



INSTITUTO FEDERAL
Sertão Pernambucano

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SERTÃO
PERNAMBUCANO – CAMPUS OURICURI
COORDENAÇÃO DO CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

JOSÉ WILLIAM FERREIRA DA SILVA

**ESTUDO IN SILICO DAS INTERAÇÕES QUÍMICAS ENTRE
PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A ODORANTES (OBPS) DO AEDES
AEGYPTI E REPELENTE DE INSETOS**

OURICURI

2021

JOSÉ WILLIAM FERREIRA DA SILVA

**ESTUDO IN SILICO DAS INTERAÇÕES QUÍMICAS ENTRE PROTEÍNAS DE
LIGAÇÃO A ODORANTES (OBPS) DO AEADES AEGYPTI E REPELENTES DE
INSETOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do curso de Licenciatura em
Química do Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano
– Campus Ouricuri, como requisito parcial à
obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Renato César da Silva

OURICURI

2021

Silva, José William Ferreira da,

S586e Estudo in silico das interações químicas entre proteínas de ligação a odorantes (OBPS) do aedes aegypti e repelentes de insetos. XIV, 87f.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Licenciatura em Química do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano (IF Sertão PE) / Campus Ouricuri, Ouricuri, PE, 2021.

1. Repelentes de insetos. 2. OBPS. 3. Estudo in silico. 4. Aedes aegypti. 5. Mosquitos. I. Título II. Silva, Renato César da.

CDD 614.4323

Ficha Catalográfica Elaborada pela Bibliotecária Naira Michelle Alves Pereira CRB 4/1891

JOSÉ WILLIAM FERREIRA DA SILVA

**ESTUDO IN SILICO DAS INTERAÇÕES QUÍMICAS ENTRE PROTEÍNAS DE
LIGAÇÃO A ODORANTES (OBPS) DO AEDES AEGYPTI E REPELENTES DE
INSETOS**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Coordenação do Curso de Licenciatura em Química/*Campus* Ouricuri – Departamento de Ensino do Instituto Federal do Sertão Pernambucano, como parte dos requisitos necessários e obrigatórios à obtenção do grau de Licenciado em Química.

Ouricuri – PE, 30 de Setembro de 2021

Aprovado por:

Prof. Dr. Renato César da Silva
IFSertãoPE/*Campus* Ouricuri
(Orientador/Presidente)

Prof. Dr. Alcidênio Soares Pessoa
IFSertãoPE/*Campus* Ouricuri
(Examinador Interno)

Prof. Dr. Iran da Luz Sousa
IFSertãoPE/*Campus* Ouricuri
(Examinador Interno)

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu
irmão e aos meus familiares.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pelo apoio e carinho incondicional durante a minha jornada no curso.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano – Campus Ouricuri e a todo o seu corpo docente e administrativo, pelos seus valiosos ensinamentos, tanto no âmbito acadêmico, quanto no profissional.

Às minhas amigas de pesquisa e de carreira profissional, Thamirys Alves Pereira e Glauciane Barros Nascimento, pelos inúmeros momentos de conquista juntos e apoio mútuo nos momentos mais difíceis.

Ao professor Dr. Renato César da Silva, pela orientação deste trabalho e por proporcionar a oportunidade do meu ingresso na pesquisa científica.

Aos órgãos financiadores das bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq) e da Residência Pedagógica (CAPES).

RESUMO

O *Aedes aegypti*, atualmente distribuído por quase todo o mundo, é o vetor da Dengue, da Febre Amarela, da Chikungunya e do Zika Vírus. Particularmente, a Dengue é a doença mais prevalente nas regiões tropicais e subtropicais. Estima-se que são diagnosticados cerca de 96 milhões de casos de Dengue e 40.000 mortes a cada ano. Na ausência de vacinas, o uso de repelentes é um dos meios de profilaxia mais eficazes para evitar a interação de mosquitos com humanos. Por isso, torna-se primordial o desenvolvimento de substâncias repelentes cada vez mais baratas e eficazes, tais como O DEET, a Icaridina e o IR3535. O conhecimento sobre as bases moleculares relacionadas a quimiorrecepção em artrópodes (Insecta), sugere um modelo ao qual compostos voláteis como repelentes, feromônios e aleloquímicos (infoquímicos) são transduzidos em sinais elétricos pelos Neurônios Sensoriais Olfatórios. O primeiro nível de seleção e identificação de moléculas odorantes está associado a pequenas proteínas globulares, chamadas de Proteínas de Ligação a Odorantes (OBPs). Assim, este trabalho apresenta uma análise de como repelentes de insetos naturais e sintéticos interagem com duas OBPs do *Aedes aegypti* (AaegOBP1 e AeOBP22) por meio de uma metodologia *in silico*, na tentativa de contribuir para uma compreensão mais detalhada sobre as bases moleculares que permeiam a quimiorrecepção nesses insetos. Os resultados indicaram que as duas OBPs podem se ligar efetivamente a 21 repelentes com afinidades de ligação diferentes, sendo que AaegOBP1 possui uma maior afinidade com os repelentes comerciais e naturais; não obstante, AeOBP22 pode interagir com uma maior especificidade a ácidos graxos de cadeias longas (entre 12 e 16 carbonos). As análises estatísticas (PCA) revelaram que repelentes com uma polaridade ideal, mas especificamente, entre 2 e 6 Debye podem interagir mais efetivamente com a proteína AaegOBP1 e que o volume molecular não possui uma relação direta com a energia de Gibbs (ΔG) ou a constante de dissociação (K_d). O coeficiente de partição ($\log P$) foi indicado como um parâmetro determinante para a intensificação das interações hidrofóbicas OBP-repelente. Repelentes com baixo potencial de ionização (I) e dureza absoluta (η) podem interagir mais eficientemente com as OBPs do *Ae. aegypti*; ao ponto de que substâncias menos voláteis, ou seja, com pressão de vapor baixa, foram reportados como ótimos ligantes para AaegOBP1 e AeOBP22, reforçando as hipóteses propostas a nível experimental reportadas na literatura.

Palavras-chave: Repelentes de Insetos. OBPs. Estudos *in silico*. *Aedes aegypti*. Mosquitos.

ABSTRACT

Aedes aegypti, currently distributed throughout most of the world, is the vector of Dengue, Yellow Fever, Chikungunya and Zika Virus. Dengue is particularly the most prevalent disease in tropical and subtropical regions. It is estimated that around 96 million cases of Dengue and 40,000 deaths are diagnosed each year. In the absence of vaccines, the use of repellants is one of the most effective means of prophylaxis to prevent the interaction of mosquitoes with humans. Therefore, it is essential to develop repellents that are increasingly cheaper and more effective, such as DEET, Icaridin and IR3535. The knowledge about the molecular bases related to chemoreception in arthropods (Insecta) suggests a model in which volatile compounds such as repellents, pheromones and allelochemicals (infochemicals) are transduced into electrical signals by olfactory sensory neurons. The first level of selection and identification of odorant molecules is associated with small globular proteins, called Odorant Binding Proteins (OBPs). Hence, this research presents an analysis of how natural and synthetic insect repellents interact with two *Aedes aegypti* OBPs (AaegOBP1 and AeOBP22) through an in silico methodology, in an attempt to contribute to a more detailed understanding of the molecular bases that permeate chemoreception in these insects. The results indicated that the two OBPs can effectively bind to 21 repellants with different binding affinities, with AaegOBP1 having a greater affinity with commercial and natural repellents; nevertheless, AeOBP22 can interact with a greater specificity to long chain fatty acids (between 12 and 16 carbons). Statistical analyzes (PCA) revealed that repellents with an ideal polarity, but specifically between 2 and 6 Debye, can interact more effectively with the AaegOBP1 protein and that molecular volume does not have a direct relationship with Gibbs energy (ΔG) or dissociation constant (K_d). The partition coefficient ($\log P$) was indicated as a determining parameter for the intensification of hydrophobic OBP-repellent interactions. Repellents with low ionization potential (I) and absolute hardness (η) can interact more efficiently with *Aedes aegypti* OBPs; to the point that less volatile substances, that is, with low vapor pressure, were reported as excellent binders for AaegOBP1 and AeOBP22, reinforcing the hypotheses proposed at the experimental level.

Keywords: Insect Repellents. Odorant Binding Proteins. In silico studies. *Aedes aegypti*. Mosquitoes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AaegOBP1	Proteína de Ligação a Odorantes 1 do <i>Aedes aegypti</i>
AeOBP22	Proteína de Ligação a Odorantes 22 do <i>Aedes aegypti</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CSPs	<i>Chemosensory Proteins</i>
DEET	N,N-Dietil-3-metilbenzamida
EDOs	Enzimas Degradadoras de Odor
EF	Método de otimização padrão <i>Eigenvector Following</i>
EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
GPCRs	<i>G Protein-Coupled Receptors</i>
GRs	<i>Gustatory Receptors</i>
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
iGluRs	<i>Ionotropic Glutamate Receptors</i>
<i>in silico</i>	<i>Estudo ocorrido em ou através de simulação computacional</i>
IR3535	Etilbutilacetilaminopropionato
IRs	<i>Ionotropic Receptors</i>
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
MED	<i>Minimum effective dosage</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OBPs	<i>Odorant Binding Proteins</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
Orco	<i>Odorant Receptor Co-receptor</i>
ORs	<i>Odorant Receptors</i>
OSNs	<i>Olfactory Sensory Neurons</i>
Pa	Pascal
PBP	<i>Pheromone Binding Protein</i>

PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PM6	<i>Parameterization Method 6</i>
PMD	ρ -Metano 3,8-diol
QSAR	<i>Quantitative Structure–Activity Relationship</i>
QSPR	<i>Quantitative Structure-Property Relationship</i>
RLM	Regressão Linear Múltipla
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	<i>Root-mean-square deviation of atomic positions</i>
SE	Semana Epidemiológica
SCZV	Síndrome Congênita do Zika Vírus

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
kDa	Quilodalton
μ	Momento de Dipolo
$\Delta_{\text{H-L}}$	<i>Gap HOMO-LUMO</i>
η	Dureza absoluta
S	Maciez
V	Volume molecular
I	Energia de ionização
E	Energia eletrônica
A	Afinidade eletrônica
eV	Elétron-volt
$\log P$	Coefficiente de partição octanol-água
R	Constante universal dos gases perfeitos
T	Temperatura
P	Pressão de vapor
F	Matriz de Fock
C	Matriz de coeficiente
S	Matriz de sobreposição de base
ϵ	Matriz de energia dos orbitais
Å	Ångström, unidade de medida que equivale a 10^{-10} m
m	Metros
K_d	Constante de dissociação
K_i	Constante de inibição
ΔG_{lig}	Energia livre de ligação de Gibbs
ΔH	Varição da entalpia

ΔS	Varição da entropia
\ln	Logaritmo neperiano
\log	Logaritmo
Y_i	Variável dependente
X_i	Variável independente
β_i	Coefficiente parcial de regressão
ε_i	Erro
s	Segundos
ΔH_f°	Entalpia padrão de formação
μM	Micromolar
D	Debye

SÍMBOLOS DOS AMINOÁCIDOS

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
Asx	Asparagina
Cys	Cisteína
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 ARBOVIROSES.....	19
3.1.1 O mosquito <i>Aedes aegypti</i>	19
3.1.2 Doenças transmitidas pelo <i>Aedes aegypti</i>	21
3.1.2.1 <i>Dengue</i>	21
3.1.2.2 <i>Febre Amarela</i>	23
3.1.2.3 <i>Chikungunya</i>	24
3.1.2.4 <i>Síndrome Congênita do Zika Vírus</i>	25
3.2 A QUIMIORRECEPÇÃO EM INSETOS.....	26
3.2.1 A Transdução do Sinal Olfativo	27
3.2.1.1 <i>Proteínas de Ligação a Odorantes</i>	28
3.2.1.2 <i>Receptores de Odor</i>	29
3.2.1.3 <i>Receptores Ionotrópicos</i>	30
3.2.1.4 <i>Receptores Gustativos</i>	31
3.3 OBPS DO <i>AEDES AEGYPTI</i>	31
3.5.1 Principais repelentes de insetos	34
3.5.1.1 <i>DEET</i>	34
3.5.1.2 <i>Icaridina</i>	35
3.5.1.3 <i>IR3535</i>	36
3.5.1.4 <i>Permetrina</i>	36
3.5.1.5 <i>Repelentes naturais</i>	36
3.5.2 O mecanismo de ação do DEET	38
4 METODOLOGIA COMPUTACIONAL	40
4.1 OTIMIZAÇÃO GEOMÉTRICA DOS REPELENTES.....	41
4.2 DOCKING MOLECULAR.....	43
4.2.1 Interações receptor-ligante	45
4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48

5.1 DOCKING AaegOBP1.....	51
5.2 DOCKING AeOBP22.....	57
5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	64
5.4 MODELO QSAR PARA A PREVISÃO DE ΔG	69
5.5 DISCUSSÕES GERAIS.....	71
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
7 PERSPECTIVAS.....	75
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

As doenças metaxênicas (transmitidas por vetores) são uma preocupação em todo o mundo e representam um dos principais problemas de saúde pública. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), elas são responsáveis por mais de 17% das doenças infecciosas, matando mais de 700.000 pessoas anualmente (WHO, 2020). Os agentes etiológicos podem ser bactérias, vírus, protozoários e nematoides que, ao se adaptar à microbiota do vetor, desencadeiam uma série de comportamentos fisiológicos neste até a finalização do seu ciclo de parasitismo (GRISOTTI, 2010). Os mosquitos (Diptera: Culicidae) representam os principais vetores de doenças que infectam milhares de pessoas anualmente (WHO, 2020).

O *Aedes Aegypti*, atualmente distribuído por quase todo o mundo, é o vetor da Dengue, da Febre Amarela, da Chikungunya e do Zika Vírus. Particularmente, a Dengue é a doença mais prevalente nas regiões tropicais e subtropicais. Estima-se que são diagnosticados cerca de 96 milhões de casos de Dengue e 40.000 mortes a cada ano (WHO, 2020). O controle deste inseto é dificultado em razão da sua versatilidade na escolha dos locais para oviposição. Beserra et al. (2010) relataram que a larva do mosquito pode se adaptar a diferentes ambientes e tipos de água, como na água da chuva e no esgoto bruto.

Muitas estratégias são utilizadas para o controle do *Ae. Aegypti*, tais como o controle mecânico, o controle biológico e o controle químico (ZARA et al., 2016), além da distribuição de vacinas em áreas endêmicas como medida profilática. Atualmente, dentre as doenças transmitidas pelo *Ae. aegypti*, foi desenvolvida vacina apenas para a Febre Amarela (ROUKENS; VISSER, 2008). Entretanto, é importante destacar que as vacinas não conferem proteção com 100% de eficácia. Na ausência de vacinas, a alternativa mais eficaz e ambientalmente aceitável para evitar interações entre mosquitos e humanos é a implementação de sistemas *push-pull* em regiões endêmicas. Esse tipo de ferramenta é construída para operar de acordo com estímulos de odor, atuando como uma armadilha para a captura em massa de vetores (WAGMAN et al., 2015; MENGER et al., 2015). No entanto, ainda existem muitas limitações em relação ao uso de substâncias atrativas e repelentes para a aplicação em saúde pública. Ray (2015) aponta em seu manuscrito o pouco uso pela população dos princípios ativos comercialmente disponíveis, como o repelente N,N-Dietil-3-metilbenzamida (DEET). O autor destaca a aversão do público a produtos não-naturais, a necessidade de aplicação a altas concentrações na pele, os custos relativamente altos e a baixa

qualidade cosmética. Outrossim, as armadilhas podem se tornar caras e volumosas porque exigem uma fonte de Dióxido de Carbono (CO₂) como isca e também podem conter substâncias que possuem odores desagradáveis ao olfato humano. Como uma área de pesquisa altamente relevante para a sociedade, existe uma necessidade urgente de descobrir ou sintetizar novas classes de atrativos e repelentes para o controle global de mosquitos.

Até onde se sabe, os insetos desencadeiam comportamentos fundamentais para a sua existência (localização de presas, defesa e agressividade, seleção de plantas hospedeiras, acasalamento, organização de atividades sociais etc.) através do cheiro (VILELA; LUCIA, 2001). Para tanto, esses invertebrados são dotados de um olfato extremamente sensível e seletivo a uma gama de substâncias químicas presentes no ambiente (LEAL, 2005). Respostas comportamentais ou fisiológicas com ação interespecífica (interação entre dois indivíduos de espécies diferentes) ou intraespecífica (interações entre dois indivíduos da mesma espécie), são mediadas de acordo com as propriedades físico-químicas de moléculas odoríferas conhecidas como semioquímicos (NORDLUND; LEWIS, 1976).

