.....	26
4.7 Análise estatística.....	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

Os insetos compõem a classe com o maior número de representantes no reino animal e são também aqueles mais amplamente distribuídos nos mais diferentes ambientes do globo, incluindo desde florestas, desertos, rios e mares, até ambientes urbanos, e desenvolvem importantes atividades para a manutenção da vida no planeta e do equilíbrio ecológico. Eles contribuem, por exemplo, para a polinização das plantas, possibilitando a manutenção da saúde dos diversos biomas, auxiliam na decomposição da matéria orgânica, produzem mel e seda, além de servirem de alimento para outros animais, inclusive humanos em determinadas culturas, mantendo assim a cadeia alimentar, o controle das populações e a manutenção do equilíbrio ecológico.

No entanto, ao mesmo tempo que são indispensáveis para a vida humana na terra, os insetos também podem comprometer atividades importantes na sociedade, como economia, saúde e produção de alimentos.

É sabido que os insetos podem ser vetores de doenças de relevância epidemiológica, sendo capazes de transmitir, ativa ou mecanicamente, uma série de vírus, bactérias, protozoários e até helmintos, comprometendo dessa forma a atividade econômica de uma série de indústrias como a de alimentos, farmacêutica e de produtos para saúde, além de causar impactos significativos na assistência à saúde, ocasionando aumento da morbi-mortalidade da população e, conseqüentemente, dos gastos públicos.

Os insetos também são capazes de se disseminar em culturas de diversos alimentos, podendo comprometer significativamente o plantio e colheita de diversas espécies vegetais, por esse motivo é comum que setores que trabalham nesses segmentos tenham um programa capaz de controlar a população de insetos e de outros animais.

É indispensável também apontar a importância para o controle da população desses artrópodes no espaço domiciliar e peridomiciliar, uma vez que uma série deles estão adaptados à vida próxima ao homem e podem transmitir-lhes doenças, contribuindo para o aparecimento de endemias e pandemias. No território brasileiro, algumas patologias ganham destaque, como a leishmaniose, doença de chagas, malária, febre amarela, e as endemias mais recentes que tem causado extrema preocupação nas autoridades de saúde pública, a dengue, a febre chikungunya e o zika vírus, todas transmitidas pelo mesmo mosquito, o *Aedes aegypti*.

Diante da necessidade de se adotar medidas para conter o avanço das populações de insetos nos espaços urbanos e rurais, as autoridades têm lançado mão de diversos meios que vão desde a conscientização da população a fim de adaptar os ambientes com circulação de

peças e animais e a mudança de hábitos visando interromper o ciclo de vida dos vetores, ou não invadir o seu habitat natural, até o uso de ferramentas biológicas (como microrganismos parasitas e modificações genéticas) e químicas.

O controle químico é feito principalmente com produtos inseticidas sintéticos, que, de acordo com a exigência da autoridade sanitária brasileira, são capazes de eliminar pelo menos 90% dos indivíduos que entrarem em contatos com elas, e são produzidos majoritariamente à base de substâncias organofosforadas, carbamatos e piretróides, que tem como principais alvos o sistema nervoso central dos insetos, em especial o metabolismo da acetilcolina e canais iônicos (MATSUDA et al., 2001).

A presença da acetilcolina como neurotransmissor excitatório é característica em comum entre os e mamíferos e os insetos, no entanto, nos últimos ela está presente apenas a nível central, não estando relacionada com a função neuromuscular (GEPNER; HALL; SATTELLE, 1978), enquanto nos mamíferos ela está presente em todas as sinapses pré-ganglionares e nas sinapses pós-ganglionares do sistema parassimpático.

Após a liberação da acetilcolina na fenda sináptica e consequente interação com os receptores, o que desencadeia a propagação do estímulo nervoso, a acetilcolinesterase entra em ação, metabolizando a enzima e cessando sua ação. Dessa forma, o bloqueio da enzima, leva a um estímulo constante dos neurônios pós-ganglionares e manutenção do efeito excitatório, efeito esse incompatível com a vida, o que representa o efeito tóxico dos inibidores da acetilcolinesterase (WESTFALL; WESTFALL, 2012).

Porém, devido à similaridade estrutural da acetilcolinesterase de humanos e insetos, é possível que uma substância seja capaz de inibir ambas, mostrando-se tóxica tanto para mamíferos, quanto para os insetos. Estudos relatam uma média de 5 mil intoxicações por pesticidas no Brasil por ano, sendo que a maioria delas, acima de 60% se deve à intoxicação por inseticidas (REBELO et al., 2011). Entre essas intoxicações, prevalecem aquelas ocasionadas por tentativa de suicídio e exposição acidental ou ocupacional, acometendo principalmente indivíduos de áreas agrícolas, onde não há um atendimento especializado para o imediato reconhecimento dos sintomas e tratamento da intoxicação (NEVES; BELLINI, 2013).

É importante pontuar também que o uso crescente e disseminado de agrotóxicos nas lavouras do Brasil tem sido uma preocupação constante das autoridades de saúde. O movimento que busca uma alimentação livre dessas substâncias, ditos orgânicos, cresce a passos largos, tornando-se uma demanda da população e um importante setor para o investimento e crescimento da economia.

Diante desse cenário, é grande a importância da pesquisa por novas moléculas que possam fazer o controle efetivo da população de insetos nos mais diversos ambientes, no entanto, diante da quantidade de intoxicações propositais ou acidentais protagonizadas por essas substâncias, é necessário que também se busquem alternativas mais seguras, protegendo a população dos efeitos nocivos à sua saúde.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A importância do *docking* molecular na descoberta de substâncias de interesse biológico

A história dos medicamentos é quase tão antiga quanto a história da humanidade. No princípio, o tratamento de doenças estava quase sempre envolvido com questões religiosas e divindades e consistiam basicamente no uso de substâncias de origem animal e vegetal. No entanto com o desenvolvimento da ciência, e conseqüentemente do conhecimento sobre as estruturas químicas e suas aplicações, o cenário sobre o desenvolvimento de medicamentos e produtos para a saúde mudou radicalmente.

Inicialmente, a descoberta de novos fármacos e substâncias potencialmente úteis para a saúde era feita ao acaso, como foi o caso de Fleming ao descobrir a penicilina, em 1929, a partir da contaminação de uma cultura de estafilococos por fungos do gênero *Penicillium*. Esse processo, no entanto, deu lugar a descoberta de fármacos por triagem empírica, quando uma substância é submetida a vários ensaios biológicos, aleatoriamente, sem um método científico apropriado. Perduram ainda, até os dias atuais, descobertas de fármacos a partir da extração de fontes naturais, quase sempre tendo como ponto de partida a medicina popular (SILVA; ALVES; PRADO, 2006).

Com o advento e a consolidação da síntese orgânica, novas abordagens na introdução de fármacos, com critérios mais racionais e científicos, foram introduzidas, como a modificação molecular, onde uma substância química com atividade já conhecida passa por modificações em sua estrutura a fim de potencializar sua atividade (SILVA; ALVES; PRADO, 2006). É nesse contexto que a química computacional ganha importância.

A partir da introdução de novos conceitos, como o modelo de chave-fechadura proposto por Fischer, que trouxe evidências que os processos biológicos são majoritariamente coordenados por proteínas, que ao interagir com um molécula, exógena ou endógena, desencadeia ou bloqueia uma resposta celular, promovendo um efeito no organismo (BLUMENTHAL; GARRISON, 2012) e da decodificação do genoma humano, da cristalografia, da purificação de proteínas e de métodos mais precisos e específicos para identificar e purificar substâncias, a identificação de alvos biológicos e a manipulação de estruturas químicas se tornou possível e viável (MENG et al., 2011).

O crescimento da rede internacional de computadores e a popularização da informática permitiu a criação de bases de dados onde a representação de estruturas químicas de potenciais alvos biológicos sejam depositadas e utilizadas por grupos de pesquisa ao redor do globo.

O *docking* molecular objetiva prever a estrutura de uma molécula ligante no interior do sítio ativo da proteína alvo, estimando assim a existência e a força dessas ligações. Essas ligações podem ser do tipo eletrostáticas, pontes de hidrogênio, hidrofóbicas, entre outras. É um processo que ganhou bastante evidência, principalmente por apresentar as vantagens de ser bastante confiável e mais barato que os métodos tradicionais de triagem empírica (MENG et al., 2011; YURIEV; RAMSLAND, 2013).

Para esse fim, diversos *softwares* já foram desenvolvidos, dentre eles, o GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*), que utiliza algoritmos genéticos, respaldados na teoria evolucionista, para avaliar a conformação tridimensional mais favorável das enzimas e ligantes e assim estabelecer as interações possíveis entre elas (CHANDAK et al., 2014).

Sendo assim, a química computacional tem assumido um importante papel na pesquisa de substâncias com propriedades interessantes às ciências farmacêuticas, por possibilitar um processo mais racional para a prospecção de fármacos, otimizando o tempo e o investimento da indústria.

2.2 Considerações sobre o *benzilidenomalononitril* e seus derivados

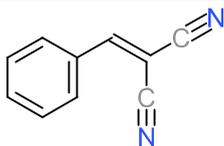
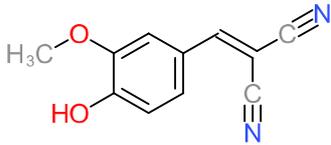
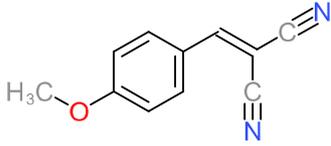
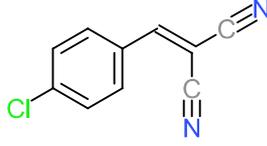
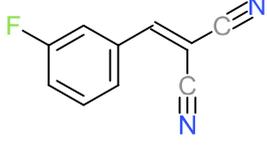
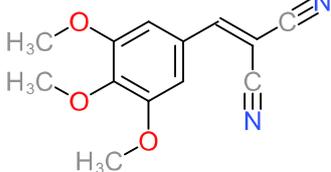
O benzilidenomalononitril, ou 2-benzilidenomalononitril, é um composto orgânico de com estrutura formada por um anel benzênico, ligado a uma cadeia alifática de três carbonos, com uma ligação dupla na posição dois, ou seja, um propeno, e com dois radicais cianeto ligado ao último carbono do hidrocarboneto.

É representado pela fórmula $C_{10}H_6N_2$, e se apresenta como um pó branco a levemente amarelado, tem ponto de fusão que varia entre 83 e 85°C e de ebulição, entre 120 e 125°C e sua massa molecular é de 154,172g/mol, além de possuir área de superfície polar (PSA) de 46,7 Å², caracterizando-se assim uma substância polar (NCBI, 2018). Essa polaridade confere a ele uma possibilidade de penetrar em barreiras biológicas, incluindo as barreiras do sistema nervoso central, uma vez que substâncias com PSA inferior a 90 Å² tendem a penetrar nessa matriz mais facilmente (PAJOUHESH; LENZ, 2005).