O conhecimento sobre as bases moleculares relacionadas a quimiorrecepção em artrópodes (Insecta), sugere um modelo ao qual compostos voláteis como repelentes, feromônios e aleloquímicos (infoquímicos) são transduzidos em sinais elétricos pelos Neurônios Sensoriais Olfatórios (OSNs, do inglês *Olfactory Sensory Neurons*), componentes das sensilas, isto é, unidades que conferem características únicas aos órgãos sensoriais dos insetos, tais como as antenas e os palpos maxilares (LI; LIBERLES, 2015). No entanto, a natureza hidrofóbica dos semioquímicos em geral, não permite que essas moléculas cheguem aos dendritos dos OSNs com facilidade. É reconhecido, sobretudo, que o papel de solubilizar e transportar sinais químicos através da linfa sensitiva é comumente atribuído a pequenos polipeptídeos solúveis de baixo peso molecular (~15 µg por antena), as chamadas Proteínas de Ligação a Odorantes – OBPs, do inglês, *Odorant Binding Proteins* (VOGT; RIDDIFORD, 1981; ZHOU et al., 2006). Devido o primeiro nível de seleção e identificação de moléculas odorantes estar associado às OBPs, vários estudos têm se concentrado em entender mais profundamente o seu papel no sistema quimiossensorial dos insetos (VENTHUR et al., 2014).

É reconhecido que a função biológica de uma proteína está intimamente associada à sua estrutura terciária. Tendo em vista a dificuldade e o alto custo envolvido na determinação de estruturas proteicas complexadas ou não, existem mais sequências primárias de proteínas do que estruturas terciárias armazenadas em bancos de dados, como no *Protein Data Bank* (PDB). Tratando-se de OBPs, as estruturas são limitadas a pouco mais de 70. Recentemente, a Proteína de Ligação a Odorantes 1 e 22 do mosquito *Ae. aegypti* (abreviaturas: AaegOBP1 e

AeOBP22, respectivamente) presentes na antena da fêmea, foram depositadas no PDB (LEITE et al., 2009; WANG et al., 2020). Essas proteínas desempenham funções primordiais na detecção de odorantes e alimentação do mosquito.

Ensaio *in silico* (simulações computacionais) são amplamente utilizados no estudo de sistemas biológicos. Particularmente, para descrições detalhadas sobre as estruturas das OBPs e ao reconhecimento de potenciais ligantes para essas proteínas, os métodos baseados em algoritmos da Química Computacional e da Bioinformática são uma peça-chave. Em contrapartida, pesquisas baseadas em modelos virtuais auxiliam na compreensão das forças físico-químicas não covalentes que determinam a especificidade de ligação de compostos fisiologicamente relevantes para diferentes espécies de insetos (VENTHUR et al., 2014).

Os mecanismos relacionados à recepção e liberação de odores em insetos são comumente investigados por métodos experimentais de alto custo, como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Cristalografia de raios-X. Além disso, técnicas empíricas muitas vezes não conseguem descrever completamente a natureza físico-química das interações receptor-ligante. Utilizar simulações computacionais para o estudo de sistemas biológicos possibilita redução no tempo e nos gastos envolvidos em métodos experimentais de alto rendimento. Descrições completas dos mecanismos de ligação e liberação para semioquímicos fisiologicamente relevantes, portanto, podem ser obtidas através de Docking Molecular e outros algoritmos da bioinformática e Química Computacional, contribuindo para o desenvolvimento de medidas profiláticas eficientes ao controle de pragas na agricultura e combate de mosquitos hematófagos.

2 OBJETIVOS

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivos:

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar como repelentes de insetos naturais e sintéticos interagem com as proteínas AaegOBP1 e AeOBP22 do mosquito *Ae. aegypti* por meio de uma metodologia *in silico*, na tentativa de contribuir para uma compreensão mais detalhada sobre as bases moleculares que permeiam a quimiorrecepção neste inseto.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Buscar na literatura substâncias que possuem efeitos repelentes no *Ae. Aegypti*.
- Propor um modelo virtual preciso para a estimativa da energia de ligação OBP-repelente por meio de Docking Molecular combinado com métodos semiempíricos.
- Examinar a natureza das forças intermoleculares que permeiam a afinidade de ligação dos repelentes com as OBPs.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ARBOVIROSES

As doenças transmitidas por vetores ainda constituem uma das principais causas de morbidade no Brasil e no mundo. São transmitidas pela picada de espécies de artrópodes infectados, tais como pulgas, carrapatos e mosquitos (GOLDING et al., 2015; WILSON et al., 2020). Esses insetos são ectotérmicos, logo dependem do clima para a sua sobrevivência e reprodução. Sobretudo, é reconhecido que fatores climáticos, socioeconômicos, culturais e geográficos impactam diretamente na distribuição da população de vetores e na transmissão de doenças (KNUDSEN; SLOOFF, 1992). Assim, o controle de doenças infecciosas torna-se dificultado, uma vez que o ciclo de vida dos vetores e reservatórios tem relação direta com a temperatura, com a umidade, com padrão de uso do solo e com a vegetação.

A intensa modificação do bioma natural, portanto, pode afetar populações de mosquitos e hospedeiros vertebrados, levando-os a migrarem para outros habitats e, por sua vez, infectar animais e humanos, tornando-se um sério problema de saúde pública (BARCELLOS et al., 2009). Alguns exemplos de arboviroses são a dengue (principal doença reemergente em países tropicais e subtropicais), a febre amarela, a filariose, a malária, a leishmaniose, e a febre do Nilo Ocidental (LIMA-CAMARA, 2016). Estudos ainda indicam a migração humana como um dos contribuintes para mudanças no quadro epidemiológico das doenças. Por exemplo, a leishmaniose visceral (também conhecida como calazar) foi introduzida no Novo Mundo por volta do ano de 1500, por meio de cães infectados que acompanhavam os exploradores de Portugal e do Mediterrâneo (BRAZIL, 2013).

3.1.1 O mosquito *Aedes aegypti*

É fato que as deficientes condições de saneamento ambiental em vários municípios brasileiros intensificam a transmissão de arboviroses (ALBUQUERQUE; DOS SANTOS; PIMENTEL, 2019). A exemplo da ocorrência atual da tríplice epidemia ocasionada pelo mosquito *Ae. aegypti* – Dengue, Febre de Chikungunya e a Síndrome Congênita do Zika Vírus (SCZV).

Atualmente considerado como um mosquito cosmopolita, o *Ae. aegypti* é transmissor da

dengue, da Chikungunya, da febre amarela e da SCZV. Ele é preto com riscos formando um pequeno desenho semelhante a uma taça no tórax e listras brancas na cabeça e nas pernas (Fig. 1), sendo menor que os mosquitos comuns (NELSON, 1986). O macho da espécie se alimenta de frutas, e a fêmea é hematófaga, sendo capaz de colocar entre 150 e 200 ovos durante o seu período de vida, que dura em torno de 1 mês. Se os ovos forem postos por uma fêmea contaminada pelo vírus da dengue, quando completarem seu ciclo evolutivo, serão capazes de transmitir a doença (SESA, 2020).

Figura 1 – Mosquito macho (à esquerda) e fêmea (centro e direita) de *Ae. aegypti*.



(Fonte: GÖLDI, 1905).

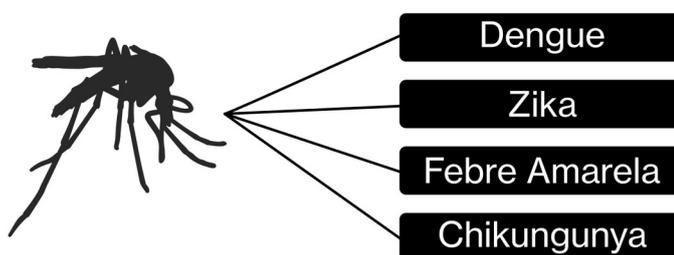
O *Ae. aegypti* é muito versátil na escolha dos criadouros onde deposita os seus ovos, que são preferencialmente artificiais – caixas d'água descobertas, latas e garrafas vazias, pneus, vasos de plantas ou quaisquer objetos capazes de armazenar água da chuva. Os ovos são postos milímetros acima da superfície da água e podem resistir por vários meses até a chegada de água que propicie a incubação, eclodindo em 30 minutos. O período de desenvolvimento da larva até a origem de um mosquito adulto varia entre sete e nove dias (NELSON, 1986). O genoma da espécie foi sequenciado e publicado em 2007. Os dados incluem 1,38 bilhões de pares de bases contendo cerca de 15.419 genes que codificam as proteínas do mosquito (NENE et al, 2007).

Proveniente da África e distribuído por quase todo o mundo, o mosquito depende exclusivamente da concentração humana no local para se estabelecer (POWELL, 2018). O primeiro indício de que o *Ae. aegypti* poderia ser um vetor de arboviroses, como a febre amarela, data de 1901, nos estudos realizados por Reed e Carroll (1901). Em 1906, foi comprovado que o mosquito também poderia transmitir a dengue (BANCROFT, 1906).

3.1.2 Doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti*

Com a globalização, as constantes alterações climáticas e o crescente número de voos internacionais, existem condições favoráveis à propagação de vetores e de pessoas infectadas durante o período de incubação dos vírus (VASCONCELOS, 2015). Dentre as arboviroses emergentes e reemergentes, as transmitidas pelo *Ae. Aegypti* (Fig. 2) são consideradas grandes desafios à saúde pública.

Figura 2 – Doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*.



(Fonte: Elaborado pelo autor).

3.1.2.1 Dengue

Estudos indicam que a dengue provavelmente tenha se originado de vírus que circulavam em primatas não humanos próximos à península da Malásia (UJVARI, 2008), e se espalhado pelo mundo desde o período da comercialização de escravos (século XV-IX) até o advento do aumento de viagens e do comércio nas últimas décadas (MOUSSON et al., 2005). A dengue é um vírus RNA da família Flaviviridae (*Flavivirus*), que incluem quatro cepas do vírus, que são:

- **Infecção Inaparente:** ocorre quando a doença praticamente não se manifesta, assim o indivíduo não apresenta os sintomas;
- **Dengue Clássica:** o primeiro sintoma é febre alta (39° a 40°C), comumente acompanhado de cefaleia ou dor nos olhos. O indivíduo também pode sentir dores musculares e ósseas, fadiga, náuseas, vômitos, falta de apetite e apresentar manchas avermelhadas na pele;
- **Dengue Hemorrágica:** os sintomas são similares à Dengue Clássica, entretanto por volta do terceiro dia, o paciente começa a apresentar sangramentos nas gengivas e na

pele, bem como vômitos e dor abdominal intensa. A Dengue Hemorrágica é considerada a forma mais grave da doença, pois o indivíduo infectado corre risco de vida;

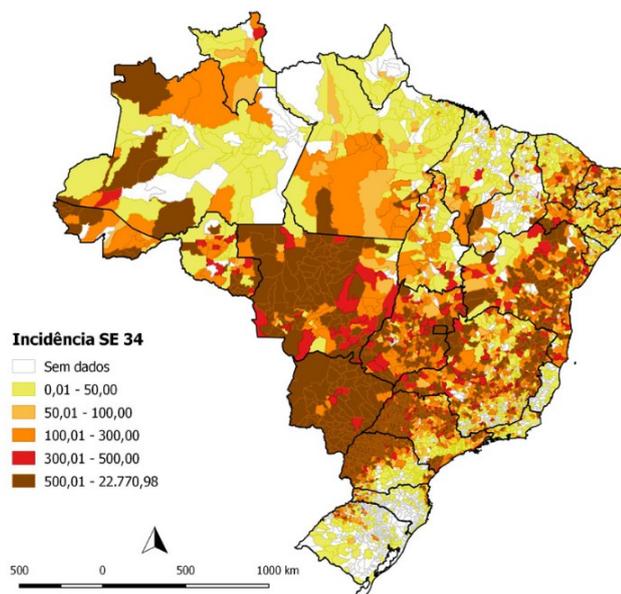
- **Febre Hemorrágica da Dengue:** é o tipo mais grave e raro da dengue hemorrágica, em que o paciente apresentará sintomas como hipotermia, palidez, taquipneia, alterações no nível da consciência, pressão baixa e hemorragias (NEVES, 2019).

Os sintomas da dengue começam repentinamente após o período de incubação do vírus, que varia de 3 a 7 dias, e seguem três fases – (1) fase febril inicial; (2) fase crítica; e (3) fase de recuperação espontânea (SIMMONS, 2012). Ainda não existe nenhum agente antiviral eficaz para tratar a infecção por dengue, desta forma o tratamento é suportado pelo gerenciamento cuidadoso de fluidos. Nos casos em que o paciente apresentar sangramento ou intolerância aos fluidos orais, deverá retornar imediatamente ao hospital (WILLS et al., 2005). Em alguns casos, a transfusão de sangue pode salvar a vida do paciente.

Os casos mais graves de dengue ocorrem em uma pequena parcela, visto que a maioria dos infectados são assintomáticos ou apresentam os sintomas da dengue clássica. Um dos grandes problemas de saúde pública é a hospitalização frequente de pessoas com sintomas leves da doença no nível primário de atendimento. Sistemas eficientes de triagem rápida por profissionais experientes, avaliação clínica diária facilitada e campanhas de conscientização sobre a doença ajudariam a reduzir internações desnecessárias (SIMMONS, 2012).

No Brasil, a situação epidemiológica do ano de 2020, até a semana 34, período correspondente a 29/12/2019 a 22/08/2020, indica que foram notificados 924.238 casos prováveis de dengue (taxa de incidência de 439,8 casos por 100 mil habitantes); e 465 óbitos por dengue hemorrágica, sendo que 225 permanecem em investigação. Em relação aos casos confirmados, a região Centro-Oeste do país foi a mais afetada (Fig. 3), com uma taxa de 1.159,9 casos por 100 mil habitantes, seguida das regiões Sul (929,2 casos/100 mil habitantes); Sudeste (339,1 casos/100 mil habitantes); Nordeste (240,7 casos/100 mil habitantes); e Norte (106,7 casos/100 mil habitantes). (MEDEIROS et al., 2020a).

Figura 3 – Distribuição da taxa de incidência de dengue por município no Brasil, referente à Semana Epidemiológica (SE) de 1 a 34 de 2020.



(Fonte: MEDEIROS et al., 2020).

O desenvolvimento de uma vacina contra a dengue que seja segura e eficaz tem sido consideravelmente difícil. Entretanto, um progresso notável tem sido feito durante os últimos 8 anos com relação a ensaios clínicos realizados com a principal vacina candidata ao combate do vírus da dengue: a ChimeriVax (Sanofi Pasteur) (LANG, 2012).

3.1.2.2 Febre Amarela

A febre amarela ocorre em alguns países da África, na América do Sul e na América Central, no âmbito de dois ciclos básicos: (1) silvestre, sendo transmitida por mosquitos do gênero *Haemagogus* a primatas não humanos; e (2) urbano, sendo transmitida pelo *Ae. aegypti* para humanos (TESH et al., 2001). O período de incubação do vírus em seres humanos varia, em média, de três a dez dias após a picada do mosquito (COURA, 2013).

Também pertencente ao gênero *Flavivirus*, a febre amarela teve seu genoma sequenciado em 1985. Ele é constituído de RNA de fita simples não segmentado, com 10.862 nucleotídeos que codificam 3.411 aminoácidos (RICE et al., 1985). A doença possui um caráter sazonal, sendo mais frequente entre os meses de janeiro e abril, quando a densidade de mosquitos é influenciada por uma série de fatores ambientais, tais como a estação chuvosa (TAUIL, 2010).

Os casos leves de vítimas da febre amarela apresentam sintomas como dor de cabeça,

náusea e vômitos, além de dores no corpo, calafrios, febre, mal-estar, perda de apetite e icterícia (olhos amarelados). Já os casos graves incluem doenças cardíacas, hepáticas e renais que podem causar a morte. Ainda não existe um medicamento específico para a doença, assim, recomenda-se o uso de remédios anti-inflamatórios não esteroides para aliviar os sintomas de dor, inflamações e febre, bem como terapias de reidratação oral. Uma vez que não existem antivirais para a febre amarela, a maneira mais eficaz para o combate à doença é evitar a contaminação por meio de estratégias para o controle de vetores, bem como a vacinação. No Brasil, existem duas vacinas de vírus vivo atenuado disponíveis, ambas com eficácia estimada em mais de 95% para crianças maiores de 2 anos (COSTA et al., 2011).

Entre os anos de 2019/2020 (julho de 2019 a junho de 2020), foram notificados no Brasil 3.196 casos suspeitos de febre amarela, envolvendo a morte de macacos. Dentre estes, 358 epizootias foram confirmadas, 722 foram descartadas, 505 permanecem em investigação e 1.611 foram classificadas como indeterminadas por falta de amostras para o diagnóstico. Em humanos, foram notificados 881 casos suspeitos, dos quais 18 foram confirmados e houveram 3 óbitos (letalidade de 16,7%) (MEDEIROS et al., 2020b). Apesar de ser considerada uma doença muito rara devido ao número de casos confirmados por ano, a febre amarela possui uma taxa de mortalidade alta. Além do mais, Cavalcante e Tauil (2017), destacam o risco de reintrodução do vírus urbano no Brasil devido ao aumento da epidemia silvestre que atinge os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina, desde dezembro de 2016.