É uma substância de síntese conhecida, empregando a condensação de Knoevenagel, que utiliza aldeídos aromáticos e malononitril, na presença de catalisadores (REN; CAO; TONG, 2002). O emprego de aldeídos com diferentes substituições nas posições dos anéis

aromáticos, dão origem a diferentes compostos, o que pode modificar a sua atividade biológica, conferindo a essa molécula bastante versatilidade, portanto, como por exemplo, os compostos empregados na realização desse trabalho, expostos na tabela abaixo.

Tabela 1 - Estrutura química e identificação das substâncias utilizadas

Estrutura	Nomenclatura
	2-benzilidenomalononitril (1a)
	2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitril (1b)
	2-(4-metoxibenzilideno)malononitril (1c)
	2-(4-clorobenzilideno)malononitril (1d)
	2-(4-fluorobenzilideno)malononitril (1e)
	2-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)malononitril (1f)

Fonte: o autor

Os compostos derivados de benzilidenomalononitril tem chamado a atenção da comunidade científica há bastante tempo. Já no início dos anos 90, compostos derivados do benzilidenomalononitril, chamados tirfostinas, demonstraram atividade inibidora da proteína tirosina quinase (GAZIT et al., 1989), aparecendo assim como promissores compostos no combate a neoplasias (LEVITIZKI; MISCHANI, 2006). Esses compostos também já mostraram potencial na proteção das células neuronais contra o estresse oxidativo (SAGARA et al., 2002), na supressão farmacológica do choque séptico (NOVOGRODSKY et al., 1994),

na proteção de danos celulares causados por quimioterapia (NOVOGRODSKY et al.,1998), entre outros.

Como já foi pontuado, a diversidade de compostos que podem ser produzidos a partir das substituições nas diversas posições do anel benzênico do composto em estudo, podem interferir significativamente na resposta biológica de seus derivados, resultado em atividade e/ou toxicidade maior ou menor (TURPAEV; DRAPIER, 2011).

Dessa forma, é possível observar que o benzilidenomalononitril é uma substância extremamente versátil, com atividades biológicas já relatadas anteriormente e com síntese descrita em literatura, no entanto, o estudo de suas atividades terapêuticas e tóxicas ainda são pouco numerosas e reduzidas a poucos grupos de pesquisa, o que torna a ele e a seus derivados alvos extremamente promissores para estudos nas mais diversas áreas da proteção, promoção e recuperação da saúde.

2.3 *Periplaneta americana*: características e comportamento

A *Periplaneta americana*, conhecida popularmente como barata doméstica ou barata-marrom, é um inseto distribuído amplamente por vários territórios ao redor do mundo e é considerada um animal sinantrópico nocivo, uma vez que está bem adaptada à vida próximo aos humanos, interagindo com eles e causando-lhes uma série de transtornos significativos na ordem econômica ou ambiental e representando riscos significativos à saúde (IBAMA, 2006).

Os registros fósseis indicam que os blatódeos foram os principais habitantes do planeta no período Carbonífero, há cerca de 200 e 350 milhões de anos, o que o levou a ser conhecido como “Era das baratas” (VIANNA; BERNE; BERNE, 2001), e esses animais tiveram poucas modificações na sua estrutura, o que leva muitos autores a considera-los “fósseis vivos”.

Taxonomicamente, as baratas estão inseridas no reino animal, filo *arthropoda*, classe insecta, ordem *Dictyoptera*, sub-ordem *Blattaria* e família *Blattidae*, que compreende entre 3 e 4 mil espécies, aproximadamente. No entanto, existem cinco espécies mais comuns no ambiente peridomiciliar: *Supella longipalpa* (barata da faixa marrom), *Blatta orientalis* (barata oriental), *Periplaneta australasiae* (barata australiana), *Blatella germanica* (barata alemã) e *Periplaneta americana* (barata americana), sendo as duas últimas mais comuns no Brasil.

De fato, em metanálise realizada por Nasirian (2017), foi apontado que a média de infestação por baratas em hospitais de todo o mundo foi de 68,6%, enquanto em ambiente domiciliar foi de 50,3%. Esse mesmo estudo aponta que a *Periplaneta americana* estava presente em 64,7% dos lares estudados e em 38,2% dos hospitais. É importante considerar que

as baratas, e a *P. americana* em especial, são mais distribuídos em locais quentes e úmidos, tendo preferência por zonas tropicais, em detrimento das temperadas. Em estudo conduzido em ambientes residenciais, comerciais e educacionais de uma grande capital da Amazônia brasileira, foi apontada a presença da barata americana em 83% deles (RAFAEL; SILVA; DIAS, 2008), o que demonstra a grande distribuição desse inseto nos diversos ambientes da nossa região.

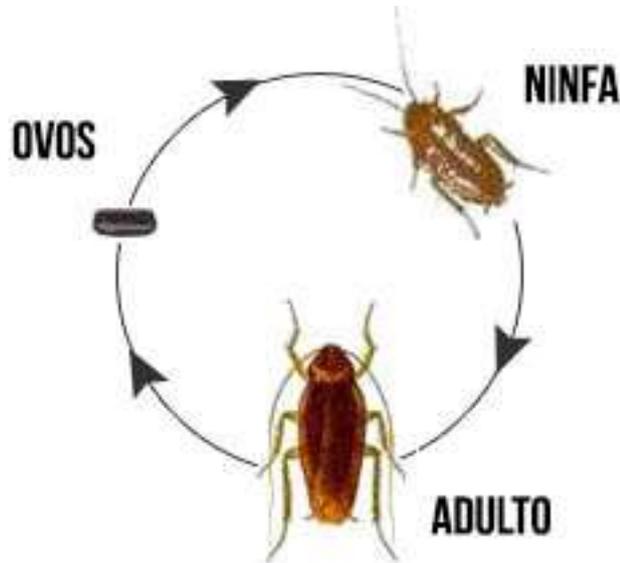
Essa ampla distribuição e possibilidade de causar grandes infestações podem ser atribuídas ao fato que as baratas podem se alimentar de uma grande variedade de fontes, incluindo aquelas que servem de alimentos para os seres humanos. Suas fontes de nutrição incluem diversas matrizes orgânicas, incluindo aquelas em decomposição, passando por papel, madeira, roupas e até restos de outros insetos, incluindo outras baratas (BARBARA, 2000; COCHRAN et al., 1999). Associado a isso, elas têm uma necessidade de água reduzida, tornando-se capazes de se adaptar aos diversos tipos de ambientes, conseguindo extrair deles os nutrientes suficientes para sua vida e reprodução.

A *Periplaneta americana* é um dos maiores insetos que colonizam o ambiente domiciliar e peridomiciliar, tem um tamanho de 35 a 40mm, quando adulto. O corpo é amarronzado, simétrico bilateralmente, dividido metamericamente e revestido por um exoesqueleto composto majoritariamente pelo polissacarídeo quitina, que tem função de evitar a perda de água, dar forma e rigidez ao inseto e protegê-lo de predadores. É dividido em três partes: cabeça, que contém os ocelos (órgão sensoriais da visão), a boca (com aparelho do tipo mastigador), e as antenas filiformes (responsáveis pelo olfato e senso de movimentação), tórax, de onde saem três pares de pernas e dois pares de asas, e abdome, que compreende anus e cercos (CAMERON, 1961; BARBARA 2000; COCHRAN et al., 1999).

Conforme ilustrado na Figura 1 (pag. 19), a barata tem um ciclo de vida hemimetábolo, ou com metamorfose incompleta, que se inicia com o depósito de uma ooteca. A ooteca é uma espécie de bolsa rígida marrom gerada após a fecundação e carregada pela fêmea até ser deposta num ambiente com temperatura, umidade e suprimentos necessários para o desenvolvimento dos insetos, cumpre a função de proteger os ovos das agressões físicas do ambiente e também da perda excessiva de água, contém cerca de dezesseis ovos, dispostos em duas fileiras de oito. Após um período de 30 a 60 dias de incubação, cada ovo dará origem a uma ninfa idêntica ao inseto adulto, porém ainda sem maturidade sexual e desprovida de asas. Após uma série de trocas de exoesqueleto, chamadas de muda, a ninfa se transforma no inseto adulto, chamado de imago, que é dotado de asas e maturidade sexual. Uma fêmea põe cerca de 4 a 8 ootecas durante a sua vida, o período de desenvolvimento, da eclosão do ovo até a vida adulta, se completa entre

12 a 18 meses e cada barata adulta vive entre um e dois anos (CAMERON, 1961; BARBARA 2000; COCHRAN et al, 1999).

Figura 1 - Ciclo de vida da *P. americana*, ilustrando os estágios de ooteca, ninfa e adulto



Fonte: Termitek Uniprag

As baratas vivem em associação com os humanos e geralmente formam colônias, como tem preferência por locais úmidos, com alta temperatura e baixa luminosidade, tendem a se esconder durante o dia em frestas, rachaduras, móveis, banheiros, sótãos, porões, esgoto, latrinas e até eletrodomésticos. À noite eles saem em busca de alimento, e é nesse momento que podem interagir com os seres humanos, roupas de cama, vestimentas, utensílios domésticos, etc. (BEHBEHANI, 1997; COCHRAN et al., 1999).

Diante dessa reprodução acelerada e dos seus hábitos que proporcionam grande adaptação a diversos ambientes, as baratas podem facilmente causar infestações e comprometer uma série de atividades essenciais à vida humana. Apesar de representar alguns benefícios à sociedade por serem importantes agentes na decomposição de matéria orgânica, as baratas são também responsáveis por diversos efeitos nocivos para os humanos. São importantes vetores mecânicos de uma série de bactérias, vírus, protozoários e helmintos, podendo carregá-los em seu corpo ou depositá-los juntos com as suas fezes, contaminando alimentos, fômites, cobertas e lençóis, móveis, entre outros objetos, podendo levar esses organismos patogênicos ao contato com os seres humanos e assim, causar-lhes doenças (CORNWELL et al., 1968).

De fato, um estudo realizado em um grande hospital brasileiro reportou o isolamento de uma média de 1 a 3 microrganismos patogênicos isolados por barata encontrada nas dependências da unidade de saúde, incluindo bactérias da família *Enterobacteriaceae*, bacilos gram negativos e esporos e filamentos de fungos (PRADO et al., 2006). No que diz respeito à área peridomiciliar, existem relatos de ovos e larvas de diversos helmintos e protozoários presos ao corpo de espécimes desses insetos capturados dentro e no entorno de residências, incluindo ovos de espécies da família *Ascaridae*, *Oxiurydae*, *Nematoda*, *Coccidea*, *Trichuris*, *Entamoeba* outros (THYSSEN et al., 2004; OYEYEMI; AGBAJE; OKELUE, 2002).

Esses animais também estão relacionados com diversos tipos de alergias principalmente dermatite e alergias respiratórias, comumente associadas a exposição ocupacional e principalmente intradomiciliar (GORE; SCHAL, 2007). A lista oficial da OMS compreende nove substâncias provenientes da *Periplaneta americana* capazes de causar alergias (OMS, 2006) e essas substâncias são provenientes de praticamente todas as partes das baratas, como saliva, fezes, ooteca, secreções e até dos restos mortais (KATIAL, 2003). Estudo realizado em uma capital brasileira relata que 27,6% das crianças asmáticas testadas apontaram alergia a substâncias produzidas pelas *P. americana* (LOPES; MIRANDA; SARINHO, 2006). Nos Estados Unidos, estudos incluem as baratas como uma das oito principais causas de surgimento ou exacerbação da asma e 26% da população americana é sensível às substâncias produzidas por esse animal (ARBES et al., 2005).