3.1.2.3 *Chikungunya*

A Chikungunya é um Alphavirus também originário da África por meio de ciclos silvestres complexos entre vetores do gênero *Aedes*, principalmente *Ae. aegypti*, e primatas não humanos. A primeira emergência da doença ocorreu com sua introdução no sudeste asiático e na Índia, após o seu isolamento, em 1952. Desde então, o vírus segue um ciclo esporádico de transmissão contínua no âmbito urbano (NASCI, 2014).

Em 2014, O Brasil identificou uma transmissão autóctone da Chikungunya na cidade de Oiapoque, no estado do Amapá, originária do Caribe em Outubro de 2013. No mesmo ano, foram confirmados 2.772 casos de infecções pela doença, em que o Amapá e a Bahia foram os estados mais afetados, com 1.554 e 1.214 casos, respectivamente (SOUZA, 2016).

A infecção pelo vírus Chikungunya é caracterizada por uma síndrome febril súbita,

acompanhado de dores nas articulações, dores musculares, dor de cabeça, fadiga e erupções na pele. Estima-se que 5% dos pacientes apresentam manifestações reumáticas e musculoesqueléticas pós-Chikungunya (PIALOUX et al., 2007). Assim como as outras arboviroses, a imunização passiva é uma das opções terapêuticas e preventiva para o combate à Chikungunya. Do mesmo modo, ainda não existe um antiviral específico para o tratamento da doença, que atualmente é feita pela administração de analgésicos e esteroides a fim de aliviar os sintomas articulares (HONÓRIO et al., 2015).

Até a SE 34 de 2020 foram notificados 66.788 casos prováveis de Chikungunya no Brasil, aos quais as regiões Norte e Sudeste possuíram as maiores taxas de incidência, com 79,2 casos/100 mil habitantes e 22,0 casos/100 mil habitantes, respectivamente. O estado da Bahia se destaca com 49,6% dos casos prováveis da doença no país. Atualmente, foram confirmados 12 óbitos pela infecção do vírus e 18 encontram-se em investigação (MEDEIROS et al., 2020a).

3.1.2.4 Síndrome Congênita do Zika Vírus

Após a Copa do Mundo de Futebol realizada no ano de 2014, uma nova doença febril foi registrada em algumas localidades do Nordeste Brasileiro, mais especificamente nas cidades de Natal (RN), Recife (PE) e Salvador (BA) (ZANLUCA et al., 2015). Curiosamente, as manifestações clínicas do vírus não coincidem com a dengue ou Chikungunya, apesar da região Nordeste ser uma área endêmica para estas arboviroses. As primeiras publicações indicavam o surgimento de uma epidemia inédita mediada pela Síndrome Congênita do Zika Vírus (SCZV ou ZIKV). (ZANLUCA et al., 2015; CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015).

Isolado inicialmente em primatas não humanos na África, em 1947, a SCZV é um vírus RNA pertencente ao gênero Flavivírus, com três linhagens principais – uma originária da Ásia e duas da África. A doença está intimamente relacionada à proliferação vetorial, bem como as condições sanitárias das regiões afetadas, uma vez que é transmitida pelos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (ZANLUCA et al., 2015).

Os sintomas das pessoas infectadas por ZIKV são bastantes similares à dengue e à Chikungunya, por isso o diagnóstico real de pacientes com essa doença torna-se dificultado. Entretanto, o Ministério da Saúde do Brasil aponta para os casos de febre acompanhada de exantema pruriginoso como indicativos de suspeita de infecção por SCZV (LUZ; SANTOS; VIEIRA, 2015).

Uma das maiores preocupações no que tange a SCZV é a sua relação com a ocorrência de microcefalia em recém-nascidos (SALGE et al., 2016). O Brasil foi o primeiro país a identificar essa possível relação, ao analisar mães durante a gestação, no período de agosto e outubro de 2015. Dos 35 primeiros casos notificados de microcefalia no Brasil, 25 apresentaram microcefalia severa, e todas as mães residiam ou visitaram áreas infectadas com o vírus. Os testes identificaram a presença da SCZV em amostras cerebrais dos recém-nascidos (SCHULER-FACCINI et al., 2016). Até a SE 34 de 2020, foram notificados 5.959 casos prováveis de SCZV, sendo que a região Nordeste ainda apresentou a maior taxa de incidência (7,3 casos/100 mil habitantes) (MEDEIROS et al., 2020a).

3.2 A QUIMIORRECEPÇÃO EM INSETOS

Naturalmente, todos os seres vivos precisam manter fortes interações com o ecossistema ao qual fazem parte, a fim de garantir-lhes a sobrevivência. Nesse sistema complexo de troca de informações, os insetos desenvolveram ao longo de 600 milhões de anos um processo de comunicação singular. Já parou para pensar como formigas, abelhas, vespas e cupins se reconhecem e realizam tarefas dentro de suas colônias? Ou por que a nossa pele é praticamente “irresistível” para a maioria dos mosquitos? Ou até mesmo por que as moscas são magicamente atraídas por frutas? Esses comportamentos são mediados pelo reconhecimento de compostos orgânicos voláteis (semioquímicos)¹ presentes no ambiente. Os exemplos citados anteriormente, ilustram a importância do olfato para a maioria dos insetos. A capacidade de identificar e reconhecer diferentes odores é extremamente vital para a existência desses invertebrados, uma vez que sinais químicos distintos podem fornecer informações cruciais sobre fontes de alimentos, localização de presas e acasalamento (VILELA; LUCIA, 2001).

Desde a descoberta do primeiro feromônio sexual, isolado das glândulas do Bicho-da-seda (*Bombyx mori*) (BUTENANDT, 1959), avançamos cada vez mais na compreensão da neurobiologia olfativa dos insetos por meio de abordagens biológicas, bioquímicas e fisiológicas celulares. Os mecanismos moleculares responsáveis pelo reconhecimento de odores nesses organismos serão brevemente abordados nas seções posteriores.

1 Nordlund e Lewis (1976) utilizaram o termo *Semioquímicos* (que significa “sinais químicos”) pela primeira vez para se referirem às substâncias químicas responsáveis pela comunicação entre os organismos. Entretanto, houve um consenso de que o termo semioquímico é amplo, englobando tanto as substâncias responsáveis pela comunicação, quanto as toxinas e os nutrientes. Desta forma, Dicke e Sabelis (1988) criaram o termo *Infoquímicos* para enfatizar a diferença entre essas categorias.

3.2.1 A Transdução do Sinal Olfativo

As antenas dos insetos são os órgãos mais importantes para a detecção de odores. São estruturas caracterizadas geralmente por três segmentos – escapo, pedicelo e flagelo –, que apresentam estruturas quitinosas, denominadas de sensilas. A morfologia das sensilas pode ser diversa, compartilhando um certo grau de organização e funções. As sensilas olfativas são responsáveis por abrigar um número variável (1-50) de Neurônios Sensoriais Olfativos (OSNs, do inglês *Olfactory Sensory Neurons*) em seu interior (ZACHARUK, 1980).

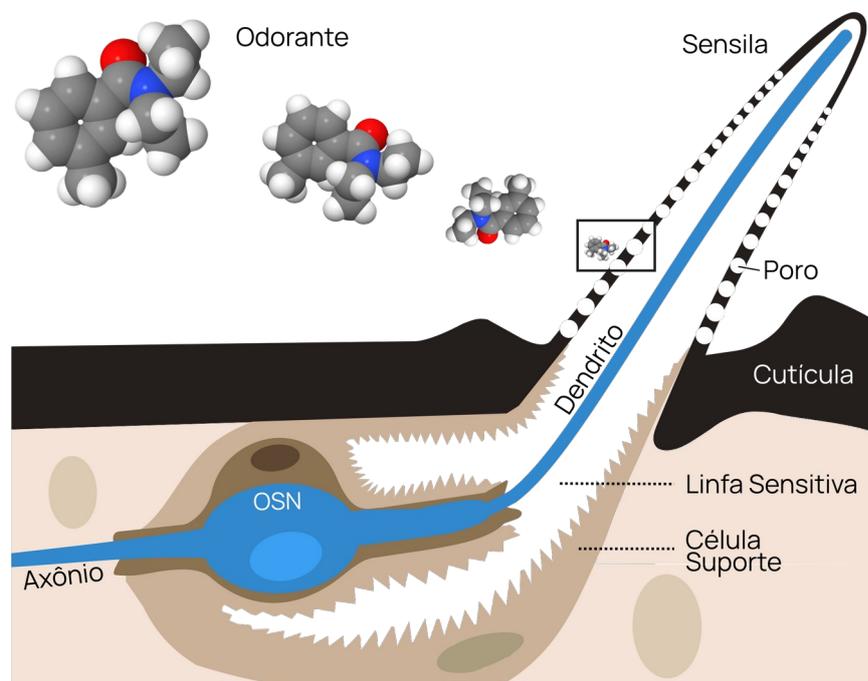
A identificação de moléculas voláteis presentes no ar ocorre pelas sensilas olfativas, cada qual apresentando uma cavidade distal preenchida por um líquido aquoso denominado de “linfa sensitiva”, onde estão presentes os OSNs (Fig. 4). Os poros existentes na superfície da cutícula permitem a passagem de moléculas odorantes até as terminações dendríticas dos OSNs, onde o sinal químico é transduzido em impulso elétrico neural. A duração do percurso entre a chegada das moléculas voláteis até o interior da sensila e sua interação com a membrana dos dendritos dos OSNs é primordial para que a reação da célula diante de mudanças na concentração do odor seja quase imediata (SACHSE; KRIEGER, 2011). Além do mais, esse sistema requer um rápido desaparecimento das moléculas de estímulo para deixá-lo disponível à detecção de novos sinais (LORENZO; MELO, 2012). Esse é um processo que ocorre em três níveis:

- O primeiro nível na seleção de odores é atribuído a pequenas proteínas globulares solúveis que, em referência ao seu modo de ação, estão sendo chamadas de “encapsulinas” – as Proteínas de Ligação a Odorantes (OBPs) e as Proteínas Quimiossensoriais (CSPs). Sua função principal é a de transportar moléculas odorantes através da linfa. As OBPs são proteínas de baixo peso molecular (aproximadamente 14 kDa), constituídas de 120 a 150 aminoácidos com seis resíduos de cisteína formando seis pontes dissulfeto, responsáveis por estabilizar a sua estrutura tridimensional. Já as CSPs possuem cerca de 12-13 kDa e quatro resíduos de cisteína conservadas (PELOSI; CALVELLO; BAN, 2005; LEAL, 2013).
- O segundo nível diz respeito ao reconhecimento e ao desencadeamento dos sinais elétricos, que ocorrem devido aos receptores quimiossensoriais. Até agora, são conhecidos três tipos de receptores quimiossensoriais em insetos – (i) Receptores de Odor (ORs, do inglês *Odorant Receptors*); (ii) Receptores Gustativos (GRs, do inglês

Gustatory Receptors); e (iii) Receptores Ionotrópicos (IRs, do inglês *Ionotropic Receptors*).

- O terceiro nível no processo de transdução do sinal olfativo tem relação com a rápida recuperação do sistema para receber novos estímulos. Vários estudos indicam a participação de Enzimas Degradoras de Odor (EDOs) nesse processo (VOGT; RIDDIFORD, 1981; ISHIDA; LEAL, 2005; LEAL, 2013).

Figura 4 – Representação esquemática de uma sensila olfativa.



(Fonte: Adaptado de SUH, BOHBOT; ZWIEBEL, 2014).

3.2.1.1 Proteínas de Ligação a Odorantes

A primeira OBP foi identificada em 1981 por Vogt e Riddiford a partir de estudos envolvendo o bicho-da-seda (VOGT; RIDDIFORD, 1981). Pesquisadores conferem atenção especial às OBPs devido a sua grande diversidade e por estarem estritamente ligadas ao transporte de odores. Por serem relativamente pequenas e expressas em alta concentração nas antenas dos insetos, já foram depositadas mais de 2.000 sequências de aminoácidos de OBPs no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Essas proteínas possuem estruturas tridimensionais compactas, que são particularmente resistentes a desnaturação térmica. (PELOSI, 1994; PAOLINI et al., 1999). Por esse motivo, torna-se possível combinar

diferentes métodos experimentais e computacionais para a previsão de suas estruturas, bem como a realização de estudos para a descoberta de possíveis ligantes.

Sandler et al. (2000) relataram a primeira estrutura cristalina de uma OBP após 19 anos dos estudos realizados por Vogt e Riddiford. O artigo trata da PBP1 (sigla utilizada para Proteína de Ligação a Feromônios) do *B. mori* e suas interações com o feromônio sexual bombykol [(*E*, *Z*)-10,12-hexadecadien-1-ol]. Até o momento, existem mais de 75 estruturas de OBPs de insetos resolvidas por NMR e cristalografia de raios-X que foram depositadas no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB).

A subfamília de OBPs clássicas são as mais estudadas até o momento, apresentando 6 α -hélices conectadas por 3 pontes dissulfeto de acordo com um padrão C1-X₂₅₋₃₀-C2-X₃-X₃₆₋₄₂-C4-X₈₋₁₄-C5-X₈-C6 (XU; ZWIEBEL; SMITH, 2003). Entretanto, já foram identificadas OBPs em outras espécies de insetos, como na barata alemã (*Blattella germanica*), que possuem quatro cisteínas (chamadas de Minus-C) e oito cisteínas (chamadas de Plus-C) (ROBERTSON et al., 2018). As estruturas cristalizadas das OBPs clássicas geralmente assumem uma forma dimérica com uma cavidade de ligação que consiste em um túnel que se estende em cada uma das duas subunidades (LEITE et al., 2009; WOGULIS et al., 2006).

3.2.1.2 Receptores de Odor

Denominam-se como Receptores de Odor (ORs, do inglês *Odorant Receptors*), as proteínas do tipo GPCRs (Receptores Acoplados à Proteína G, do inglês *G Protein-Coupled Receptors*) constituídas de sete domínios transmembrana, que apresentam uma topologia na membrana celular caracterizada pela porção amino terminal voltada à região intracelular (BENTON et al., 2006; LUNDIN et al., 2007). Essa singularidade, bem como a ausência de homologia com os receptores olfativos acoplados à proteína G de vertebrados torna os ORs de insetos distintos das GPCRs clássicas (MOMBAERTS, 1999; WISTRAND; KALL; SONNHAMMER, 2006). O número de genes que codificam os ORs varia de acordo com as diferentes espécies de insetos. Por exemplo, para a mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*), aproximadamente 60 ORs foram relatados (ROBERTSON; WARR; CARLSON, 2003), 131 para o *Ae. Aegypti* (BOHBOT et al., 2007) e 48 para o *B. mori* (WANNER et al., 2007).

Segundo Vosshall e Hansson (2011), os neurônios olfativos co-expressam dois tipos de receptores – um co-receptor olfativo chamado de Orco e um OR propriamente dito. Com os

ORs nos insetos funcionando como heterodímeros, a especificidade e resposta frente a um odor é garantida (LARSSON et al., 2004; NAKAGAWA et al., 2005). Em contraste com os ORs, o Orco é amplamente expresso nos OSNs, sendo invariante em sequência através de linhagens de insetos distantes. Assim, os ORs não são funcionais na ausência de um Orco (BENTON et al., 2006). Por esse motivo, Missbach et al. (2014), sugerem que o Orco pode representar a forma ancestral dos ORs de insetos evolutivamente basais.

Uma limitação que torna o estudo sobre a quimiorrecepção em insetos veemente dificultado é o pouco conhecimento sobre as características estruturais e funcionais mais elementares dos ORs, em função desses receptores não possuírem homologia com qualquer outra família de proteínas. Entretanto, recentemente foi publicado um trabalho que pode servir como base para o avanço na compreensão das bases moleculares da olfação nos insetos – o primeiro Orco pertencente a uma espécie de vespa do figo (*Apocryta bakeri*) foi depositado no PDB sob o código 6C70 (<https://www.rcsb.org/structure/6C70>). Butterwick et al. (2018), utilizaram o método de microscopia eletrônica para revelar a estrutura tridimensional do Orco que forma um canal tetramérico composto por quatro domínios transmembrana.

Saberì e Seyed-allaei (2016) utilizaram uma formulação matemática para prever o volume e a flexibilidade estrutural dos sítios de ligação dos ORs de *D. melanogaster*, e formularam a hipótese que a afinidade de um par receptor-odorante é afetada pelos seus tamanhos relativos. Ainda, Choo et al. (2018) aplicaram uma abordagem de ecologia química reversa para mapear compostos ativos para 7 ORs expressos nas antenas de *Culex quinquefasciatus*. Eles confirmaram por registros de eletroantenograma que o acetaldeído ativa o Receptor Olfativo 36 do *Culex quinquefasciatus* (CquiOR36) como um feromônio de oviposição.