Dessa forma, o manejo da alergia e o controle da população de baratas nas áreas domiciliares e peridomiciliares é de extrema relevância e dados disponíveis nos mostram que uma intervenção isolada é capaz de reduzir a morbidade por asma em crianças, tornando qualquer esforço no sentido de diminuir a exposição dessa população às baratas importante para a saúde pública e para a qualidade de vida das famílias (RABITO et al., 2016).

Dessa forma, é de extrema relevância a pesquisa no sentido de identificar novas substâncias capazes de fazer o controle das populações de *Periplaneta americana* nas áreas urbanas, apresentando para a população um meio seguro e eficaz, que não comprometa a saúde ou atividades econômicas da sociedade.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar *in silico* o potencial e o efeito repelente e biocida de derivados do benzilidenomalononitril frente a *Periplaneta americana* (barata doméstica);

3.2 Específicos

- Estimar a relação estrutura-atividade (REA) de seis derivados do benzilidenomalononitril como inseticida frente a um modelo computacional de acetilcolinesterase de insetos;
- Submeter as substâncias a testes de toxicidade a fim de selecionar aquelas com maior potencial biocida;
- Testar a repelência de derivados selecionados do benzilidenomalononitril frente a *Periplaneta americana*;
- Analisar o efeito biocida de derivados selecionados do benzilidenomalononitril frente a *Periplaneta americana*;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais utilizados

Exemplares da espécie *Periplaneta americana* foram coletados em áreas domiciliares e peridomiciliares no município de Macapá – AP, utilizando armadilhas que foram estrategicamente dispostas em locais com maior possibilidade de circulação desses insetos, como cozinhas, depósitos e cisternas abandonadas. A armadilha consistia em frascos de vidros, com parafina na borda e alimento no seu interior, como açúcar, bolachas e arroz cozido.

Os animais coletados foram levados para o laboratório e mantidos em isolamento por sete dias. Após esse período, foram transferidos para uma caixa plástica de 30L, onde foram mantidos a temperatura de entre 23 e 27°C e umidade relativa entre 50 e 70%. Foram usadas caixas de papelão, empregadas comercialmente na embalagem de ovos, como abrigo e fornecido ração para cães adultos como alimento e água por meio de pedaços de legumes.

Figura 2 - Caixa plástica usada para a criação das baratas em laboratório.



Fonte: o autor

4.2 Substâncias testadas

As substâncias utilizadas nesse trabalho foram sintetizadas e fornecidas pelo Laboratório de Biocatálise e Biotransformação em Química Orgânica (BIORG) da Universidade Federal do Amapá. Para a síntese, foi utilizada a condensação de *Knoevenagel*, utilizando o aldeído aromático apropriado e o malononitril, comercializados pela Sigma-Aldrich. Foram sintetizadas seis moléculas, cujas estrutura química e nomenclatura estão expostas na Tabela 1, e a sua elucidação estrutural foi feita a partir dos dados abaixo.

2-benzilidenomalononitril (1a): Fórmula Molecular: $C_{10}H_6N_2$; PM: 154.05 g/mol; Sólido Branco; P.F. 85 °C; Rendimento: 0.461 g (99%); 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 7.92 (m, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.64 (m, 1H), 7.54 (m, 2H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 159.9, 134.6, 130.8, 129.6, 113.6, 112.5, 82.7; IV (KBr, cm^{-1}): 3032, 2224, 1683, 756, 677; EM (70 eV, %): m/z 154 (100), 127 (90), 103 (60).

2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitril (1b): Fórmula Molecular: $C_{11}H_8N_2O_2$; PM: 200.02 g/mol; Sólido Branco; P.F. 136 °C; Rendimento: 0.504 g (84%); 1H RMN (500 MHz, CD_3OD , ppm): δ 7.94 (s, 1H), 7.57- 7.56 (d, 1H, $J=2.5$ Hz), 7.43 (m, 1H), 7.07 (d, 1H, $J= 8.5$ Hz), 3.95 (s, 3H). ^{13}C RMN (126 MHz, CD_3OD , ppm): 159.76, 153.71, 146.92, 126.05, 124.67, 115.22, 114.45, 113.38, 111.19, 76.87, 55.05; IV (KBr, cm^{-1}): 3427, 3022, 2976, 2225, 226, 1026. EM (70 eV, %): m/z 200 (100), 157 (95), 129 (29), 102 (50).

2-(4-metoxibenzilideno)malononitril (1c): Fórmula Molecular: $C_{11}H_8N_2O$; PM: 184.06 g/mol; sólido amarelo; P.F. 122 °C; Rendimento 0.480 g (84%); 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 7.88 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.63 (s, 1H), 7.0 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 3.89 (s, 3H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$, ppm): 164.72, 158.75, 133.14, 123.24, 114.80, 114.05, 112.84, 78.69, 55.69 ; IV (KBr, cm^{-1}): 3026, 2986, 2221, 1605; EM (70 eV, %): m/z 184 (100), 161 (13), 141 (25), 114 (42).

2-(4-clorobenzilideno)malononitril (1d): Fórmula Molecular: $C_{10}H_5ClN_2$; PM: 188.01 g/mol; Sólido Branco; P.F. 176 °C; Rendimento 0.4455 g (79%); 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 7.88-7.85 (d, $J= 8.5$ Hz, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.55-7.52 (d, $J=8.5$ Hz, 2H); ^{13}C RMN (126 MHz, $CDCl_3$, ppm): 158.26, 141.15, 131.83, 130.07, 129.27, 113.42, 112.32, 83.37; IV (KBr, cm^{-1}): 3095, 3032, 2225, 1683, 827. EM (70 eV, %): m/z 188 (71), 153 (100).

2-(4-fluorobenzilideno)malononitril (1e): Fórmula Molecular: $C_{10}H_5FN_2$; PM: 172.04 g/mol; Sólido Branco; P.F. 135 °C; Rendimento 0.4128 g (80%); 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 7.98-7.96 (m, 2H), 7.75 (s, H), 7.27-7.23 (m, 2H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$, ppm): 166.11 (d, $1J_{C-F}=207$ Hz), 157.98, 133.37, 127.18, 117.18, 113.40, 112.22, 82.05; IV (KBr, cm^{-1}): 3074, 3041, 2229, 1508. EM (70 eV, %): m/z 172 (100), 145 (96), 121 (54).

2-(3,4,5- trimetoxibenzilideno)malononitril (**1f**): Fórmula Molecular: C₁₃H₁₂N₂O₃; PM: 244.08 g/mol; Sólido amarelo; P.F. 148 °C; Rendimento: 0.724 g (99%); 1H RMN (500 MHz, CDCl₃, ppm): 7.63 (t, *J*=0.5 Hz, 1H), 7.24 (s, 2H), 7.17 (d, *J*=0.5 Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.89 (s, 6H). 13C RMN (126 MHz, CDCl₃, ppm): 159.32, 153.35, 144.03, 125.89, 113.94, 113.15, 108.31, 80.59, 61.21, 56.34, 29.66.; IV (KBr, cm⁻¹): 3018, 2220, 1504, 1257, 1041. EM (70 eV, %): *m/z* 244 (100), 229 (74), 201 (37), 186 (21), 158 (32), 115 (32).

4.3 Emprego do *docking* molecular na seleção das substâncias

Para esse teste, foi utilizado como molécula-alvo a enzima acetilcolinesterase de *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta), complexada com o ligante 1,2,3,4- tetrahydro-*N*-(3-iodofenilmetil)-9-acridinamina, depositada no *Protein Data Bank* (PDB) no *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* sob código 1QON, na resolução de 2,72Å (HAREL et al., 2000).

As moléculas estudadas foram reproduzidas utilizando o *software* ChemSketch 12.0 e depois otimizadas utilizando o *software* Gaussian 5.0. Após a otimização, o *docking* foi realizado utilizando o programa GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*), seguindo o seguinte procedimento: utilizando o arquivo no formato .pdb, foram adicionados os átomos de hidrogênio e retiradas moléculas de água da enzima, com a posterior extração dos ligantes complexados. Após esse processo, foi realizada a validação do *docking* através do cálculo de RMSD (*Root-Mean-Square Deviation*). Para a realização do *docking*, foi utilizado as seguintes coordenadas da enzima: X= 33.28, Y= 67.11 e Z= 10.16.

Para a finalização do teste, foi identificado o sítio catalítico da enzima, que compreendia os aminoácidos PHE330, TYR370, HIS480, TRP472, TRP83, GLY149 e TYR71 (HAREL et al., 2000), que foram testados para a ocorrência de ligações intermoleculares com os derivados de benzilidenomalononitril.

4.4 Triagem

A triagem foi realizada com as substâncias selecionadas no *screening* virtual e foi feita utilizando duas baratas adultas, empregando o teste conforme estabelecido para o teste de toxicidade: as baratas foram colocadas em contato com 5mg da substância teste durante 20 minutos, e após esse período foram retornadas mantidas em um pote plástico com ração e

pedaços de legumes, de onde elas poderiam extrair água, e foram observadas por um período de 72h após o encerramento do contato com a substância. O teste foi aplicado em quatro repetições, e as substâncias que apresentaram alguma mortalidade foram selecionadas para a aplicação dos testes posteriores.

4.5 Teste de repelência

Para esse teste, foram utilizadas ninfas reproduzidas em laboratório, com idade entre 3 e 4 meses, mantidas nas mesmas condições que as descritas anteriormente. Cada grupo foi composto por 5 ninfas e o experimento foi realizado com 3 grupos para cada concentração da substância-teste, conforme sugerido por Gomes et al. (2014).

Inicialmente, foi preparada uma solução-mãe na concentração de 1mg/ml de cada substância, usando álcool etílico 92% como veículo. Posteriormente, um papel filtro foi cortado ao meio, sendo que metade dele foi impregnado somente com o veículo e a outra com uma solução da substância teste na concentração de 125, 250 e 500 µg/ml (p/v). Esse papel filtro foi colocado a temperatura ambiente por três horas a fim de evaporar todo o solvente e em seguida, foi disposto sobre o fundo de uma placa de Petri de modo a cobrir toda a sua superfície. As ninfas foram, então, dispostas sobre o papel filtro, conforme mostra a Figura 3 (pag. 26), e foram feitas quatro observações, sendo a primeira após uma hora de experimento, e as demais, de hora em hora, até a quarta hora. Nessas observações foi verificada a quantidade de insetos no lado teste (contendo a substância diluída) e no lado controle (contendo apenas o veículo).

Para a determinação do efeito repelente foi aplicada a seguinte fórmula, conforme sugerido por Procópio et al. (2013): $IP = (\%IPT - \%IPC) / (\%IPT + \%IPC)$, onde IP é o índice de preferência, %IPT é a percentagem de insetos sobre o papel teste e %IPC é a percentagem de insetos sobre o papel controle.

Para fim de interpretação dos resultados, foi adotado o seguinte score: IP entre -1,00 e -0,10 significa substância repelente, IP entre -0,10 e +0,10 significa substância neutra e IP entre +0,10 e +1,00 significa substância atraente.

Figura 3 - Teste de repelência, contendo as ninfas sobre o papel filtro.



Fonte: o autor.

4.6 Teste da atividade biocida

O trabalho foi realizado conforme metodologia sugerida no Manual de Protocolos para testes de eficácia de produtos desinfestantes (ANVISA, 2004) e as substâncias-teste foram fornecidas pelo laboratório de biocatálise e biotransformação em química orgânica (BIORG) da Universidade Federal do Amapá.

Foram utilizados exemplares de *P. americana* reproduzidos em laboratório, adultos de ambos os sexos, mantidos em recipientes plásticos sob temperatura e umidade controlados (entre 23 e 27°C e entre 50 e 70%, respectivamente), alimentados com dieta animal (ração para caninos adultos) e água.

Os animais foram transferidos para frascos plásticos de 9,5cm de diâmetro e 4,5cm de altura, e mantidos em jejum por pelo menos 12h antes do experimento. Após esse período, os frascos foram virados sobre um azulejo (15 x 15cm), contendo a substância-teste nas doses de 15mg, 40 mg e 65 mg, sendo mantidos em contato com a substância por 20 minutos. Passado esse período, os insetos foram novamente transferidos para os frascos plásticos, a fim de cessar o contato com a substância, e foi oferecido alimento e água. A observação dos insetos foi mantida por 72h após o encerramento do contato com a substância. Os insetos foram considerados mortos caso não fosse observado nenhum movimento de nenhum dos seus apêndices por 3 segundos consecutivos, após a estimulação.

Esse protocolo foi repetido quatro vezes para cada dose da substância-teste, além do controle.

Figura 4 - Teste da atividade biocida, contendo as baratas sobre a substância-teste.



Fonte: o autor.

4.7 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância com delineamento inteiramente casualizado. Na hipótese de terem sido observadas diferenças significativas superiores a 5%, foi aplicado um teste de médias de Tukey. Para a análise estatística foi utilizado o *software* Prism 6. Os resultados foram expostos na forma de média \pm desvio padrão da média.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *docking* molecular é um método amplamente usado a fim de determinar a afinidade entre uma substância de interesse e uma enzima, podendo prever a afinidade daquela no sítio de ligação dessa. O programa GOLD tem sido bastante utilizado com a finalidade de investigar as formas de interação entre essas moléculas e alvos terapêuticos conhecidos (CHANDAK et al., 2014).

O RMSD (*Root Mean Square Deviation*) é uma importante variável para determinar a acurácia do *docking* molecular, e valores abaixo de 2 Å são considerados bem sucedidos, indicando a validade do processo (COLE et al., 2005). Nesse trabalho, o menor valor de RMSD com o ligante 1,2,3,4- tetrahydro-*N*-(3-iodofenilmetil)-9-acridinamina foi de 0,42 Å, o que permite avaliações e inferências posteriores.

Após a extração do ligante do sítio de ligação da acetilcolinesterase, foi realizado o *docking* das substâncias 1a a 1f, selecionando os resultados com os melhores scores, a saber: 54.52 para a 1a, 61.16 para 1b, 61.29 para 1c, 56.00 para 1d, 58.67 para 1e e 65.22 para 1f. Esses scores são valores quantitativos gerados pelo *software* a fim de estabelecer um *ranking* entre as possíveis conformações da molécula (chamada de pose) dentro do sítio ativo. Quanto maior o seu valor, mais favorável é a conformação da molécula, portanto, usualmente a conformação de maior score é a escolhida para avaliar a existência de interações entre a substância de interesse e o alvo.

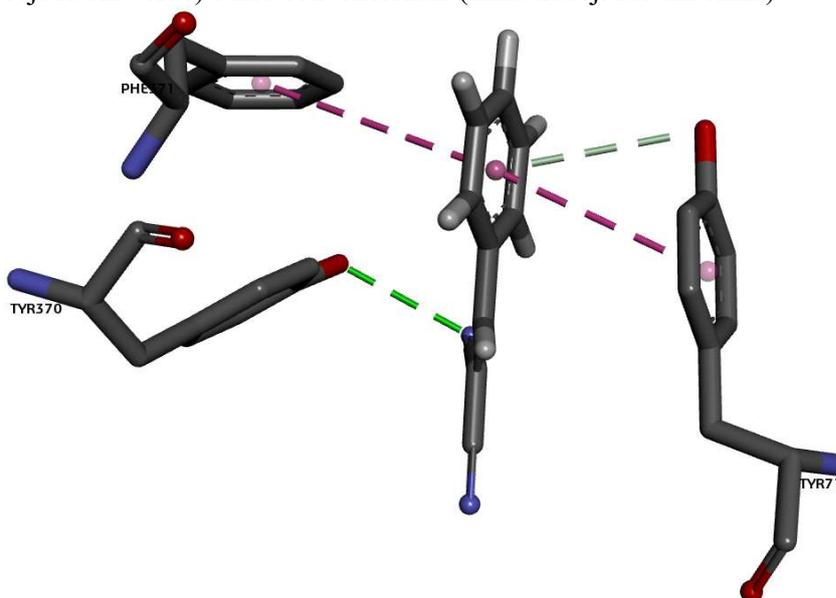
Para fim de melhor visualização dos resultados do *docking*, em todas as figuras, foram mantidas apenas aqueles aminoácidos do sítio ativo com os quais foi possível observar alguma interação.

No *docking* da substância 1a, foi possível observar a formação de duas interações hidrofóbicas do tipo Pi-Pi, que são aquelas estabelecidas entre sistemas cíclicos planos compostos por átomos híbridos sp^2 , incluindo anéis aromáticos, e devem cumprir os seguintes requisitos: a) a distância entre o centroide de cada par de anéis de Pi devem distar, no máximo, 6 Å b) um átomo de cada anel devem estar a uma distância máxima de 4,5 Å e c) o ângulo entre o normal de um ou ambos os anéis envolvidos e o vetor centroide-centroide deve estar entre 0° e 50°, e o ângulo entre o normal de cada anel deve medir entre 0° e 35°, para as ligações do tipo *stacked* e entre 0° e 30° e 0° e 55°, respectivamente, para as ligações do tipo *T-shaped* (MCGAUGHEY; GAGNÉ; RAPPÉ, 1998).

Para essa substância, observa-se uma interação hidrofóbica Pi-Pi do tipo *stacked* entre o anel aromático da substância 1a e o anel do aminoácido TYR71 medindo 4,36 Å e uma do tipo *T-shaped* entre o anel de 1a e o anel da PHE371, medindo 5,27 Å.

Ainda sobre o *docking* de 1a, também foram observadas interações do tipo ponte de hidrogênio. Essas ligações, convencionalmente, são estabelecidas entre átomos receptores e doadores, como Nitrogênio, Oxigênio, Fósforo e Enxofre e admitem uma distância entre o doador e o receptor de até 3,4 Å (BISSANTZ; KUHN; STAHL, 2010). Essas ligações podem existir de forma não-convencional, como a ligação Pi-doador, onde o anel aromático funciona como acceptor dessa interação. A ligação não-convencional é considerada mais fraca, admitindo uma distância entre o halogênio e o anel aromático de até 4,2 Å (BISSANTZ; KUHN; STAHL, 2010). A ligação de hidrogênio convencional encontrada foi estabelecida entre a hidroxila da TYR370 e o nitrogênio do 2-benzilidenomalononitril (1a), distando 3,07 Å. Já a ligação de hidrogênio do tipo não convencional do tipo Pi-doador, foi estabelecida entre o anel aromático do 2-benzilidenomalononitril (1a) e a hidroxila da TYR71 e media 3,95 Å, conforme mostra a figura 5.

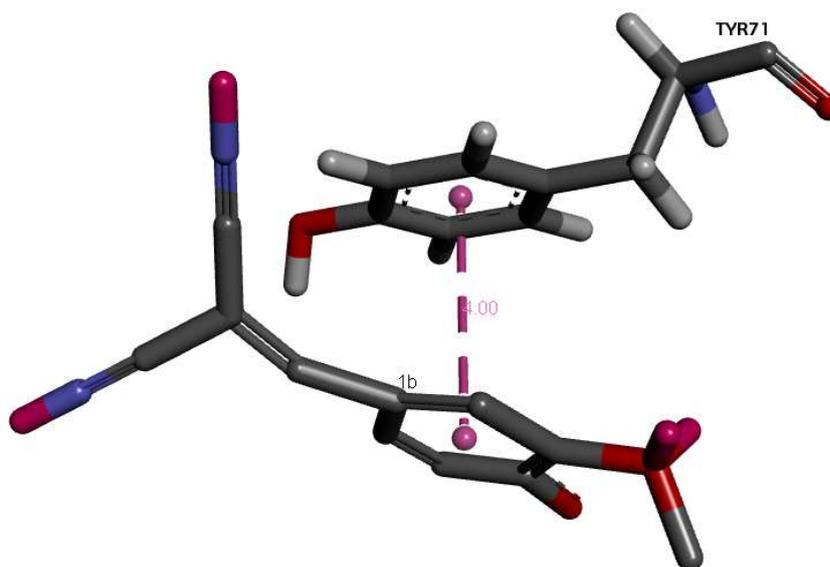
Figura 5 - Resultado do *docking* molecular da substância 1a (no centro), mostrando as interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa) e as pontes de hidrogênio convencionais (linha tracejada em verde) e não convencionais (linha tracejadas em cinza).



Fonte: o autor.

A substância 1b, 2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitril, foi a que menos apresentou ligações com a acetilcolinesterase, demonstrando apenas uma ligação do hidrofóbica tipo Pi-Pi *Stacked*, medindo 4,00 Å (Figura 6). Grupos hidrofóbicos são a séries de átomos contíguos que não são adjacentes a concentrações de carga, como um átomo carregado ou eletronegativo, e tem área de superfície igual a de um radical metil multiplicado pela área de superfície de um átomo de Cloro (WOLBER; LANGER, 2005).