3.2.1.3 Receptores Ionotrópicos

Uma família de receptores altamente conservados nas antenas da *D. melanogaster* foi recentemente descoberta: os Receptores Ionotrópicos (IRs, do inglês *Ionotropic Receptors*). Homólogos aos clássicos Receptores Ionotrópicos de Glutamato (iGluRs), mas especializados na percepção de aminas, ácidos orgânicos e álcoois, os IRs podem atuar como canais iônicos, formando complexos heteroméricos com um ou mais co-receptores para realizar as suas funções fisiológicas (BENTON et al., 2009; KAUPP, 2010; ABUIN et al., 2011; SILBERING et al., 2011). Posteriormente, os IRs foram relatados em várias outras espécies de insetos, tais

como mosquitos, mariposas, borboletas e gafanhotos (CROSET et al., 2010; GUO et al., 2013; CHEN et al., 2017; YIN, et al., 2020).

De acordo com Raji et al. (2019), os mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti* não são atraídas pelo ácido láctico (um composto comportamentalmente ativo no suor humano) quando o co-receptor Ir8a presente nas suas antenas é bloqueado. Isso indica que a localização de hospedeiros pelo mosquito pode ser dependente dos IRs. De forma similar, a lagarta do norte (*Mythimna separata*), uma das principais pragas do milho na Ásia, detecta o ácido láctico pelos receptores ionotrópicos MsepIR8a, MsepIR64a, MsepIR75q1 e MsePIR75q2 (TANG et al., 2020).

3.2.1.4 Receptores Gustativos

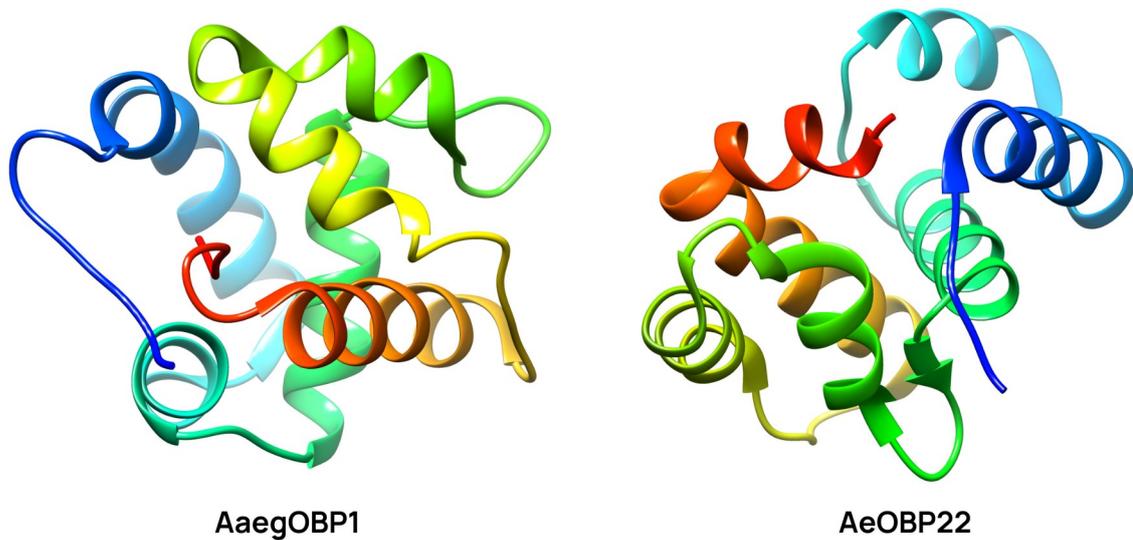
Os insetos são capazes de diferenciar substâncias doces e amargas por meio de Neurônios Sensoriais equipados com Receptores Gustativos (GRs, do inglês *Gustatory Receptors*) que residem na sensila gustativa do aparelho bucal, nos tarsos e nas asas (HALLEN; DAHANUKAR; CARLSON, 2006). Cerca de 68 GRs foram identificados em *D. melanogaster* e, pelo menos 4 destes, encontram-se expressos nos OSNs da antena (SCOTT et al., 2001; THORNE; AMREIN, 2008). Em particular, os receptores gustativos GR21a e GR63a da *D. melanogaster* são primordiais para o reconhecimento de CO₂, uma substância usada pelo inseto para encontrar alimentos fermentados (JONES et al., 2007).

Os mosquitos hematófagos podem usar o CO₂ exalado para localizar hospedeiros humanos e se alimentarem. Os GRs de *Ae. Aegypti* (GR1, GR2 e GR3) e *A. gambiae* (GR22, GR23 e GR24), expressos nos palpos maxilares, podem reagir tanto ao CO₂ quanto aos odores da pele (LU et al., 2007; ROBERTSON; KENT, 2009). Estudos também apontam a participação dos GRs na detecção de repelentes de insetos, como o DEET (SANFORD; SHIELDS; DICKENS, 2013).

3.3 OBPS DO *AEDES AEGYPTI*

Até o momento, duas OBPs do mosquito *Ae. aegypti* tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas, a AaegOBP1 (PDB: 3K1E) e a AeOBP22 (PDB: 6OII) (Fig. 5).

Figura 5 – Estruturas tridimensionais das OBPs do *Ae. aegypti* resolvidas por cristalografia de raios-X, atualmente depositadas no PDB. A proteína AaegOBP1 possui 6 α -hélices, enquanto que a proteína AeOBP22 possui 7.



(Fonte: Elaborado pelo autor).

A AaegOBP1 é uma proteína com 125 aminoácidos, que compartilha 82% de identidade com a OBP1 (AgaOBP1) do mosquito transmissor da malária, *A. gambiae* (BIESSMANN et al., 2002). Sua estrutura geral é similar às OBPs clássicas, com 6 α -hélices conectadas por três pontes dissulfeto, em que a cavidade de ligação é formada pelos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos Phe15, Leu58, Phe59, Ala62, Val64, Leu73, Leu76, Ala79, Leu80, Ala88, Leu89, Gly92, Leu96, Phe123, Leu124 e Ile125 das hélices 1, 3, 4 e 5. O terminal-C bloqueia parte da cavidade, sendo um possível liberador de ligantes (LEITE et al., 2009). Não obstante, a AeOBP22 tem sido apontada como a principal reguladora de comportamentos alimentares do mosquito. Sendo expressa nas glândulas reprodutivas dos machos, nas antenas das fêmeas e nas glândulas salivares, essa proteína é capaz de se ligar com ácidos graxos de cadeia longa (> 12 átomos de carbono). Contrariamente às demais OBPs que formam dímeros para regular a ligação e o transporte de ligantes, a AeOBP22 é monomérica em solução, mas compartilha uma estrutura semelhante às OBPs clássicas. O sítio de ligação é um túnel com aproximadamente 20 Å de comprimento e volume de $144 \pm 10 \text{ \AA}^3$ (WANG et al., 2020).

3.4 ESTUDOS *IN SILICO* COM OBPS

No âmbito experimental, a cristalografia de raios-X e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) são as técnicas mais acuradas atualmente para análises referentes à determinação de

estruturas 3D de proteínas, bem como para estudos relacionados às interações de proteína-ligante. Entretanto, apesar desses artifícios fornecerem informações estruturais de alta precisão, eles são consideravelmente caros e demorados. Nesse sentido, as abordagens da Química Computacional e da Bioinformática (estudos *in silico*) têm contribuído de forma relevante como ferramentas complementares às técnicas experimentais.

Abordagens baseadas em algoritmos de Bioinformática, tais como a modelagem de proteínas por homologia, têm permitido, em muitos casos, a elucidação das características estruturais de OBPs (VENTHUR et al., 2014). Combinado a esse tipo de metodologia, muitos autores também estão utilizando Dinâmica Molecular e Docking Molecular para explicar os mecanismos de ligação OBPs-odorantes (TIAN; LIU; ZHANG, 2016; YANG et al, 2017). Desta forma, a identificação de semioquímicos, a previsão da estrutura tridimensional das OBPs e seus mecanismos de ligação, têm proporcionado inúmeras aplicações biotecnológicas, tais como a descoberta de novos repelentes, controle de pragas e o desenvolvimento de biossensores (BRITO et al., 2020).

Honson et al. (2003) foram os primeiros a realizar estudos sobre modelagem por homologia com OBPs. Os autores usaram o servidor SWISS-MODEL para modelar a LmarPBP1 (143 aminoácidos) e a LmarPBP2 (145 aminoácidos) da lagarta-do-sobreiro, *Lymantria dispar*, considerada uma séria praga de diversas árvores e arbustos. Os modelos 3D das proteínas foram gerados a partir da PBP1 do *B. mory* (SANDLER et al., 2000). A modelagem molecular também foi utilizada para a previsão das estruturas de OBPs de gafanhotos (JIANG et al., 2009), de pulgões (ZHONG et al., 2012), de lagartas (LIU; HE; DONG, 2012), e de mosquitos (PARAMASIVAN et al., 2007; RUSCONI et al., 2012).

3.5 REPELENTE DE INSETOS

Tendo em vista a carência de vacinas e medicamentos específicos disponíveis para o tratamento de doenças transmitidas por vetores, é recomendável evitar a interação de insetos com humanos por meio de medidas profiláticas. A prevenção de picadas de mosquitos pode ser controlada por vias físicas, químicas e biológicas. Exemplos de controle físico de vetores incluem a utilização de roupas claras com mangas compridas, combate aos focos que podem se tornar possíveis criadouros de mosquitos e utilização de redes em dormitórios (BRASIL, 2017). Por via química, recomenda-se a pulverização generalizada de inseticidas em áreas endêmicas, bem como a aplicação de repelentes na pele ou nas roupas. O controle biológico pode ser realizado adicionando peixes e bactérias não patogênicas que consomem as larvas de

mosquitos em reservas de água (BODHE; WADHAI, 2018); também pela modificação genética dos machos para transmitirem genes fatais aos seus descendentes (JOHNSON, 2015) ou pela transferência de um agente indutor de infertilidade para as fêmeas (LOCROIX et al., 2012).

Os repelentes são amplamente utilizados como medida profilática no combate de mosquitos e outros artrópodes devido a sua eficácia e grande variedade disponível no mercado. No meio rural, a fumaça emitida pela queima de plantas ainda é bastante utilizada para afastar insetos. (MOORE; DEBBOUN, 2006). Um repelente é uma substância orgânica odorífera que age comumente na sua fase de vapor a fim de aumentar a eficácia do sinal químico transmitido.

3.5.1 Principais repelentes de insetos

Embora a fumaça gerada pela queima de diferentes tipos de vegetação ou madeira, tais como cascas de coco (*Cocos nutifera*), madeira da manga silvestre (*Mangifera spp*) e gengibre selvagem (*Alpinia spp*) (VERNÈDE; MEER; ALPERS, 1994) seja eficaz para a repelência de artrópodes, a sua produção contínua pode gerar incômodos às famílias que moram em residências próximas. Nesse sentido, foram necessários o desenvolvimento de métodos mais modernos de repelir insetos, tais como os repelentes de uso pessoal. Antes da década de 1940, quatro compostos eram largamente utilizados pela população para a repelência de insetos – o óleo de citronela, o ftalato de dimetila, o indalone e o etohexadiol (PETERSON; COATS, 2001). Hoje em dia, os repelentes mais comuns e eficientes são o DEET, a Icaridina, o IR3535 (sintéticos) e o PMD (natural), que são descritos brevemente nas seções seguintes.

3.5.1.1 DEET

O N,N-Dietil-3-Metilbenzamida (DEET) é um dos repelentes mais eficazes atualmente disponíveis no mercado (GOODYER et al., 2010). Sintetizado pelo exército dos Estados Unidos da América (EUA) em 1946, o DEET ainda é usado como base para o desenvolvimento de outros princípios ativos eficientes para a repelência de insetos. Estima-se que cerca de 120 produtos fabricados por 30 empresas registradas na Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, do inglês *United States Environmental Protection*

Agency) utilizam o DEET em sua composição (EPA, 2017).

O DEET foi projetado para ser aplicado diretamente na pele, estando disponível em concentrações que variam de 5 a 99% nos produtos comerciais. Entretanto, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC, *Center for Disease Control and Prevention*) recomenda o uso de produtos contendo DEET com concentrações $\leq 50\%$, em que o platô da sua eficácia é alcançado (BUESCHER et al., 1983).

Apesar dessa substância não representar riscos à saúde humana, grande parte da população evita o uso do DEET na pele alegando que esta possui propriedades indesejáveis, tais como odor desagradável (MAIA; MOORE, 2011); ainda, populações que vivem em regiões endêmicas estão sujeitas a inúmeros problemas socioeconômicos, e não conseguem pagar pelo uso diário de repelentes. Assim, com o aumento da densidade de vetores em áreas urbanas e rurais, a sociedade atual é desafiada com a descoberta de repelentes alternativos mais eficazes e baratos que o DEET (KATZ et al., 2008).

3.5.1.2 Icaridina

A Icaridina [2-(2-hidroxiethyl)-1-ácido piperidinocarboxílico 1-metilpropil éster] ou KBR 3023 (nome comercial), é um princípio ativo derivado da pimenta tão eficaz quanto o DEET em concentrações de 20 a 25% (YAP et al., 1998; CARROLL et al., 2008; GOODYER; SCHOFIELD, 2018). Ao contrário do DEET, a Icaridina é uma substância inodora e não oleosa quando aplicada na pele, sendo um repelente bastante atrativo para as pessoas (KATZ; MILLER; MILLER, 2008).

Esse composto foi usado pela primeira vez na Europa em 2001 e introduzido nos EUA há pouco mais de 15 anos. Ele é eficaz contra as picadas de várias espécies de mosquitos, moscas e carrapatos. O tempo de proteção é variável, já que devem ser considerados fatores como a temperatura, a concentração e a espécie do inseto. Por exemplo, Xue e Barnard (2004) testaram a repelência da Icaridina em uma concentração de 10% para três espécies de mosquitos: *Aedes albopictus*, *Culex nigrapalpus* e *Ochlerotatus triseriatus*. O tempo de proteção nesse estudo variou entre 4 e 8h. Por outro lado, Pretorius et al. (2003), relataram que o composto apresentou efeitos repelentes por apenas 1h para carrapatos da espécie *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae).

3.5.1.3 IR3535

O IR3535 (Butilacetilaminopropionato de etila) é um composto estruturalmente similar à β -alanina, um aminoácido de ocorrência natural. Esse repelente sintético é um óleo incolor e quase inodoro, tendo ampla eficácia contra mosquitos, carrapatos, piolhos e outros insetos. Introduzido no mercado americano em 1999, atualmente também é caracterizado como biopesticida pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*) (EPA, 2008).

Produtos contendo IR3535 em concentrações de 10 e 20% apresentaram repelência média de 1,5-2,8h para *Ae. aegypti* e 3,5-6,5h para *Cx. quinquefasciatus*, sendo praticamente equivalente ao DEET (20%) (CILEK; PETERSEN; HALLMON 2004). Para o mosquito *Aedes taeniorhynchus*, um transmissor da Encefalite Equina Venezuelana (TURELL; LUDWIG; BEAMAN, 1992), o tempo médio de proteção completa foi estimado em 3h (BARNARD et al., 2002).

3.5.1.4 Permetrina

A Permetrina é uma substância largamente utilizada como medicamento para o tratamento de sarna e piolhos (aplicado na pele como uma loção ou creme); bem como inseticida, quando pulverizada nas roupas ou nos mosquiteiros. Pode ser usada no âmbito da agricultura para matar parasitas do gado e para proteger as plantações de milho, algodão, trigo e alfafa, entretanto deve ser tratada com cautela, já que o composto é letal para alguns insetos essenciais, como as abelhas. É também usada na indústria têxtil como forma de prevenir o ataque de insetos a produtos feitos de lã. A permetrina é comercializada como um repelente, mas atua exclusivamente como inseticida, incapacitando ou matando os insetos antes que eles possam picar. Existem quatro estereoisômeros da permetrina, dos quais dois [(1R, 3S)-*trans* Permetrina e (1R, 3R)-*cis* Permetrina] são responsáveis pelas suas propriedades inseticidas (CAROLINE, 1999).

3.5.1.5 Repelentes naturais

Repelentes à base de plantas ainda são bastante usados pelas comunidades mais pobres que vivem nas zonas rurais tropicais para afastar mosquitos e outros insetos (MOORE;

LENGLET; HILL, 2006). Novos repelentes naturais podem ser descobertos (1) por meio da etnobotânica, em que são realizadas entrevistas estruturadas e a coleta de amostras das plantas (CASAS et al., 2001); e (2) por intermédio da bioprospecção, onde é feita uma triagem em massa de plantas para o estudo de sua atividade. Em particular, este segundo método permitiu o descobrimento do ρ -metano 3,8-diol (PMD) na década de 1960 (NAVES; OCHSNER; 1969), um dos constituintes do óleo de eucalipto-limão (*Corymbia citriodora*), que se encontra atualmente disponível no mercado.