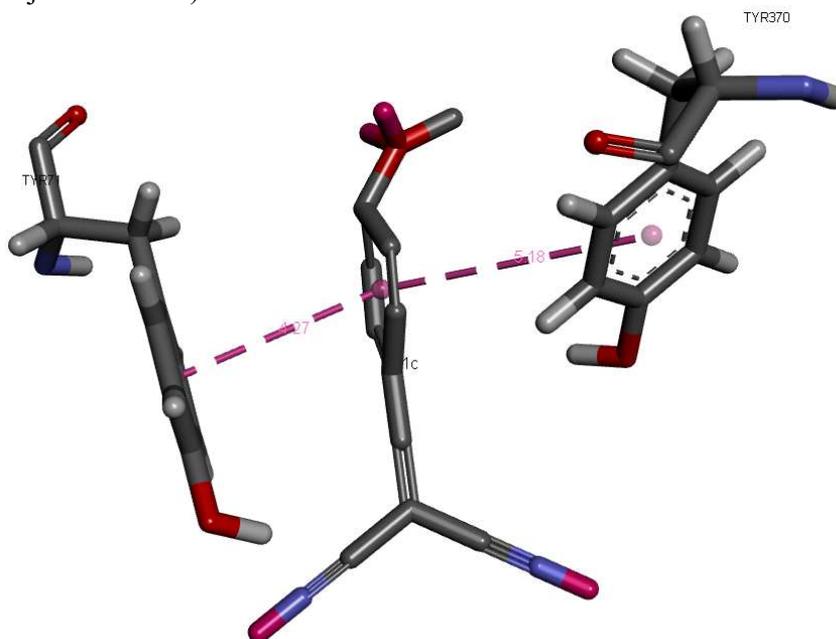
Figura 6 - Docking da substância 1b (abaixo), mostrando a interação hidrofóbica (linha tracejada em rosa).



Fonte: o autor.

A substância 1c, 2-(4-metoxibenzilideno)malononitril, apresentou duas ligações hidrofóbicas Pi-Pi, uma do tipo *stacked*, entre os anéis aromáticos da substância testada e a TYR71, medindo 4,27 Å, e uma do tipo *T-shaped* entre a 1c e a TYR370, medindo 5,18 Å (Figura 7, pag. 31).

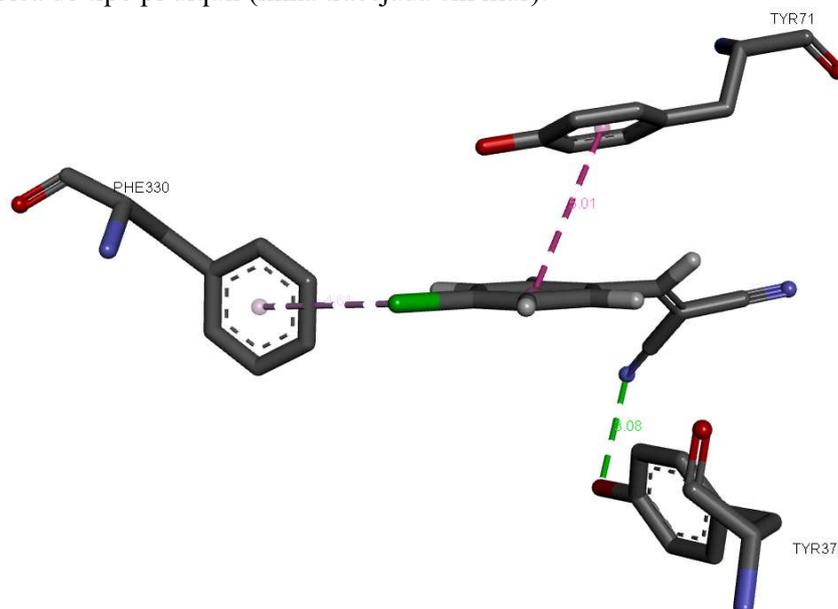
Figura 7 - *Docking* da substância 1c (ao centro), mostrando as interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa).



Fonte: o autor.

O *docking* da 2-(4-clorobenzilideno)malononitril (1d), apresentou três interações de tipos diferentes (Figura 8, pag. 32): uma do tipo Pi-Pi *stacked* com a TYR71, medindo 5,01 Å, uma ponte de hidrogênio convencional, entre o nitrogênio da substância testada e a hidroxila da TYR370, distando 3,08 Å, e uma do hidrofóbica tipo Pi-alquil entre o cloro da 1d e o anel aromático da PHE330, com distância igual a 4,61 Å. Essa última ligação ocorre quando um grupo alquil, que é definido como um grupo não polarizado e do tipo não-Pi, geralmente associado a cadeias laterais de aminoácidos, interage com um grupo Pi, admitindo uma distância de 5,5 Å.

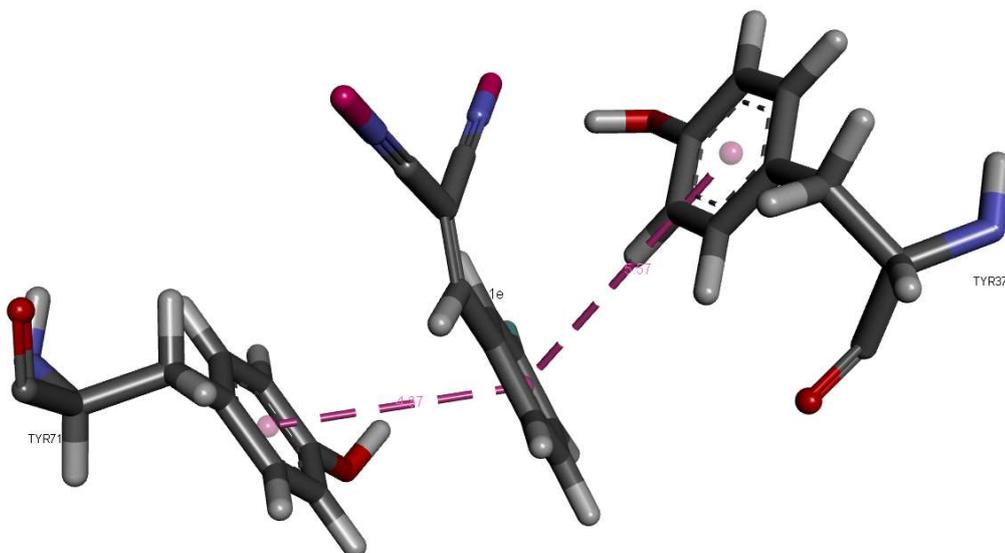
Figura 8 - *Docking* da substância 1d (ao centro), mostrando a interações hidrofóbicas Pi-Pi (linha tracejada em rosa), a ponte de hidrogênio convencional (linha tracejada em verde) e a ligação hidrofóbica do tipo pi-alkil (linha tracejada em lilás).



Fonte: o autor.

Sobre a substância 1e, 2-(4-fluorobenzilideno)malononitril, foram encontradas duas interações hidrofóbicas do tipo Pi-Pi, sendo uma *T-shaped* com a TYR71, medindo 4,37 Å, e outra do tipo *stacked* com a TYR370, medindo 5,57 Å (Figura 9, pag. 33).

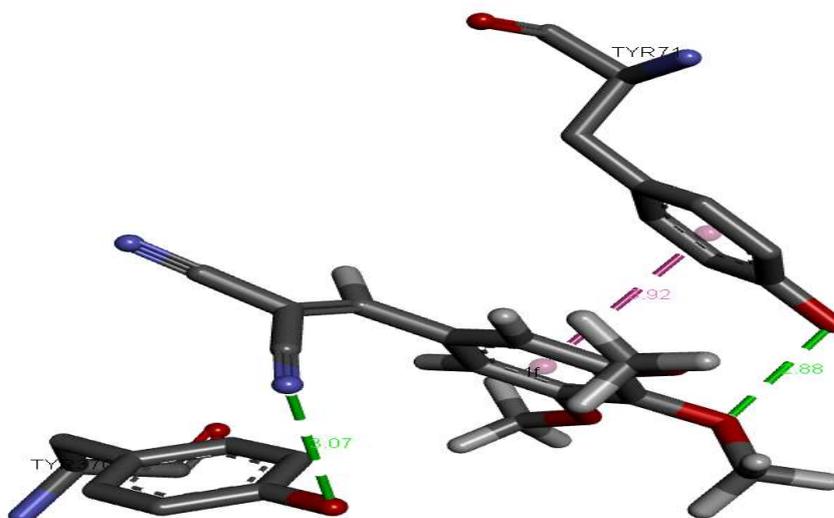
Figura 9 - Resultado do *docking* molecular da substância 1e (ao centro), mostrando as interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa).



Fonte: o autor.

Por fim, a substância 2-(3,4,5- trimetoxibenzilideno)malononitril (1f), apresentou duas interações do tipo ponte de hidrogênio convencionais, uma entre a hidroxila da TYR71 e o oxigênio 9, da metoxila na posição 4 da sustância testada, medindo 2,88 Å, e outra entre a hidroxila da TYR370 e o nitrogênio 16 da 1f, medindo 3,07 Å. A substância apresentou ainda uma ligação hidrofóbica do tipo Pi-Pi *Stacked* com a TYR71, medindo 3,92 Å (Figura 10).

Figura 10 - Resultado do *docking* molecular da substância 1f (ao centro), mostrando a interação hidrofóbica (linhas tracejadas em rosa) e as pontes de hidrogênio convencionais (linhas tracejadas em verde).



Fonte: o autor.

Tabela 2 - Resumo das interações encontradas no *docking* entre os derivados do benzilidenomalononitril e a acetilcolinesterase

Compostos	Aminoácidos do Sítio Ativo	Átomos Envolvidos	Tipo de Interação	Distancia (Å)	Score
1a	TYR71	Anel aromático - Anel aromático	Hidrofóbica	4,36	54,52
	PHE371	Anel aromático - Anel aromático	Hidrofóbica	5,27	
	TYR370	N – OH	Ligação de Hidrogênio Convencional	3,07	
	TYR71	Anel aromático - OH	Ligação de Hidrogênio Não-convencional	3,95	
1b	TYR71	Anel aromático - Anel aromático	Hidrofóbica	4,00	61,16
1c	TYR71	Anel aromático - Anel aromático	Hidrofóbica	4,27	61,29
	TYR370	Anel aromático - Anel aromático	Hidrofóbica	5,18	
1d	TYR71	Anel aromático - Anel aromático	Hidrofóbica	5,01	56,00
	PHE330	Anel aromático – Cl7	Hidrofóbica	4,61	
	TYR370	N13 - OH	Ligação de Hidrogênio Convencional	3,08	
1e	TYR71	Anel aromático - Anel aromático	Hidrofóbica	4,37	58,67
	TYR370	Anel aromático - Anel aromático	Hidrofóbica	5,57	
1f	TYR 71	O9 – OH	Ligação de hidrogênio convencional	2,88	65,22
		Anel aromático –Anel aromático	Hidrofóbica	3,92	
	TYR370	N16 – OH	Ligação de Hidrogênio convencional	2,65	

Fonte: o autor

Pelos dados expostos até aqui, é possível observar que a substância 1a, sem nenhuma substituição no anel benzênico, foi a que obteve o maior número de interações com a acetilcolinesterase. O maior número de interações favorece a formação de um complexo mais estável com a enzima, favorecendo sua inibição, o que favoreceria, por conseguinte, seu uso

como inseticida. Esse resultado permite sugerir que as substituições testadas não favorecem a formação de complexos mais estáveis com a acetilcolinesterase.

No entanto deve-se considerar que existem barreiras a serem transpostas pelas substâncias até chegar ao seu alvo molecular, no caso da barata, é necessário ultrapassar a cutícula, o exoesqueleto de quitina, ganhando assim a hemocele, que fará o transporte da substância até o sistema nervoso central, onde a acetilcolinesterase é encontrada (CAMERON, 1961). Dessa forma, um maior número de interações com a acetilcolinesterase, não se reflete necessariamente em maior efeito biológico, por isso as substâncias foram submetidas a mais uma triagem, dessa vez utilizando baratas adultas, testando seus efeitos sobre a mortalidade dos insetos.