O CDC aprovou o uso do PMD como repelente em abril de 2005, ao qual demonstra proteção comprovada para mosquitos da espécie *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* e *Ochlerotatus* (CARROLL; LOYE, 2006). O composto possui baixa toxicidade aguda por via oral, inalatória e dérmica (EPA, 2000), e várias rotas de sínteses naturais e sintéticas já foram elucidadas (MPUHLU, 2007; RUST, 2009; DRAPEAU et al., 2011). É uma substância incolor e proporciona uma sensação refrescante, apresentando um odor semelhante ao mentol (LEFFINGWELL, 2018). Apesar dos ingredientes ativos do eucalipto-limão serem altamente voláteis, evaporando rapidamente após aplicação na pele, isso não acontece com o PMD devido a sua baixa pressão de vapor em comparação com as demais monoterpenos encontrados na maioria dos óleos vegetais (BARASA et al., 2002). Por esse motivo, o PMD (30%) exibe um tempo de proteção e de meia-vida semelhante ao DEET (20%) (GOODYER et al., 2020).

Apesar do PMD não ser tóxico, os usuários do repelente devem tomar cuidados especiais durante a aplicação, já que o composto causa irritação ocular. Nesse sentido, é recomendável que este não seja aplicado no rosto ou nas mãos de crianças menores de 3 anos. Ao longo do tempo pesquisadores têm tentado otimizar a atividade estrutural do PMD. Barasa et al. (2002) sintetizaram 3 estereoisômeros do PMD – [1] (+)(*trans*)- ρ -metano-3,8-diol, [2] (-)(*cis*)- ρ -metano-3,8-diol, [3] (+)(*cis*)- ρ -metano-3,8-diol – aos quais todos tiveram atividade repelente contra o *An. gambiae*. Um outro estudo avaliou os efeitos do PMD (20%) no comportamento do *Ae. Aegypti*, mais especificamente no que diz respeito à alimentação e à fecundidade do mosquito. Nesse caso, houve uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$) no percentual de mosquitos que se alimentaram com sangue (38%) quando expostos ao repelente, em comparação com os não expostos (49%). Por outro lado, nenhuma mudança considerável foi observada na densidade de postura dos ovos dos mosquitos expostos e não expostos ao repelente (LEE et al., 2018).

Os óleos essenciais à base de plantas do gênero citronela (*Cymbopogon nardus*) são bastante populares na Europa e na América do Norte, sendo vendidos no mercado em

concentrações que variam de 5-10% e garantem proteção máxima de até 2h contra mosquitos. Essa concentração mais baixa em relação aos repelentes tradicionais ocorre porque os compostos de citronela podem causar sensibilidade na pele em concentrações >10%. Os princípios ativos comuns da citronela são o citronelal, o citronelol, o geraniol, o α -pineno e o limoneno. A volatilidade desses compostos pode ser diminuída ao misturar o óleo essencial com uma molécula de vanilina (5%), aumentando o tempo médio de proteção (TAWATSIN et al., 2001); outra técnica utilizada para prolongar o efeito dos repelentes naturais à base de citronela é a microencapsulação (SPECOS et al., 2010).

Ao analisar 10 óleos essenciais de uma planta nativa do continente Africano, popularmente conhecida como Gerânio-Cheiroso, *Pelargonium graveolens* (Geraniaceae), Tabanca et al. (2013) descobriram que uma das amostras, o 10-epi-gama-Eudesmol, repeliu >90% dos carrapatos da espécie *Amblyomma americanum* (L.), equiparando-se ao DEET. Pesquisas desse tipo são importantes para o aumento da variedade de princípios ativos naturais sobremaneira eficientes para evitar a interação de insetos com humanos.

3.5.2 O mecanismo de ação do DEET

Para a síntese ou descoberta de novos repelentes realmente eficientes e acessíveis, é necessário um conhecimento profundo sobre as bases moleculares da olfação em insetos, bem como o entendimento sobre o modo de ação das substâncias repelentes atualmente disponíveis, tal como o DEET. O estudo da biologia vetorial, especialmente no que se refere aos modos de reconhecimento de odores em artrópodes é extremamente dificultado devido aos modos diferentes de comportamentos dos insetos. Por exemplo, as três principais espécies de mosquitos hodiernamente investigadas nesse contexto são o *Cx. quinquefasciatus*, o *Ae. aegypti* e o *An. gambiae*. No entanto, a biologia, o comportamento e a ecologia química dessas três espécies são tão distintos, que não seria uma surpresa se o seu modo de ação para a detecção do DEET não fosse universal (LEAL, 2014).

Um dos primeiros modelos sugeridos para o modo de ação do DEET foi proposto por McIver (1981). De acordo com o autor, o repelente participa na ativação indireta dos receptores olfativos do mosquito *Ae. aegypti*, interagindo com os lipídeos da membrana celular dos neurônios quimiossensoriais do inseto devido à sua polaridade e, por conseguinte, alterando a função dessa membrana. No entanto, estudos posteriores por meio de ensaios eletrofisiológicos de sensilas de insetos desafiaram o modelo de McIver, uma vez que estes

apontavam para uma possível modulação do DEET em alvos moleculares específicos (DITZEN; PELLEGRINO; VOSSHALL, 2008; BOHBOT; BOHBOT; DICKENS, 2010).

Atualmente, por meio de uma combinação de genética comportamental e abordagens eletrofisiológicas, os pesquisadores estão propondo três hipóteses para o modo de ação do DEET. Em um primeiro nível, as moléculas responsáveis pelo odor humano, tais como o ácido láctico ($C_3H_6O_3$), o dióxido de carbono (CO_2), e outros cairomônios² atraem os insetos, ao se ligarem a receptores olfativos específicos e, conseqüentemente, provocarem a ativação dos OSNs (SMALLEGANGE et al., 2005; MCMENIMAN et al., 2014). Com a aplicação do DEET na pele, o repelente pode agir supostamente pela (1) inibição do odor do humano, bloqueando a ativação dos OSNs; (2) pela modulação da ativação dos receptores olfatórios pelo odor humano, alterando a codificação do odor e, conseqüentemente, mudando o padrão de ativação normal dos glomérulos presentes no lobo antenal; (3) pela interação com um OR específico, que provoca um sinal elétrico neural de aversão do inseto pela substância (DEGENNARO, 2015).

Estudos recentes envolvendo os receptores olfativos do *Cx. quinquefasciatus*, mais especificamente o CquiOR136, demonstraram que o DEET, a Icaridina, o PMD, o IR3535 e o Jasmonato de Metila são repelentes que interagem com esse receptor. Este ensaio sugeriu que apenas um único OR é relevante para a recepção do DEET e outros repelentes na fase de vapor (XU et al., 2014).

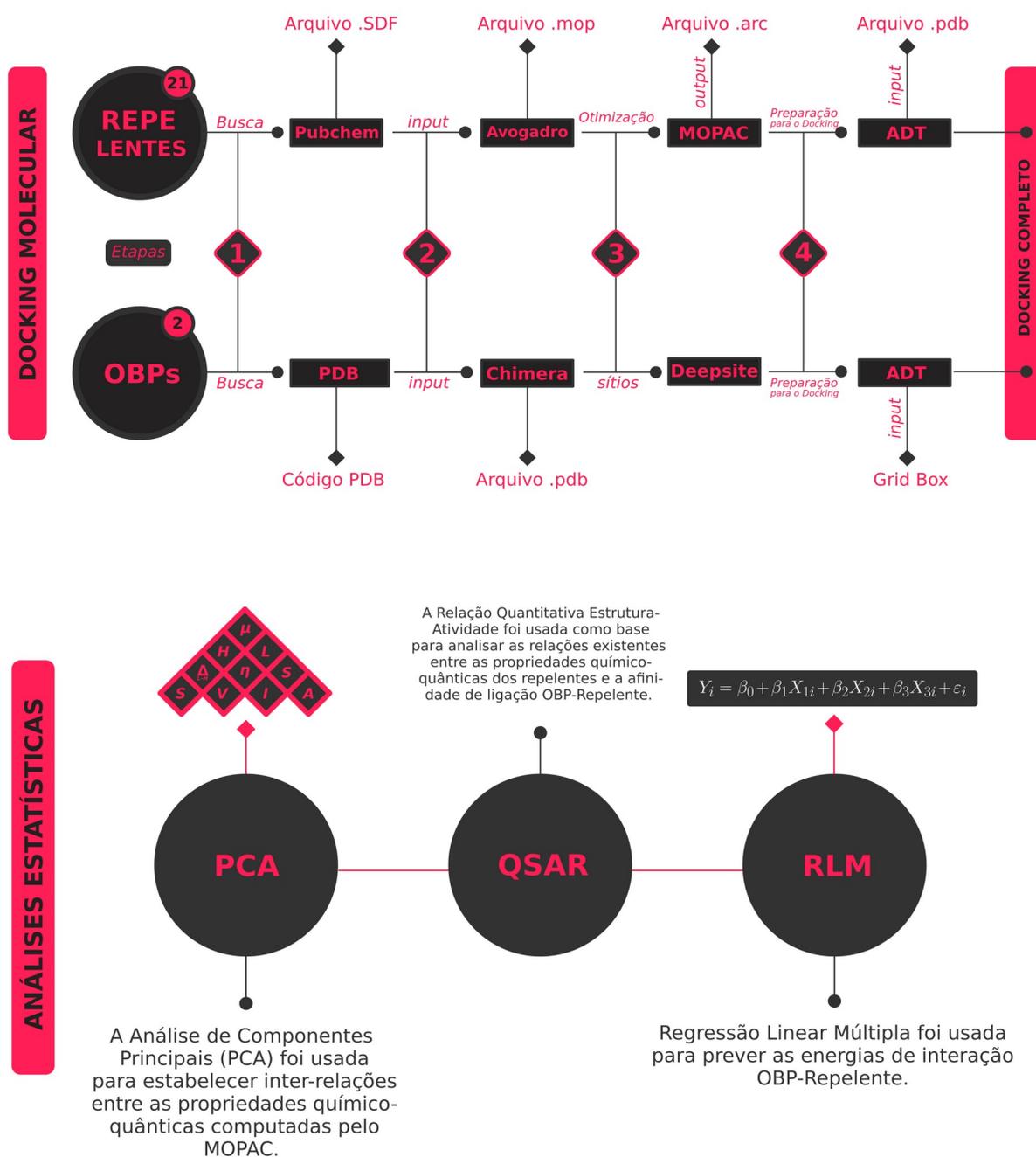
É fato que os mecanismos que permeiam o modo de ação dos repelentes de insetos ainda são uma questão em aberto na fisiologia, tendo em vista que devem-se considerar as três hipóteses sugeridas para o DEET. Ademais, é extremamente necessário a discriminação entre estas hipóteses a fim de que seja projetada a nova geração de repelentes.

2 Cairomônios estão classificados na categoria dos aleloquímicos. São substâncias que desencadeiam uma resposta comportamental favorável em outros indivíduos e provoca, no emissor do composto, uma reação danosa; isso ocorre quando são considerados organismos de espécies distintas (DICKE; SABELIS, 1988).

4 METODOLOGIA COMPUTACIONAL

A proposta central deste trabalho é analisar as interações entre as OBPs do mosquito *Ae. aegypti* e repelentes por meios de estudos *in silico*. A metodologia computacional (Fig. 6) utilizada é discutida nas seções a seguir.

Figura 6 – Infográfico resumindo a metodologia computacional utilizada neste trabalho.

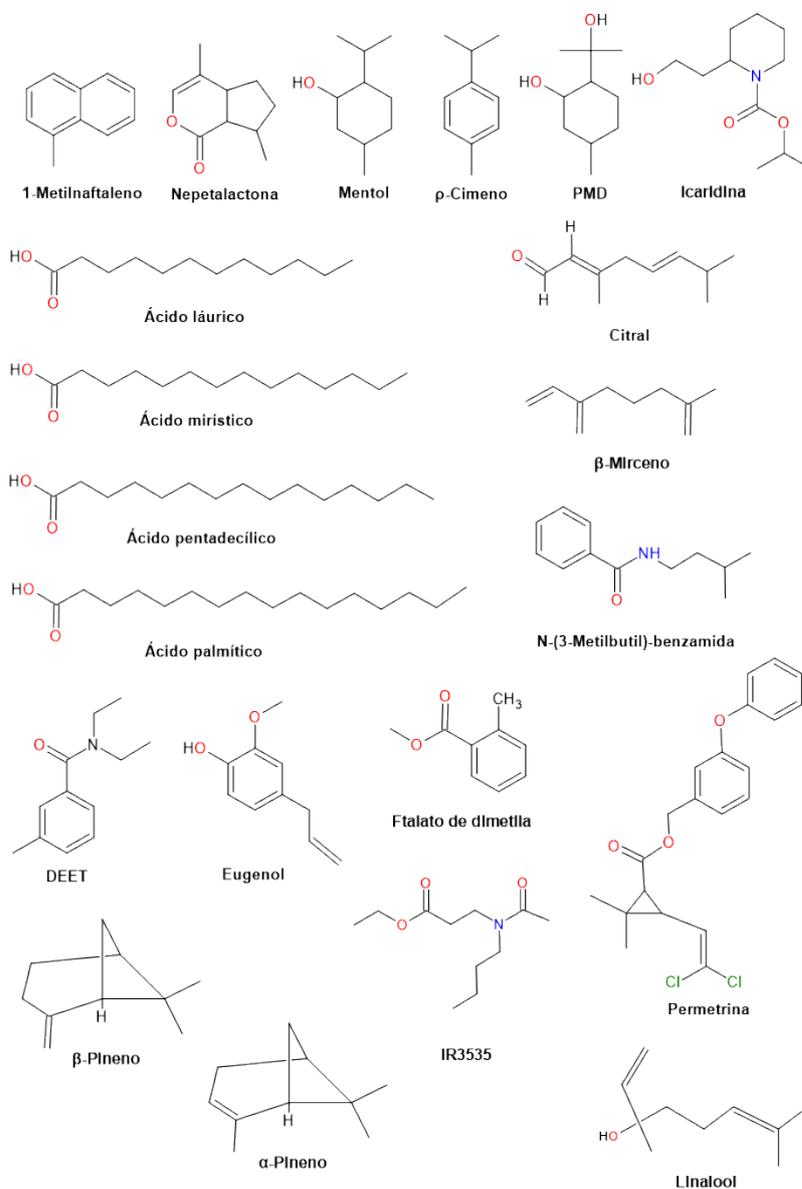


(Fonte: Elaborado pelo autor).

4.1 OTIMIZAÇÃO GEOMÉTRICA DOS REPELENTE

Inicialmente, foi feita uma busca na literatura por repelentes de insetos fisiologicamente ativos para a espécie *Ae. Aegypti*. Com isso, foi selecionado um conjunto de 21³ repelentes naturais e sintéticos do banco de dados de moléculas Pubchem (WANG et al., 2009) (Fig. 7). Os principais repelentes comerciais – DEET, PMD, IR3535 e Icaridina – foram inclusos no estudo. Em seguida, o sistema de coordenadas espaciais dos compostos foi obtido no formato .SDF e inspecionado visualmente no programa Avogadro (HANWELL et al., 2012).

Figura 7 – Estrutura molecular dos repelentes selecionados.



(Fonte: Elaborado pelo autor).

Os métodos de Química Quântica podem ser aplicados para descrever os tipos de interações entre um ligante e seu receptor biológico pela derivação direta das suas propriedades moleculares. Em Química Medicinal, por exemplo, esse tipo de metodologia é comumente aplicado no estudo das Relações Quantitativas entre a Estrutura Química e a Atividade Biológica (modelos QSAR, do inglês *Quantitative Structure–Activity Relationship*), ou entre as Propriedades Físico-Químicas (modelos QSPR, do inglês *Quantitative Structure–Property Relationship*) para a busca por novos fármacos.

Desta forma, realizaram-se estudos de análise conformacional para a otimização geométrica de cada repelente e para o cálculo das suas propriedades estruturais e eletrônicas: Momento de Dipolo (μ), Orbital Molecular Ocupado de Mais Alta Energia (HOMO), Orbital Molecular não Ocupado de Mais Baixa Energia (LUMO), *gap* HOMO-LUMO ($\Delta_{\text{H-L}}$), Dureza (η), Maciez (S), Volume Molecular (V), Energia Eletrônica (E), Afinidade Eletrônica (A) e Energia de Ionização (I). Tais descritores foram selecionados por serem mais comumente utilizados em estudos QSAR/QSPR (ARROIO; HONÓRIO; SILVA, 2010). Esses procedimentos foram realizados em um *Laptop* baseado em Linux, com processador core-i3 de 6ª geração utilizando o método quântico semiempírico *Parameterization Method 6* (PM6), combinado com o método de otimização padrão *Eigenvector Following* (EF) (BAKER, 1986), implementado no programa MOPAC/2016 (STEWART, 2016). A geometria de cada molécula foi obtida após o programa ter calculado os ciclos máximos para a convergência (ponto de parada). Além disso, as propriedades: pressão de vapor (P) e coeficiente de partição octanol/água ($\log P$) também foram selecionados como descritores importantes, estes obtidos do Pubchem.

Os métodos Químico Quânticos semiempíricos, tal como o PM6 utilizado neste trabalho, são capazes de descrever diversos problemas de natureza elétrica a nível atômico/molecular. Eles mesclam a teoria com resultados experimentais (por isso são denominados de semiempíricos) para reduzir o custo computacional envolvido nos cálculos.

A abordagem teórica empregada procura resolver aproximações às equações de Hartree-Fock-Roothaan (Eq. 1) por intermédio de parâmetros obtidos por ajuste numérico, ou derivados de resultados experimentais.

$$\text{FC}=\text{SC}\epsilon \quad (1)$$

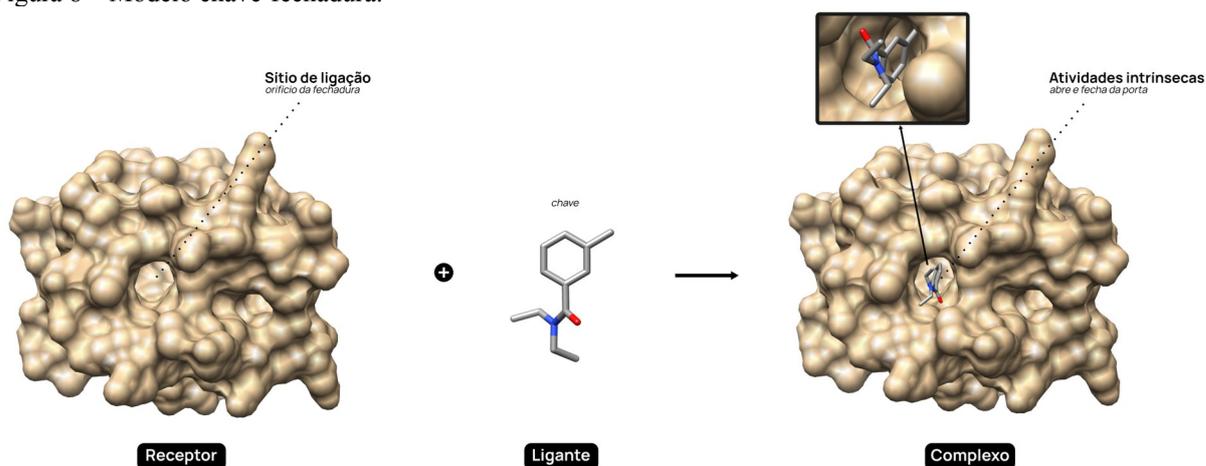
onde F é a matriz de Fock, C é uma matriz de coeficiente, S é uma matriz de sobreposição de base e ϵ é a matriz das energias dos orbitais.

4.2 DOCKING MOLECULAR

Docking Molecular (ou ancoragem molecular) é uma metodologia que auxilia na descrição *in silico* das interações químicas que podem ocorrer entre uma pequena molécula (ligante) e uma biomolécula (receptor), fornecendo estimativas da energia livre de ligação entre ambos. Quando uma simulação de Docking é realizada, são obtidas diferentes conformações espaciais (poses) do ligante no sítio ativo do receptor. A partir daí, cabe ao pesquisador selecionar a configuração mais provável para descrever as interações ligante-receptor; geralmente, a pose com a menor energia de ligação e RMSD (*Root-mean-square deviation of atomic positions*) $< 2 \text{ \AA}$ é a conformação mais favorável. Atualmente, existem uma gama de softwares e servidores disponíveis para estudos de Docking (SILVA; PEREIRA, 2020). Em um estudo de Docking é possível considerar a flexibilidade molecular do receptor e do ligante, o que pode aumentar consideravelmente o custo computacional; entretanto, esse tipo de tratamento é o mais indicado para simular a dinâmica do sistema. Uma forma simplificada de explicar o objetivo principal do Docking é imaginar o modelo chave-fechadura (Fig. 8) proposto por Emil Fischer em 1894 (FISCHER, 1984). Nesse modelo, o receptor seria a fechadura, o sítio ativo do receptor seria o orifício da fechadura, a chave seria o ligante, e o “abrir e fechar da porta” representariam as atividades intrínsecas relacionadas às interações receptor-ligante. Ligantes de naturezas diferentes podem interagir com um receptor eficientemente, mas apenas os agonistas são capazes de “abrir a porta” e desencadear uma resposta biológica no receptor; os ligantes que bloqueiam a resposta biológica podem ser considerados como uma “chave falsa”, pois apesar de terem acesso à “fechadura”, não podem “abrir a porta”.

Apesar do modelo chave-fechadura ser uma forma simples de descrever o Docking, os casos reais de interações receptor-ligante são extremamente complexos de prevêê-los ou descrevê-los, isso porque são inúmeras as variáveis envolvidas nesse processo. O reconhecimento molecular de uma proteína complexada depende das características estruturais do sítio de ligação do receptor e das moléculas interagentes, bem como das suas características físico-químicas. Geralmente, o grau de afinidade receptor-ligante é avaliado pelas forças intermoleculares envolvidas.

Figura 8 – Modelo chave-fechadura.



(Fonte: Elaborado pelo autor).

Neste trabalho, após a otimização geométrica dos 21 ligantes, as estruturas cristalográficas de raios-X dos receptores AaegOBP1 e AaeOBP22 foram obtidas do banco de dados *Protein Data Bank*, com os códigos PDB 3K1E e 6OII, respectivamente. Geralmente, as OBPs existem em solução como um dímero, mas podem se dissociar lentamente no monômero correspondente, tornando também a forma monomérica uma proteína ativa. Portanto, os monômeros (cadeia A) de cada OBP foram selecionados para os estudos de Docking. Após as proteínas terem sido baixadas em formato .PDB, elas foram inspecionadas visualmente no programa Chimera (PETTERSEN et al., 2004), onde os íons, os ligantes e as moléculas de água foram removidos do sistema. Em seguida, os sítios ativos de cada OBP foram previstos utilizando o servidor online DeepSite⁴.

Os arquivos de entrada (*input*) para o Docking foram preparados no programa Autodock Tools de acordo com os seguintes passos: (1) apenas os hidrogênios polares foram adicionados às proteínas; (2) cargas de Kollman foram incluídas e computadas por resíduo de aminoácido; (3) uma caixa de simulação (*grid box*) de 0,5 Å foi adicionada à cada OBP em seu respectivo sítio ativo, com as coordenadas espaciais previstas pelo DeepSite para AaegOBP1 [$x = 12.4$, $y = 42.4$, $z = 24.2$] e para AaeOBP22 [$x = 28.7$, $y = 24.5$, $z = 29.8$]. Logo em seguida, os arquivos foram salvos no formato .pdbqt; (4) os ligantes otimizados por PM6 foram devidamente preparados no formato .pdbqt; (5) por fim, o Docking Molecular foi realizado individualmente para cada ligante utilizando o programa Autodock 4.2, considerando os ligantes flexíveis e os receptores rígidos.

4 O servidor DeepSite permite que o usuário busque pelas coordenadas espaciais dos sítios ativos das proteínas modeladas ou já disponíveis no PDB. Está disponível em: <https://www.playmolecule.org/deepsite/>.

4.2.1 Interações receptor-ligante

O reconhecimento molecular proteína-ligante é mediado por um grande número de interações intra e intermoleculares, em que as mais importantes são as pontes de hidrogênio, as interações hidrofóbicas e as forças de van der Waals. A formação de um complexo é favorecida pela aproximação das superfícies apolares do sítio do receptor e do ligante, de modo que quando estes não estão interagindo entre si, possuem suas partes apolares solvatadas por camadas organizadas de moléculas de água. Com a aproximação das moléculas interagentes, ocorre uma desorganização das moléculas de água, aumentando a entropia do sistema e, conseqüentemente, a formação do complexo torna-se favorável (efeito hidrofóbico). Com isso, é notória a importância do solvente nas interações receptor-ligante (KRONBERG, 2016).

Moléculas de água conservadas que interagem fortemente com o sítio ativo de uma proteína podem influenciar a mudança estrutural desse sítio, alterando o volume acessível ao ligante ou até mesmo o perfil das ligações de hidrogênio. As variações da entropia rotacional, translacional, vibracional e conformacional dos solutos também são essenciais para a estabilização do complexo. Os desafios dos algoritmos computacionais, tais como os de Docking, estão centrados na compreensão do papel das moléculas de água no sistema e a quantificação precisa das variações entrópicas conformacionais do receptor e do ligante, dado a quantidade de graus de liberdade.

A nível experimental, a afinidade de ligação em um complexo proteico é medida e reportada pela constante de dissociação de equilíbrio (K_d), um valor que carrega as dimensões da concentração. Quanto menor a magnitude de K_d , maior deverá ser a afinidade entre o receptor e o ligante. Métodos teóricos, como os de Docking, são capazes de estimar a constante de inibição (K_i) que, essencialmente é equivalente à K_d . Assim, torna-se possível comparar os valores de K_i com os de K_d experimentais, quando disponíveis na literatura. Os efeitos entálpicos e entrópicos de um complexo proteico podem ser estimados em uma simulação de Docking pela energia livre de ligação de Gibbs (ΔG_{lig}), de acordo com a Eq. 2:

$$\Delta G_{lig} = \Delta H - T\Delta S = RT\ln(K_i) \quad (2)$$

onde ΔH é a variação da entalpia, T é a temperatura absoluta, ΔS é a variação da entropia e R é a constante universal dos gases. Nesse caso, ΔG_{lig} possui uma relação direta com K_i .

Aqui, a melhor pose conformacional de cada repelente no sítio ativo das proteínas com

menor energia de livre ligação (ΔG) foi selecionada para as análises estatísticas e das interações intermoleculares envolvidas. Os valores da constante de Inibição (K_i) e Eficiência do Ligante (EF) também estimados pelo Autodock 4.2 foram considerados na discussão dos resultados.

4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Por meio de um tratamento estatístico multivariado com Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) foi possível analisar inter-relações entre as propriedades químico quânticas computadas pelo MOPAC/2016 e os dados obtidos do Docking Molecular. A PCA é um procedimento matemático que usa uma ortogonalização de vetores para identificar padrões em uma matriz de dados, transformando-os em um novo sistema de coordenadas. Assim, a maior variação por projeção dos dados deve estar localizada ao longo da primeira coordenada, PC1, que melhor representa a distribuição dos dados; e a segunda maior variação encontra-se ao longo da segunda coordenada, PC2, que é perpendicular à primeira componente, matematicamente, a PCA é uma transformação linear ortogonal em valores singulares de X. Os autovetores obtidos da matriz de covariância representam os pesos (ou *loadings*, em inglês), de modo que o maior autovalor associado corresponde à PC1. O *software* PAST foi utilizado para este procedimento.

Por fim, foi proposto um modelo matemático via Regressão Linear Múltipla (RLM) a fim de prever o valor teórico de ΔG para cada proteína complexada, relacionando as propriedades $\log P$, V e I (QSAR). O objetivo desta etapa foi procurar relações quantitativas entre as propriedades dos repelentes com a afinidade de ligação. Estudos de RLM já foram utilizados para estimar os tempos de proteção de um grande conjunto de repelentes (KATRIZKY et al. 2008; KATRIZKY et al., 2010), e mais recentemente para a previsão da temperatura crítica (T_c) de supercondutores de fulleretos (DA SILVA; BASTOS; PAVÃO, 2019).

As técnicas QSAR tem sido amplamente utilizada com o objetivo de projetar compostos com propriedades específicas para a descoberta de fármacos. Geralmente, relações matemáticas simples como a RLM são estabelecidas para tentar descrever e, em seguida, prever uma dada propriedade para um conjunto de compostos. Para este trabalho, o ideal seria prever os valores das constantes K_d experimentais para o conjunto de repelentes e OBPs selecionadas. Entretanto, não foi possível encontrar esses dados na literatura. Assim, o modelo

de RLM foi utilizado para estimar a magnitude de ΔG fornecido pelo próprio algoritmo de Docking implementado no Autodock 4.2.

Um modelo de regressão múltipla, por exemplo, com três variáveis explicativas, pode ser representado pela Eq. 3:

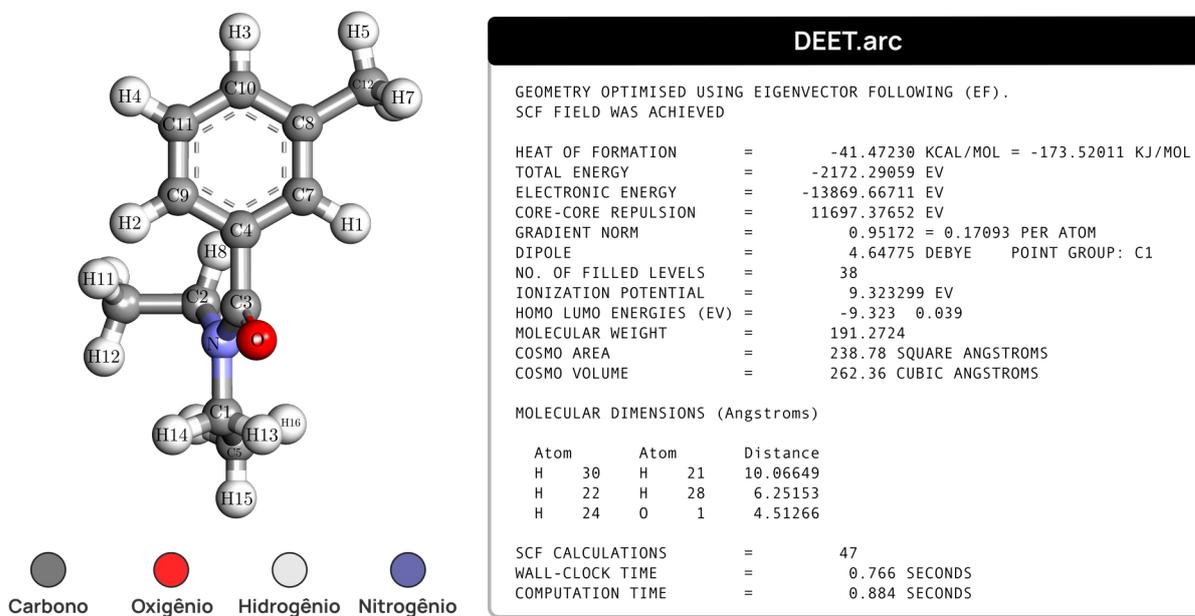
$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 X_{2i} + \beta_3 X_{3i} + \varepsilon_i \quad (3)$$

onde Y_i é a variável dependente (ΔG), β_1 , β_2 e β_3 são os coeficientes parciais de regressão, X_1 e X_2 são as variáveis independentes (nesse caso, os parâmetros $\log P$, V e I) do modelo, e ε_i é um termo de erro que pode ser incluído.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a convergência dos cálculos no MOPAC/2016, o programa retornou arquivos de saída (*output*) com as extensões .arc e .out que carregam as informações das propriedades estruturais e eletrônicas dos 21 repelentes. A geometria de cada molécula com menor energia total associada foi obtida após um tempo médio de 1,545s. Para nível de simplificação, os arquivos do tipo .arc, que resumem o cálculo e contém a geometria final dos compostos foram analisados. A Fig. 7 ilustra um *output* no formato .arc para a molécula do DEET, em que a energia potencial mínima calculada pela convergência da geometria para a conformação ativa da molécula assumiu um valor de -2172,29 eV. Todos os repelentes selecionados apresentaram energias mínimas potenciais e conformações favoráveis, caracterizando a estabilidade⁵. É possível confirmar esses resultados observando os valores do parâmetro conhecido como entalpia de formação (ΔH_f°), isto é, o calor liberado durante a formação da conformação mais estável do composto a partir de seus átomos individuais. O valor de ΔH_f° para o DEET foi de -173,52 kJ·mol⁻¹.

Figura 7 – Estrutura otimizada do DEET fornecida pelo arquivo de saída .arc do MOPAC/2016



(Fonte: Elaborado pelo autor).

⁵ É válido destacar que para medir a estabilidade dos compostos com maior precisão, seria necessário realizar cálculos de frequências vibracionais. Entretanto, para nível de simplificação do trabalho, optou-se em considerar a entalpia de formação e a energia total como parâmetro principal de estabilidade.

É importante salientar que um composto químico existe como um conjunto de várias conformações, considerando os seus comprimentos e ângulos de ligação e, até mesmo a quantidade de torções da estrutura. Desta forma, pequenas modificações nos ângulos torcionais da molécula podem ocasionar em mudanças no estado da sua energia potencial mínima. Para minimizar este problema, os compostos selecionados não foram desenhados diretamente em um programa, mas sim baixados diretamente do banco de dados Pubchem, esperando que estas estivessem próximas de um mínimo local de energia. Outro ponto a se considerar é que, apesar do mínimo global de energia ser uma situação ideal em que raramente é atingida, a etapa de otimização é extremamente importante para simulações de ancoragem molecular.