A triagem foi realizada a fim de complementar os resultados do *docking*, auxiliando na seleção das substâncias mais promissoras, determinando assim quais seriam utilizadas nos estudos posteriores, bem como estabelecer uma dose inicial dos testes de toxicidade. A taxa de mortalidade encontrada em cada substância está demonstrada na tabela 3.

Tabela 3 - Mortalidade dos insetos após a triagem

Substância	Mortalidade após 72h (%)
1a	100
1b	50
1c	50
1d	0
1e	100
1f	0

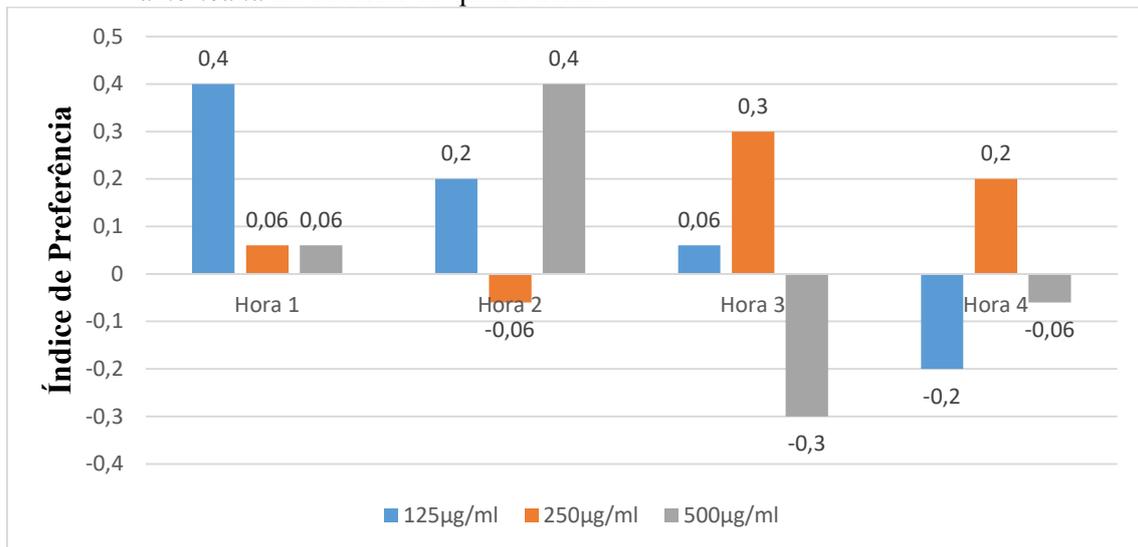
Fonte: o autor

Como já foi dito, o screening foi realizado com 5mg de substância, ou seja, 2,5mg/inseto, portanto, essa foi a dose escolhida como inicial a ser empregada nos testes de toxicidade. Como é possível observar na Tabela 3, quatro substâncias (1a, 1b, 1c, 1e) apresentaram mortalidade frente aos insetos adultos de *P. americana*, sendo que as substâncias 1a e 1e apresentaram a maior mortalidade, dados que coincidem com trabalhos realizados com o pulgão preto (*Aphis craccivora*) que mostraram a potencialização do efeito inseticida de substâncias através da inserção de radicais cianeto e/ou halogenados (ZHANG et al, 2010; TIAN; CUI; XU, 2014).

As quatro substâncias que apresentaram mortalidade na triagem, foram utilizadas no teste de repelência, que teve como objetivo submeter as ninfas de *P. americana* a ambientes tratados com as substâncias estudadas, observando se existe preferência pela área submetida ao tratamento ou pela área sem tratamento.

Nos resultados de repelência do 2-benzilidenomalononitril (1a), é possível observar que a substância teve um comportamento tendendo a neutralidade ou atração frente às ninfas de *Periplaneta americana* (Figura 11), com exceção das concentrações de 500 µg/ml, na terceira hora do teste, e de 125 µg/ml na quarta hora. No entanto, o tratamento estatístico (Tabela 4) não mostra diferença significativa entre as concentrações no decorrer do tempo.

Figura 11 - Efeito repelente do 2-benzilidenomalononitril (1a) frente às ninfas de *Periplaneta americana* no decorrer de quatro horas.



Fonte: o autor.

Tabela 4 - Efeito repelente das substâncias testadas frente às ninfas de *Periplaneta americana*

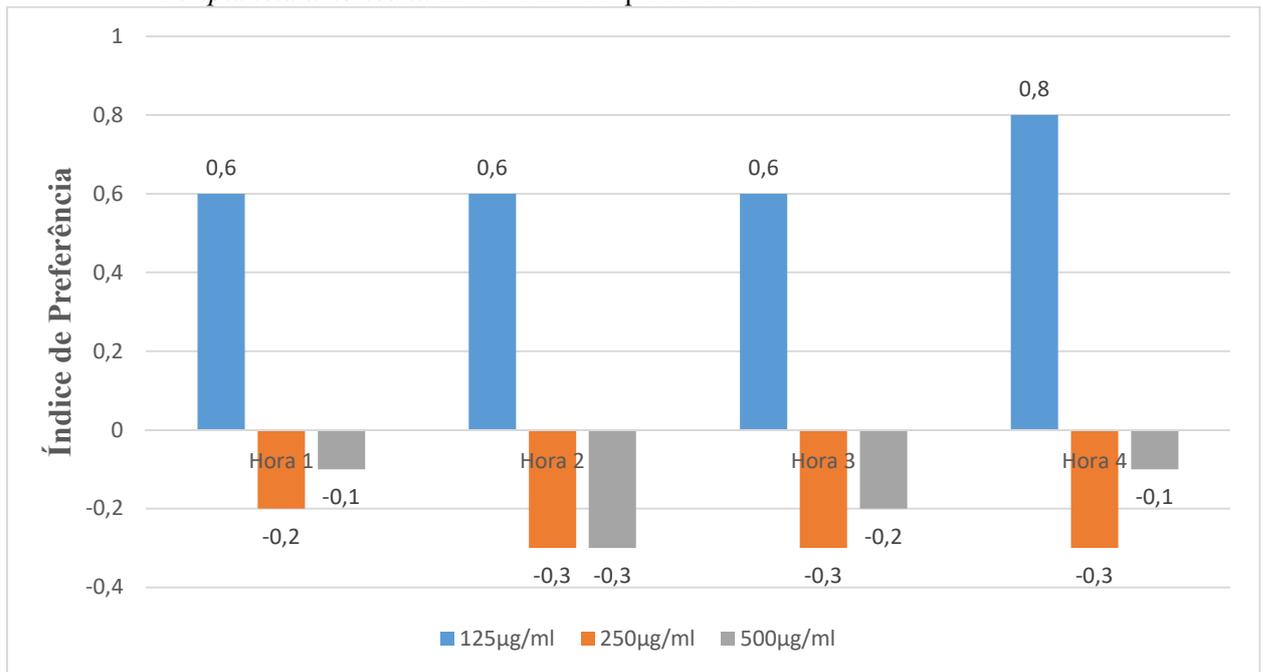
Substância	Doses					
	Controle	125µg/ml	Controle	250µg/ml	Controle	500µg/ml
1a	2,16±1,8	2,83±1,8	2,16±1,6	2,83±1,6	2,41±2,1	2,58±2,1
1b	0,83±0,7	4,16±0,7 ^a	3,25±1,9	1,75±1,9	2,91±1,8	2,08±1,8
1c	1,16±1,4	3,83±1,4 ^b	2,08±2,0	3±1,9	1±1,2	4±1,2 ^a
1e	2±1,8	3±1,8	1,66±1,2	3,33±1,2 ^c	1,83±1,5	3,16±1,5

Onde as letras representam diferença significativa em relação ao controle com os seguintes valores de p
^a= $p < 0,0001$ ^b= $p < 0,0002$ ^c= $p < 0,003$.

Fonte: o autor

O 2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitril (1b), por sua vez, demonstrou marcada atração na menor concentração durante as quatro horas de teste ($p < 0,0001$), no entanto, esse resultado não se manteve nas duas concentrações mais altas (Figura 12), que apesar de mostrarem resultados repelentes quando considerado o índice de preferência, não foi uma diferença significativa, quando aplicados os testes estatísticos.

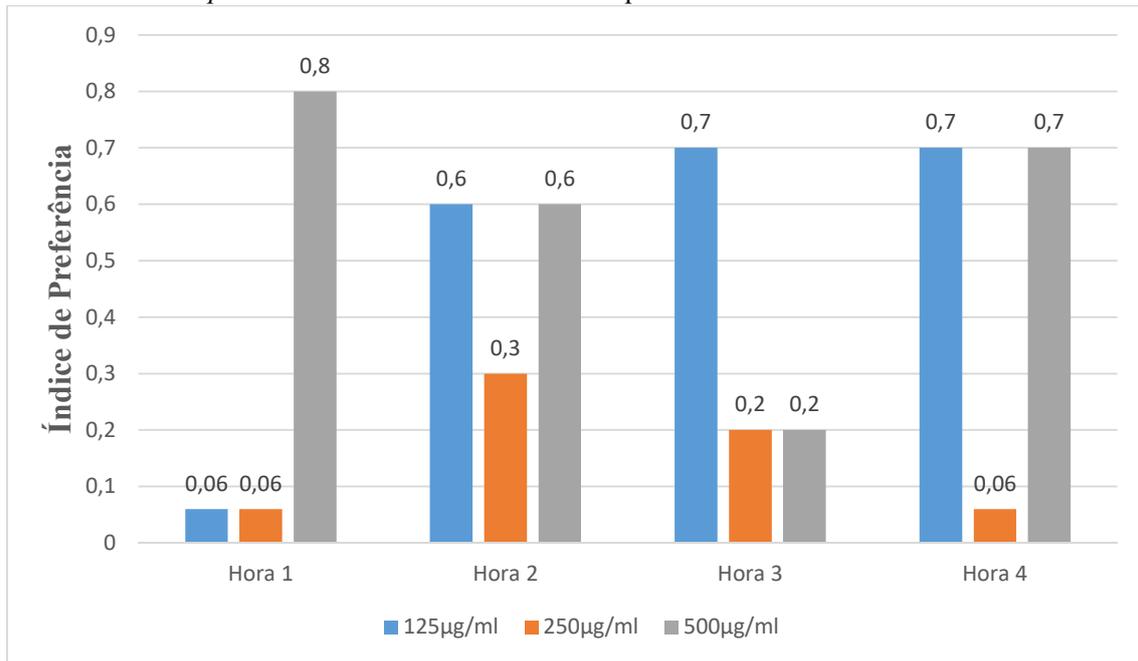
Figura 12 - Efeito repelente do 2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitril (1b) frente às ninfas de *Periplaneta americana* no decorrer de quatro horas.



Fonte: o autor.

O comportamento da repelência da 2-(4-metoxibenzilideno)malononitril (1c) foi inteiramente atraente ou neutro para os insetos, conforme demonstra os resultados do Índice de preferência (Figura 13, pag. 38), apresentando uma diferença altamente significativa nas concentrações de 125 e 500 µg/ml.

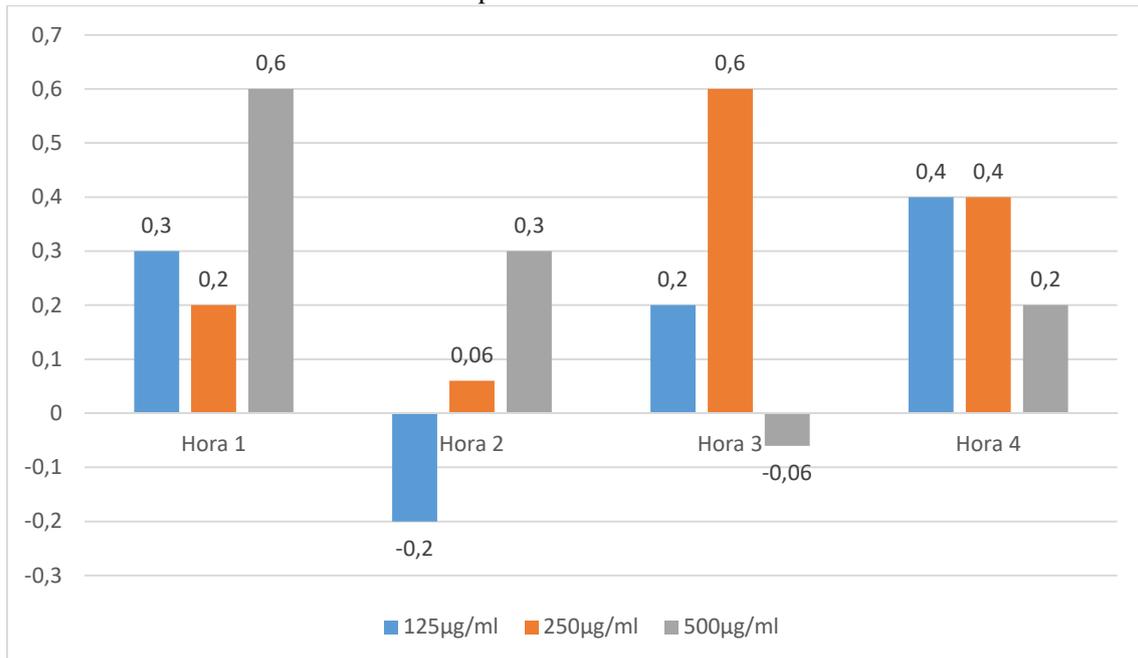
Figura 13 - Efeito repelente do 2-(4-metoxibenzilideno) malononitril (1c) frente às ninfas de *Periplaneta americana* no decorrer de quatro horas.



Fonte: o autor.

A última substância selecionada para esse teste, a 2-(4-fluorobenzilideno)malononitril (1e), teve resultado semelhante às anteriores, apresentando um comportamento majoritariamente atraente ou neutro, com exceção da segunda hora da menor concentração (Figura 14, pag. 39). No entanto, o tratamento estatístico apontou diferença apenas na concentração intermediária, o que pode indicar que na menor concentração, a substância tem um comportamento neutro, passando para uma atividade atraente na concentração intermediária, e voltando para a neutralidade na maior concentração.

Figura 14 - Efeito repelente do 2-(4-fluorobenzilideno) malononitril (1e) frente às ninfas de *Periplaneta americana* no decorrer de quatro horas.



Fonte: o autor.

O teste de toxicidade foi conduzido apenas com a substância 1a, visto que esta apresentou o maior número de interações com a acetilcolinesterase no *docking* molecular, além de ter apresentado a maior mortalidade na triagem.

Conforme exposto na tabela 5, observa-se que a mortalidade percentual total após as 72h de observação do contato das baratas com a dose de 15 mg foi de 8%, chegando ao máximo de 54% na dose de 40 mg, caindo para 33% na dose de 65 mg. É possível observar também que a diferença entre a dose de 40mg com o controle e com a dose de 15mg é significativa, quando aplicado os métodos estatísticos.

Tabela 5 - Média \pm D.P.M da atividade biocida frente a *P. americana* durante 72h com o 2-benzilidenomalononitril (1a).

Parâmetros	Grupos			
	Controle (n=16)	15mg (n=24)	40mg (n=24)	65 mg (n=24)
$\bar{x} \pm D. P. M$	0 \pm 0,0 ^a	0,12 \pm 0,34	0,81 \pm 0,91 ^{a,b}	0,5 \pm 0,81
Nº de mortos em 20'	0	0	0	0
Nº de mortos em 24h	0	0	06	04
Nº de mortos em 48h	0	01	09	05
Nº de mortos em 72h	0	02	13	08
% de atividade	0	8,3	54	33

Onde: ^a significativamente diferente do grupo controle, ^b significativamente diferente da concentração de 15mg.

Fonte: o autor

Esse comportamento pode ser devido ao fato de reações que envolvem enzimas geralmente serem limitadas à quantidade de enzimas disponíveis para a reação, o que faz com que o aumento do ligante não corresponda, necessariamente ao aumento do efeito, ou ainda a mecanismos que as barreiras do sistema nervoso dispõe, capazes de limitar a entrada de substâncias através ou até mesmo expulsando essas substâncias contra o gradiente através de transporte ativo (PAJOUHESH; LENZ, 2005).

Essas inferências são possíveis, é claro, considerando que o mecanismo de ação tóxico da substância frente à *P. americana* seja devido à interação com a acetilcolinesterase, no entanto, são necessários mais estudos no sentido de esclarecer se a tendência de a mortalidade não aumentar se confirma, mesmo com doses maiores, e se essa mortalidade, de fato pode ser atribuída à interação com a acetilcolinesterase.

Diversos tem sido os trabalhos que avaliam a diferença do efeito biológico de substituições em diferentes posições de anéis aromáticos frente a diversos insetos e os resultados podem diferir bastante, a depender da substância protótipo e da natureza das substituições (ZHANG et al., 2010; KAGABU et al., 2007). Nesse trabalho, no entanto, o *docking* molecular apontou para um decréscimo da afinidade da acetilcolina com os derivados do 2-benzilidenomalononitril (1a), visto que os compostos substituídos apresentaram menos ligações com a enzima do que o protótipo.

O resultado da repelência, no entanto, mostrou resultado inverso, sendo das substâncias testadas, apenas a 1a não demonstrou qualquer efeito sobre as ninfas de *P. americana*, enquanto todas as outras tiveram um efeito atraente em pelo menos uma concentração frente aos insetos. Esse resultado se deve, possivelmente, ao fato de que a repelência de uma substância se deve à percepção do seu cheiro pelas estruturas olfativas das baratas, não estando relacionada com a interação com enzimas ou outras macromoléculas.

É importante pontuar que a ausência de efeito repelente pode ser interpretado como algo positivo para o 2-benzilidenomalononitril, uma vez que a possível repelência causada pela substância inviabilizaria o contato dos insetos e o composto, impedindo que ela chegasse, assim, ao seu alvo e produzisse um efeito tóxico.

O efeito atraente das demais substâncias também podem ser utilizados a favor do combate a infestações desses insetos, pois, poderiam ser utilizadas para a produção de instrumentos que atraíssem as baratas, promovendo o contato com outras substâncias tóxicas que poderiam ser associadas a elas.

Esse resultado, no entanto, não exclui a possibilidade dessas substâncias terem efeito repelente, uma vez que é possível que as substâncias tenham efeitos atraentes em concentrações

menores, e invertam o comportamento em concentrações maiores, assumindo um efeito repelente.

Ressalta-se, porém, que a recomendação da autoridade sanitária do Brasil recomenda que um produto disponível para o uso como inseticida nesse país deve ter mortalidade igual ou superior a 90% da população de insetos, sendo assim, apesar da substância testada não ter atingido esse número, demonstra potencial para ser utilizado como adjuvante ou ainda como protótipo para realização de novas substituições que possam potencializar seu efeito sobre o controle da população de *P. americana*.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados, pode-se concluir que o *docking* molecular apontou que todas as substâncias demonstraram interação com a acetilcolinesterase, ainda que a substância 1a, sem nenhuma substituição no anel, tenha sido a que apresentou o maior número de interações, o que leva a crer que essa substância tem o maior potencial para interagir com a acetilcolinesterase, e que as substituições no anel aromático testadas não parecem potencializar essa interação.

Partindo desse resultado, a triagem executada com todas as substâncias mostrou que, das seis substâncias testadas, quatro foram capazes de causar a mortalidade de exemplares dos insetos, sendo selecionadas para a aplicação do teste de repelência.

No teste de repelência, a substância 1a, não demonstrou efeito sobre os insetos, no entanto as demais substâncias apresentaram um efeito atraente, em pelo menos uma das concentrações, o que não chega a ser um resultado desfavorável, uma vez que a presença do efeito atraente pode potencializar o efeito de outros inseticidas, quando usados em associação, uma vez que podem promover o contato entre as baratas e as substâncias tóxicas.

Devido aos melhores resultados nas triagens, a substância 1a foi escolhida para o teste da atividade biocida, demonstrando mortalidade que chegou a 54% na dose de 40mg. Essa mortalidade ainda é inferior à preconizada pela autoridade sanitária brasileira para uma substância ser utilizada como inseticida, no entanto, é inegável que o 2-benzilidenomalononitril se mostra como uma alternativa viável para pesquisas posteriores, no sentido de potencializar seu efeito tóxico frente a esse ou outro insetos, ou ainda como protótipo para manipulações moleculares, que possam viabilizar seu uso no controle da população de insetos no ambiente domiciliar e peridomiciliar.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Manual de protocolos para testes de eficácia de produtos desinfestantes. 2004. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/reblas/link_desinfestantes.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2016.

ARBES, Samuel J. et al. Prevalences of positive skin test responses to 10 common allergens in the US population: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 2, p. 377-383, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16083793>>. Acesso em: 17 abr. 2017.

BARBARA, K. A. **American Cockroach, *Periplaneta americana* (Linnaeus) (Insecta: Blattodea: Blattidae)**. Gainesville: Entomology and Nematology Dept, Univ. of Florida, IFAS, 2000.

BEHBEHANI, K. Cockroaches: unhygienic scavengers in human settlements. In: ROZENDAAL, Jan A (org.) **Vector control-Methods for use by individual and communities**. England: world health organization, 1997. cap.5, p.288-301.

BISSANTZ, Caterina; KUHN, Bernd; STAHL, Martin. A medicinal chemist's guide to molecular interactions. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5061-5084, 2010. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm100112j>>. Acesso em 22 nov. 2017.

BLUMENTHAL, DK; GARRISON, J.C. Farmacodinâmica: mecanismos de ação dos fármacos. In: BRUNTON, Laurence L.; CHABNER, Bruce A.; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. cap. 3, p. 41-71.