Um total de 10 parâmetros Químico-Quânticos, incluindo: Momento de Dipolo (μ), Orbital Molecular Ocupado mais alto (HOMO), Orbital Molecular não Ocupado mais Baixo (LUMO), *gap* HOMO-LUMO (Δ_{H-L}), Dureza (η), Maciez (S), Volume Molecular (V), Energia Eletrônica (E), Afinidade Eletrônica (A) e Energia de Ionização (I), provenientes dos cálculos de otimização geométrica estão dispostos na Tabela 1. Considerando que o MOPAC/2016 não fornece os valores de Δ , η , S , I e A , eles foram calculados manualmente de acordo com as fórmulas expressas no trabalho de Arroio, Honório e Silva (2010).

Os repelentes comerciais mais populares – DEET, IR3535 e Icaridina – exibiram propriedades com valores próximos, especialmente para o momento de dipolo elétrico, para a energia do HOMO, para a energia eletrônica e para o potencial de ionização. Os ácidos láurico, mirístico, pentadecílico e palmítico também apresentarem propriedades bastante similares, em que as energias do HOMO, do *gap*, da dureza e do potencial de ionização obtidas foram inversamente proporcionais à quantidade de carbonos contidas em suas estruturas (12, 14, 15 e 16, respectivamente). O Citral, que possui um odor forte de limão e encontra-se presente em várias plantas, como no capim-limão, na erva-cidreira, na laranja e no limão, foi o composto que apresentou maior valor para o momento de dipolo (5,495 D), enquanto que o *p*-cimeno exibiu o menor valor para esta propriedade (0,188 D).

A Permetrina, um inseticida sintético, que, atualmente também é utilizado como repelente de insetos, apresentou o maior valor para volume molecular e menor energia eletrônica, sendo $460,12 \text{ \AA}^3$ e $-4225,39 \text{ eV}$, respectivamente.

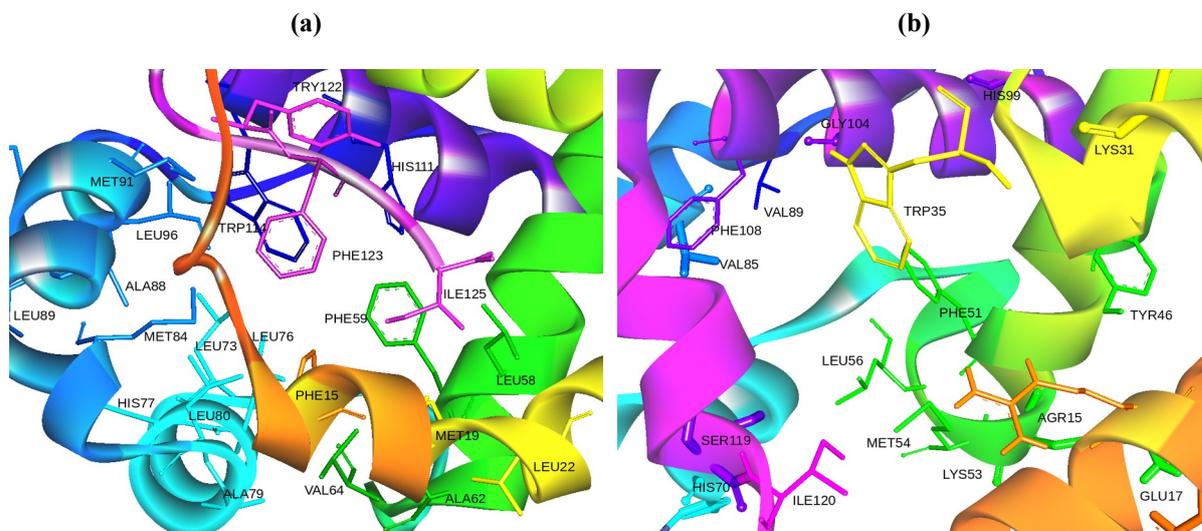
Tabela 1 – Propriedades estruturais e eletrônicas dos repelentes calculadas pelo programa MOPAC/2016 utilizando o método semiempírico PM6. Exceto o PMD, os repelentes destacados em negrito são sintéticos, sendo os mais comumente usados na indústria.

Repelente	μ (D)	H (eV)	L (eV)	Δ_{H-L} (eV)	η (eV)	S (eV)	V (Å ³)	E (eV)	I (eV)	A (eV)
DEET	4,648	-9,323	0,039	9,362	4,681	0,21363	262,36	-2172,29	9,323	-0,039
Icaridina	4,228	-9,581	0,853	10,434	5,217	0,19168	306,94	-2838,65	9,581	-0,853
IR3535	5,057	-9,555	0,819	10,374	5,187	0,19279	291,01	-2688,69	9,555	-0,819
PMD	3,305	-9,865	2,464	12,329	6,165	0,16222	238,01	-2082,89	9,865	-2,464
Ácido láurico	2,128	-11,009	0,554	11,563	5,782	0,17297	294,17	-2381,44	11,009	-0,554
Ácido mirístico	2,127	-10,913	0,553	11,446	5,733	0,17443	338,62	-2681,12	10,913	-0,553
Ácido pentadecílico	2,060	-10,884	0,533	11,437	5,719	0,17487	360,55	-2830,96	10,884	-0,553
Ácido palmítico	2,146	-10,846	0,554	11,400	5,700	0,17544	382,63	-2980,80	10,846	-0,554
Ftalato de dimetila	3,558	-10,412	-0,973	9,439	4,720	0,21189	227,80	-2526,09	10,412	0,973
Citral	5,495	-9,431	-0,010	9,421	4,711	0,21229	225,45	-1733,61	9,431	0,010
Eugenol	1,914	-8,463	0,128	8,591	4,296	0,23280	212,31	-1969,70	8,463	-0,128
1-Metilnaftaleno	0,770	-8,666	-0,286	8,380	4,190	0,23866	186,55	-1482,44	8,666	0,286
<i>N</i> -(3-Metibutil)-benzamida	4,845	-9,740	-0,146	9,594	4,797	0,20846	262,30	-2172,27	9,740	0,146
Nepetalactona	4,983	-9,421	0,352	9,773	4,887	0,20465	214,38	-1998,67	9,421	-0,352
β -Mirceeno	0,736	-9,084	0,443	9,527	4,764	0,20993	216,31	-1441,56	9,084	-0,443
β -Pinoeno	1,008	-9,465	1,451	10,916	5,458	0,18322	198,54	-1442,07	9,465	-1,451
Linalool	2,626	-9,282	0,940	10,222	5,111	0,19566	232,70	-1761,27	9,282	-0,940
Mentol	2,182	-10,088	2,857	12,945	6,473	0,15450	228,39	-1790,07	10,088	-2,857
α -Pinoeno	2,844	-9,874	2,315	12,189	6,095	0,16408	205,98	-1732,96	9,874	-2,315
ρ -Cimeno	0,188	-8,922	0,547	9,469	4,735	0,21220	195,52	-1415,41	8,922	-0,547
Permetrina	2,335	-8,985	-0,178	8,807	4,404	0,22709	460,12	-4225,59	8,985	0,178

(Fonte: Elaborado pelo autor).

Os resultados gerados pelo servidor Deepsite (Fig. 9) permitiram a inclusão de uma caixa de simulação de 0,5 Å com centro [$x = 12.4, y = 42.4, z = 24.2$] para a AaeOBP1, que envolveu todos os resíduos hidrofóbicos que formam o sítio de ligação da proteína: Phe15, Leu58, Phe59, Ala62, Val64, Leu73, Leu76, Ala79, Leu80, Ala88, Leu89, Gly92, Leu 96, Phe123, Leu124 e Ile125 das hélices 1, 3, 4, 5 e voltas entre as hélices 3, 4, 5 e 6. As coordenadas para a proteína AaeOBP22 foram [$x = 28.7, y = 24.5, z = 29.8$] e a caixa também englobou os resíduos Arg15, Lys33, Lys117, Tyr46, Trp35 que são capazes de realizar interações de hidrogênio com ligantes.

Figura 9 – Resíduos que formam o sítio de ligação das proteínas (a) AaegOBP1 e (b) AeOBP22.

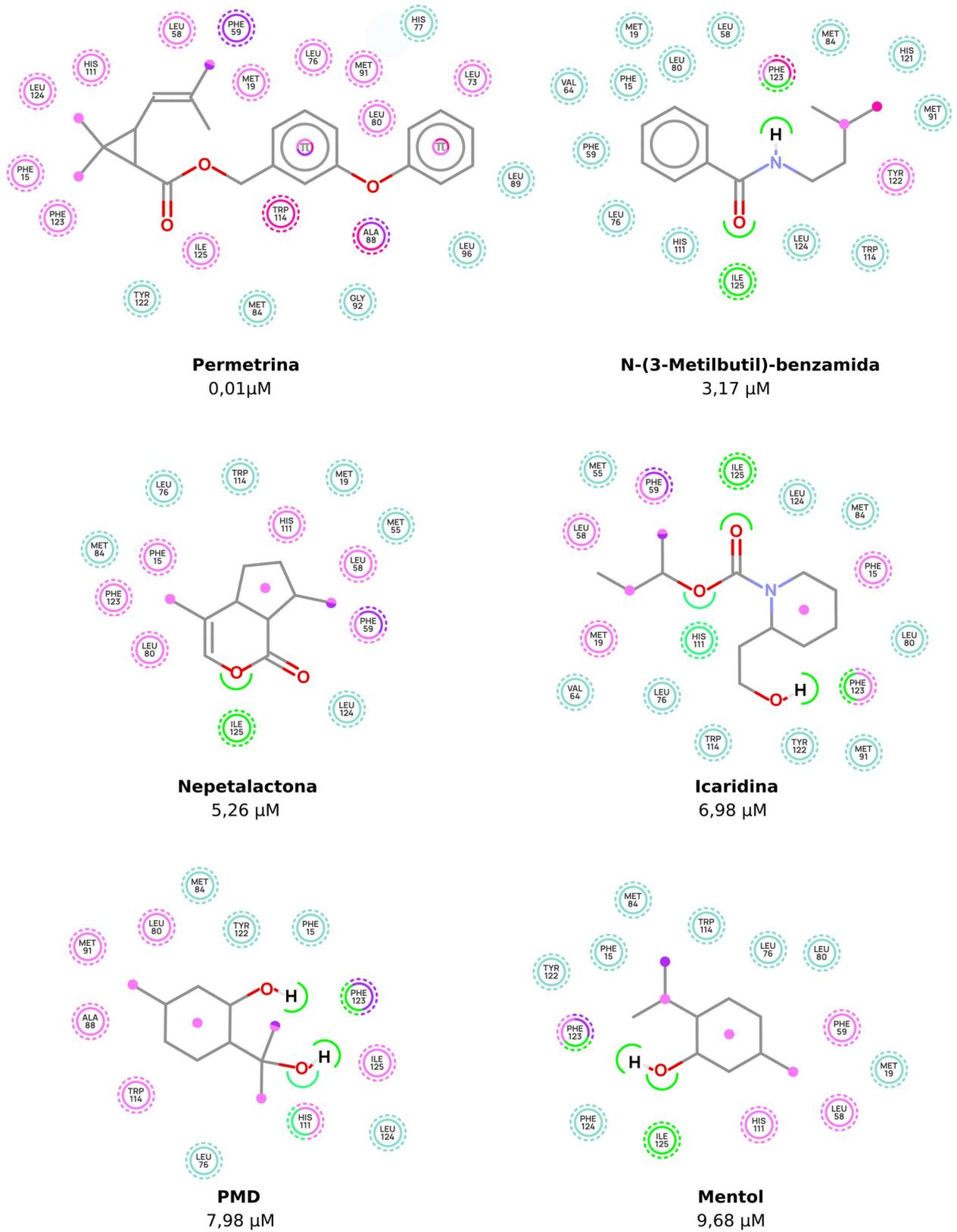


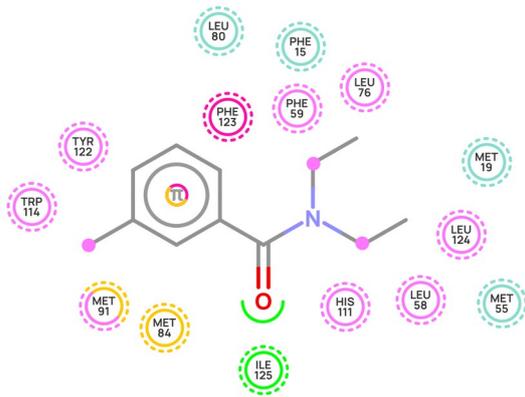
(Fonte: Elaborado pelo autor).

5.1 DOCKING AaegOBP1

As interações intermoleculares e as distâncias atômicas obtidas no Docking realizado no Autodock 4.2, revelaram inúmeras interações hidrofóbicas que se repetem entre os repelentes com os resíduos Phe123, Tyr122, Trp114, Phe59, His111, Leu76, Leu58, Leu124, Met19, Phe15, Met91, His77, Ala88, Leu80 e Leu89 da proteína AaegOBP1. Os resíduos Ile125 e Phe123 formaram ligações de hidrogênio clássicas com os grupos oxigenados da maioria dos compostos. Ligações de hidrogênio não-clássicas do tipo carbono-hidrogênio foram observadas nos repelentes Icaridina, IR3535, Ácido láurico, Ácido mirístico, Ácido pentadecílico, Ftalato de dimetila e PMD. Interações de van der Waals também foram responsáveis pela estabilização de todos os ligantes na cavidade hidrofóbica da proteína. Os mapas de interação podem ser visualizados na Fig. 10.

Figura 10 – Mapas de interações intermoleculares da proteína AaegOBP1 com os repelente