BORGES, Raphaele S. et al. Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. **Inflammopharmacology**, p. 1-13, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28707182>>. Acesso em 21 abr. 2017.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. Instrução normativa nº109, de 03 de agosto de 2006. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 ago. 2006. Nº149, p. 88-89.

CAMERON, Ewen. **The cockroach (*Periplaneta americana*, L.): an introduction to entomology for students of science and medicine**. Butterworth-Heinemann, 1961.

CHANDAK, Navneet et al. Dual evaluation of some novel 2-amino-substituted coumarinylthiazoles as anti-inflammatory–antimicrobial agents and their docking studies with COX-1/COX-2 active sites. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 29, n. 4, p. 476-484, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23777557>>. Acesso em: 18 abr. 2017.

COCHRAN, Donald G. et al. **Cockroaches: their biology, distribution and control**. Geneva : World Health Organization, 1999.

COLE, J. C.; NISSINK, J. W. M.; TAYLOR, R. Protein-ligand docking and virtual screening with GOLD. **Virtual screening in drug discovery**, CRC Press, p. 379-415, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12910460>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

CORNWELL, Peter Bernard et al. **The cockroach. v. 1: a laboratory insect and an industrial pest**. London: The Rentokil Library, 1968.

FARES, Mohamed et al. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking of Certain Sulfones as Potential Nonazole Antifungal Agents. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 114, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26805791>>. Acesso em: 15 fev. 2017.

GAZIT, Aviv et al. Tyrphostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 32, n. 10, p. 2344-2352, 1989. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm00130a020>>. Acesso em: 10 out. 2016.

GAZIT, Aviv et al. Tyrphostins. 6. Dimeric benzylidenemalononitrile tyrphostins: potent inhibitors of EGF receptor tyrosine kinase in vitro. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 25, p. 4905-4911, 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8960549>>. Acesso em 10 out. 2016.

GEPNER, J. I.; HALL, L. M.; SATTELLE, D. B. Insect acetylcholine receptors as a site of insecticide action. **Nature**, v. 276, n. 5684, p. 188-190, 1978. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/276188a0>>. Acesso em 21 nov. 2016.

GOMES, Madson R. F. et al. Chemical composition of essential oils of *Drimys angustifolia* Miers and *Drimys brasiliensis* Miers and their repellency to drywood termite *Cryptotermes brevis* (Isoptera: Kalotermitidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 41-46, 2014. Disponível em: <<https://doaj.org/article/09098cfc62954d8b984c4ca42fe4b842>>. Acesso em: 11 mai. 2016.

GORE, J. Chad; SCHAL, Coby. Cockroach allergen biology and mitigation in the indoor environment. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 439-463, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17163801>>. Acesso em 25 jun. 2017.

HAREL, Michal et al. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. **Protein Science**, v. 9, n. 6, p. 1063-1072, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10892800>>. Acesso em: 22 jul. 2017.

KAGABU, Shinzo et al. Effect of substituents at the 5-position of the pyridine ring of imidacloprid on insecticidal activity against *Periplaneta americana*. **Pest management science**, v. 63, n. 1, p. 75-83, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17173345>>. Acesso em: 15 out. 2017.

KATIAL, Rohit K. Cockroach allergy. **Immunology and allergy clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 483-499, 2003. Disponível em:

<[https://www.immunology.theclinics.com/article/S0889-8561\(03\)00002-X/abstract](https://www.immunology.theclinics.com/article/S0889-8561(03)00002-X/abstract)>. Acesso em: 22 jan 2017.

LEVITZKI, Alexander; MISHANI, Eyal. Tyrphostins and other tyrosine kinase inhibitors. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, p. 93-109, 2006. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142657>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

LOPES, Maria Isabella L.; MIRANDA, Paulo J.; SARINHO, Emanuel. Use of the skin prick test and specific immunoglobulin E for the diagnosis of cockroach allergy. **Jornal de pediatria**, v. 82, n. 3, p. 204-209, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16773176>>. Acesso em: 13 dez 2016.

MATSUDA, Kazuhiko et al. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 11, p. 573-580, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698101>>. Acesso em: 27 nov. 2016.

MCGAUGHEY, Georgia B.; GAGNÉ, Marc; RAPPÉ, Anthony K. π -Stacking interactions alive and well in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 25, p. 15458-15463, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624131>>. Acesso em: 22 jul. 2017.

MENG, Xuan-Yu et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21534921>>. Acesso em: 15 out. 2017.

NASIRIAN, Hassan. Infestation of cockroaches (Insecta: Blattaria) in the human dwelling environments: A systematic review and meta-analysis. **Acta tropica**, v. 167, p. 86-98, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28012906>>. Acesso em: 12 jan 2018.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **Pubchem Compound Database CID=17608**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17608#section=InChI>>. Acesso em: 06 fev. 2018.

NEVES, Pedro D. M.; BELLINI, Marcella. Intoxicações por agrotóxicos na mesorregião norte central paranaense, Brasil-2002 a 2011. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 11, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-81232013001100005&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 12 jul. 2017.

NGOH, Shay P. et al. Insecticidal and repellent properties of nine volatile constituents of essential oils against the American cockroach, *Periplaneta americana* (L.). **Pest Management Science**, v. 54, n. 3, p. 261-268, 1998. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291096-9063%281998110%2954%3A3%3C261%3A%3AAID-PS794%3E3.0.CO%3B2-C>>. Acesso em: 19 ago. 2017.

NOVOGRODSKY, Abraham et al. Prevention of lipopolysaccharide-induced lethal toxicity by tyrosine kinase inhibitors. **Science**, v. 264, n. 5163, p. 1319-1323, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8191285>>. Acesso em 18 ago. 2017.

NOVOGRODSKY, Abraham et al. Tyrphostin 4-nitrobenzylidene malononitrile reduces chemotherapy toxicity without impairing efficacy. **Cancer research**, v. 58, n. 11, p. 2397-2403, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9622080>>. Acesso em: 18 ago. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Lista Oficial de alérgenos. 2016. Disponível em: <<http://www.allergen.org/search.php?allergen=cockroach&searchsource=Search>>. Acesso em: 23 set. 2017.

OYEYEMI, Oyetunde T.; AGBAJE, Mariam O.; OKELUE, Uchechi B. Food-borne human parasitic pathogens associated with household cockroaches and houseflies in Nigeria. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 1, n. 1, p. 10-13, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405673115300301>>. Acesso em: 22 jul. 2017.

PAJOUHESH, Hassan; LENZ, George R. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. **NeuroRx**, v. 2, n. 4, p. 541-553, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1201314/>>. Acesso em: 15 out. 2018.

PRADO, Marinésia A. et al. Profile of antimicrobial resistance of bacteria isolated from cockroaches (*Periplaneta americana*) in a Brazilian health care institution. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 26-32, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16767312>>. Acesso em: 22 nov. 2016.

PROCÓPIO, Sérgio de O. et al. Bioatividade de diversos pós de origem vegetal em relação a *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera; Curculionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 6, p. 1231-1236, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v27n6/04.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2017.

RABITO, Felicia A. et al. A single intervention for cockroach control reduces cockroach exposure and asthma morbidity in children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 2, p. 565-570, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28108117>>. Acesso em: 02 fev. 2018.

RAFAEL, José A.; SILVA, Neliton M. da; DIAS, Racy M. N. S. Baratas (Insecta, Blattaria) sinantrópicas na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 38, n.1, p.173-178, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0044-59672008000100020&script=sci_abstract>. Acesso em: 08 jan. 2017.

REBELO, Fernanda M. et al. Intoxicação por agrotóxicos no Distrito Federal, Brasil, de 2004 a 2007-análise da notificação ao Centro de Informação e Assistência Toxicológica. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 8, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-81232011000900017&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 13 jun. 2017.

REN, Zhongjiao; CAO, Weigud; TONG, Weiqi. The Knoevenagel condensation reaction of aromatic aldehydes with malononitrile by grinding in the absence of solvents and

catalysts. **Synthetic Communications**, v. 32, n. 22, p. 3475-3479, 2002. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/SCC-120014780>>. Acesso em: 02 ago. 2017.

SAGARA, Yutaka et al. Tyrphostins protect neuronal cells from oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 39, p. 36204-36215, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121989>>. Acesso em: 28 jul. 2017.

SILVA, T.H.A.; ALVES, R.J.; PRADO, M.A.F. Gênese dos Fármacos. In: MAGALHÃES GOMES, Maria Jose Vasconcelos; REIS, Adriano Max Moreira. **Ciências farmacêuticas: uma abordagem em farmácia hospitalar**. São Paulo: Atheneu, 2006.

SYNGENTA. Salmonela: uma bactéria de muitos vetores. **Focus Saúde Pública**, n.30, p.10-11, 2001.

THYSSEN, Patricia J. et al. O papel de insetos (Blattodea, Diptera e Hymenoptera) como possíveis vetores mecânicos de helmintos em ambiente domiciliar e peridomiciliar. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, p. 1096-1102, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2004000400025>. Acesso em 16 fev. 2017>

TIAN, Zhongzhen; CUI, Shuxia; XU, Zhiping. Synthesis of novel nithiazine analogues containing the 1, 4-dihydropyridine structure, and their bioactivity as insecticides. **Research on Chemical Intermediates**, v. 40, n. 3, p. 1053-1059, 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11164-013-1020-8>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

TURPAEV, Kyril; DRAPIER, Jean-Claude. Stimulatory effect of benzylidenemalononitrile tyrphostins on expression of NO-dependent genes in U-937 monocytic cells. **European journal of pharmacology**, v. 606, n. 1, p. 1-8, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19374863>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

VIANNA, Elvia ES; BERNE, Maria; BERNE, Paulo. Desenvolvimento e longevidade de *Periplaneta americana* Linneu, 1758 (Blattodea: Blattidae). **Current Agricultural Science and Technology**, v. 7, n. 2, 2001. Disponível em: <<https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/view/374>>. Acesso em: 07 jan. 2017.

WESTFALL, Thomas C.; WESTFALL, David P.. Neurotransmissão: os sistemas nervosos autônomo e somático motor. In: BRUNTON, Laurence L.; CHABNER, Bruce A.; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed.. Porto Alegre: AMGH, 2012, cap. 3, p. 41-71.

WOLBER, Gerhard; LANGER, Thierry. LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. **Journal of chemical information and modeling**, v. 45, n. 1, p. 160-169, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15667141>>. Acesso em: 04 fev. 2017.

YURIEV, Elizabeth; RAMSLAND, Paul A. Latest developments in molecular docking: 2010–2011 in review. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, n. 5, p. 215-239, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23526775>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

ZHANG, Wenwen et al. Designing tetrahydroimidazo [1, 2-a] pyridine derivatives via catalyst-free aza-Diels–Alder reaction (ADAR) and their insecticidal evaluation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 10, p. 6296-6299, 2010. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf100645y>>. Acesso em: 23 mar. 2017.

ZIÓŁKOWSKI, Marcin; GRABOWSKI, Sławomir J.; LESZCZYNSKI, Jerzy. Cooperativity in hydrogen-bonded interactions: ab initio and “atoms in molecules” analyses. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 110, n. 20, p. 6514-6521, 2006. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp060537k>>. Acesso em 25 mar. 2017.