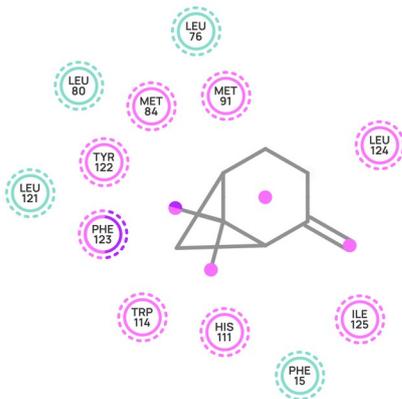




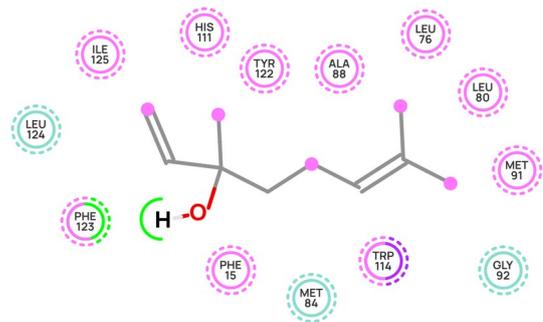
DEET
10,62 μM



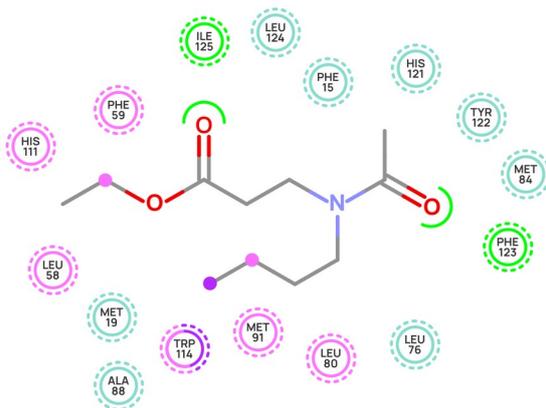
α -Pineno
15,78 μM



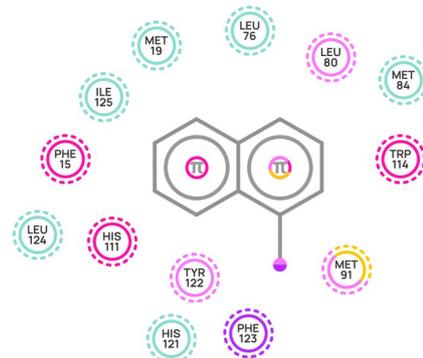
β -Pineno
25,63 μM



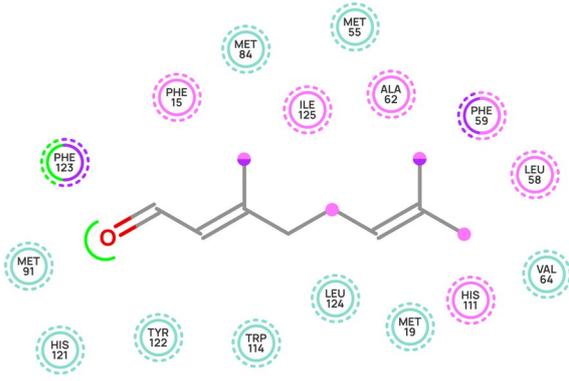
Linalol
28,13 μM



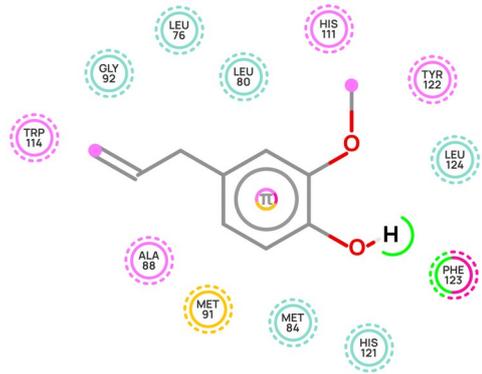
IR3535
29,17 μM



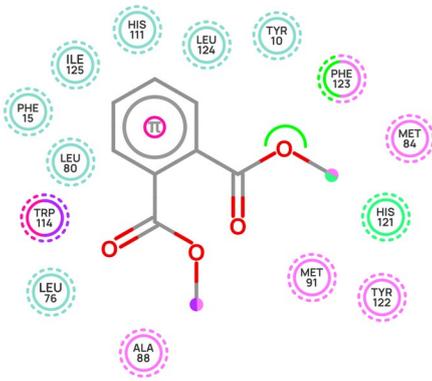
1-Metilnaftaleno
45,31 μM



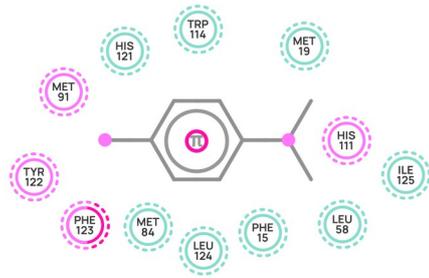
Citral
47,10 μM



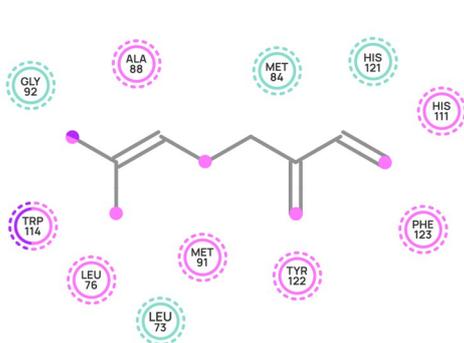
Eugenol
49,65 μM



Ftalato de dimetila
54,39 μM



p-Cimeno
70,89 μM



β -Mirceno
112,72 μM

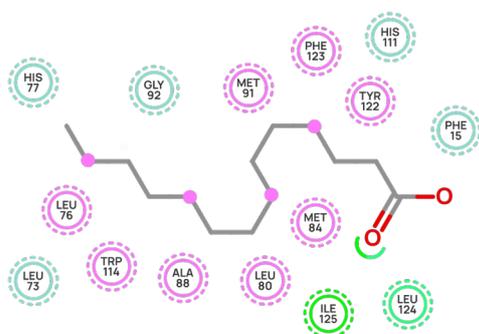


Ácido palmítico
113,93 μM



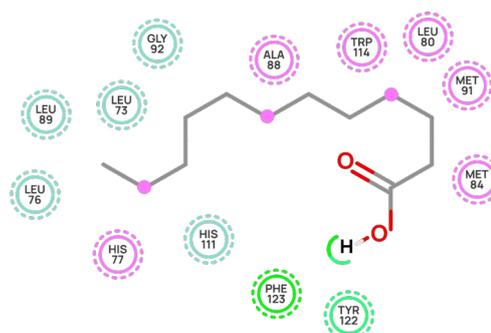
Ácido Pentadecílico

139,68 μM



Ácido Mirístico

176,68 μM



Ácido láurico

246,83 μM

Legendas

- Ligações de hidrogênio clássicas
- Ligações de hidrogênio não-clássicas
- Interações hidrofóbicas
- Interações π -enxofre
- Forças de van der Waals

(Fonte: Elaborado pelo autor).

Os valores da energia de ligação (ΔG) e da constante de inibição (K_i) para todos os repelentes complexados com a AaegOPB1 estão reportados na Tabela 2. Como discutido na seção 2, a espontaneidade de reação OBP-repelente será tão favorável quanto menor forem os

valores de ΔG e K_i e, conseqüentemente, a interação entre ambos será mais forte. Os repelentes comerciais: DEET, Icaridina, IR3535 e PMD apresentaram valores de ΔG negativos de -6,79, -7,03, -6,19 e -6,95 kcal·mol⁻¹, respectivamente, bem como K_i variando entre 6,980 e 29,170 μ M. A energia mais elevada do IR3535 em comparação com os outros repelentes comerciais, pode ter sido ocasionada por uma interação não favorável entre o oxigênio do resíduo Phe123 e o oxigênio do grupo amida do composto. A Permetrina foi o ligante que se ligou mais fortemente com a AaegOBP1, com uma magnitude de $\Delta G = -10,81$ kcal·mol⁻¹ e $K_i = 0,010$ μ M, sendo estabilizada exclusivamente por interações hidrofóbicas e de van der Waals.

Tabela 2 – Valores de ΔG e K_i e EF para os repelentes complexados com a proteína AaegOBP1.

Repelente	ΔG (kcal·mol ⁻¹)	K_i (μ M)	EF
Permetrina	-10,81	0,01	-0,42
N-(3-Metilbutil)-benzamida	-7,50	3,17	-0,54
Nepetalactona	-7,20	5,26	-0,60
Icaridina	-7,03	6,98	-0,44
PMD	-6,95	7,98	-0,58
Mentol	-6,84	9,68	-0,62
DEET	-6,79	10,62	-0,49
α -Pino	-6,55	15,78	-0,60
β -Pino	-6,26	25,63	-0,63
Linalol	-6,21	28,13	-0,56
IR3535	-6,19	29,17	-0,41
1-Metilnaftaleno	-5,97	45,31	-0,54
Citral	-5,90	47,10	-0,54
Eugenol	-5,87	49,65	-0,49
Ftalato de dimetila	-5,82	54,39	-0,42
ρ -Cimeno	-5,66	70,89	-0,57
β -Mirceno	-5,39	112,72	-0,54
Ácido palmítico	-5,38	113,93	-0,30
Ácido pentadecílico	-5,26	139,68	-0,31
Ácido mirístico	-5,12	176,68	-0,32
Ácido láurico	-4,92	246,83	-0,35

(Fonte: Elaborado pelo autor)

Foi possível observar uma tendência nos valores de ΔG nos ácidos saturados (láurico, mirístico, pentadecílico e palmítico) em função da quantidade de carbonos contidos na estrutura desses compostos – quanto maior o número de carbonos, menor o valor de ΔG . O ácido láurico (12 carbonos), apresentou o maior valor de ΔG entre os repelentes selecionados (-4,92 kcal·mol⁻¹), seguido dos ácidos mirístico (-5,12 kcal·mol⁻¹), pentadecílico (-5,26 kcal·mol⁻¹) e palmítico (-5,38 kcal·mol⁻¹). Um composto sintético, o N-(3-Metilbutil)-benzamida (-7,50 kcal·mol⁻¹), retratado como um potencial repelente para o *Ae. aegypti*

(BERGMANN et al., 1976) foi um ligante mais eficiente que o DEET, ficando atrás apenas da Permetrina. O monoterpênóide bicíclico, Nepetalactona, também apresentou uma alta afinidade ($-7,50 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) com a AeOBP1. Na década de 60, Eisner (1964) relatou que a Nepetalactona é um composto que apresenta efeitos repelentes em insetos fitófagos. E mais recentemente, Reichert et al. (2019) avaliaram os isômeros de Nepetalactona como repelentes com eficácia superior a 95% para o mosquito *Ae. Aegypti* entre 2 e 4h. Em concentrações mais baixas, as amostras de Nepetalactona foram mais eficazes do que o DEET.

Nesterkina et al. (2018) relataram que o Mentol puro apresentou repelência contra o *Ae. aegypti* com dosagem mínima eficaz ($\text{MED} = 0,094 \pm 0,000 \text{ mg/cm}^2$), equiparando-se ao Carvacrol, Guaiacol e DEET. Os pesquisadores destacaram o papel do grupo hidroxila nesses compostos na atividade repelente, considerando a não repelência do ρ -Cimeno (que não é dotado de grupo OH), mesmo em testes de concentrações mais altas. Neste trabalho, o Mentol exibiu uma K_i de 9,68 muito próximo ao DEET, enquanto que o ρ -Cimeno e o β -Mirceno apresentaram um K_i de 70,89 e 112,72, respectivamente. Isso reforça o papel essencial do grupo OH para a eficácia dos repelentes.

5.2 DOCKING AeOBP22

A proteína AeOBP22 é incomum entre as demais OBPs, já que pode ser expressa em múltiplos tecidos quimiossensoriais, tais como as antenas, as glândulas reprodutoras dos machos, as glândulas salivares e os espiráculos torácicos, além de possuir uma sétima hélice C-terminal adicional. Estudos indicam que durante o processo de acasalamento, os machos do *Ae. aegypti* podem transferir a AeOBP22 para as fêmeas. Essa proteína exibe uma conservação estrutural com uma OBP da mosca varejeira (*Phormia regina*), denominada de PregOBP56a (código PBD 5DIC). Uma cavidade hidrofóbica contendo os resíduos Arg15 e Tyr46 localizados em posições específicas podem interagir via ligações de hidrogênio com ligantes contendo ácido carboxílico em sua composição estrutural.

AeOBP22 é um exemplo aparente de que as OBPs possuem papéis distintos e altamente específicos além da sinalização quimiossensorial. Ela é indicada como uma proteína que pode se ligar naturalmente com ácidos graxos de cadeia longa (entre 15 e 20 carbonos) com alta afinidade. Quando praticamos alguma atividade física e suamos, as bactérias presentes na pele iniciam um processo de metabolização de proteínas e de ácidos graxos presentes no suor, componentes que têm papéis essenciais na regulação do comportamento dos mosquitos. Por

exemplo, o ácido láurico e o ácido palmitoléico, são indicados como substâncias atrativas de oviposição para o *Ae. Aegypti*, enquanto que os ácidos saturados com 14, 15, 16 e 18 carbonos podem ser repelentes em altas concentrações.

Os resultados do Docking (Tabela 3) deste trabalho são consistentes com os estudos de Wang et al. (2020), indicando que os ácidos graxos podem se ligar com alta afinidade à proteína AaOBP22 por meio de ligações de hidrogênio clássicas entre os resíduos Arg15 e Try46 e o grupo carboxila dos compostos. A afinidade de ligação aumenta de acordo com o aumento do número de átomos de carbonos na estrutura, assim como em AaegOBP1, mas para AaOBP22 o ΔG é da ordem de $\sim 1,1$ kcal menor, considerando os ácidos láurico ($-5,72$ kcal \cdot mol $^{-1}$), mirístico ($-6,16$ kcal \cdot mol $^{-1}$), pentadecílico ($-6,37$ kcal \cdot mol $^{-1}$) e palmítico ($-6,56$ kcal \cdot mol $^{-1}$).

Tabela 3 – Valores de ΔG e K_i para os repelentes complexados com a proteína AeOBP22.

Repelente	ΔG (kcal \cdot mol $^{-1}$)	K_i (μ M)	EF
Permetrina	-10,37	0,03	-0,40
N-(3-Metilbutil)-benzamida	-6,75	11,19	-0,48
Nepetalactona	-6,62	14,12	-0,55
Ácido palmítico	-6,56	15,67	-0,36
Icaridina	-6,42	19,52	-0,40
DEET	-6,38	20,89	-0,46
Ácido pentadecílico	-6,37	21,27	-0,37
1-Metilnaftaleno	-6,25	26,38	-0,57
Ácido mirístico	-6,16	30,33	-0,39
α -Pino	-6,04	37,40	-0,55
β -Pino	-5,96	42,43	-0,60
Mentol	-5,87	49,65	-0,53
Ácido láurico	-5,72	64,14	-0,41
PMD	-5,68	68,68	-0,47
ρ -Cimeno	-5,68	69,08	-0,57
Ftalato de dimetila	-5,62	75,41	-0,40
Citral	-5,57	83,13	-0,51
β -Mirceno	-5,55	85,39	-0,55
Eugenol	-5,50	92,44	-0,46
Linalol	-5,39	111,10	-0,49
IR3535	-4,93	243,43	-0,33

(Fonte: Elaborado pelo autor)

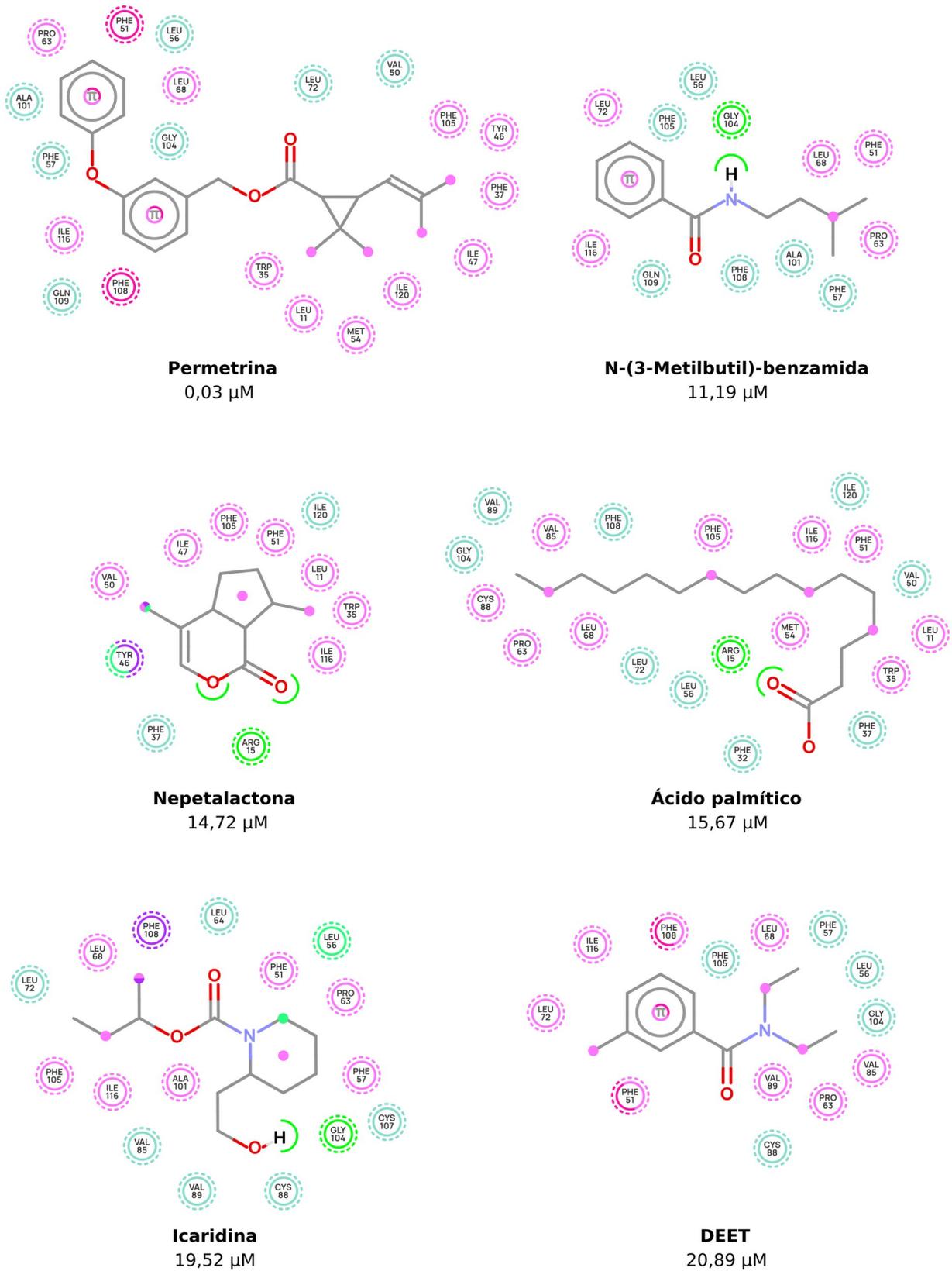
Assim como na proteína AaegOBP1, a AaOBP22 apresentou afinidade de ligação similar para os três ligantes mais efetivos: Permetrina ($-10,37$ kcal \cdot mol $^{-1}$), N-(3-Metilbutil)-benzamida ($-6,75$ kcal \cdot mol $^{-1}$) e Nepetalactona ($-6,62$ kcal \cdot mol $^{-1}$). A Permetrina realiza interações hidrofóbicas e de van der Waals com os resíduos Phe108, Phe51, Ile116, Trp35, Ile120, Leu11, Ile47, Phe37, Phe105, Met54, Tyr46, Pro63, Gln109, Phe57, Ala101, Leu56,

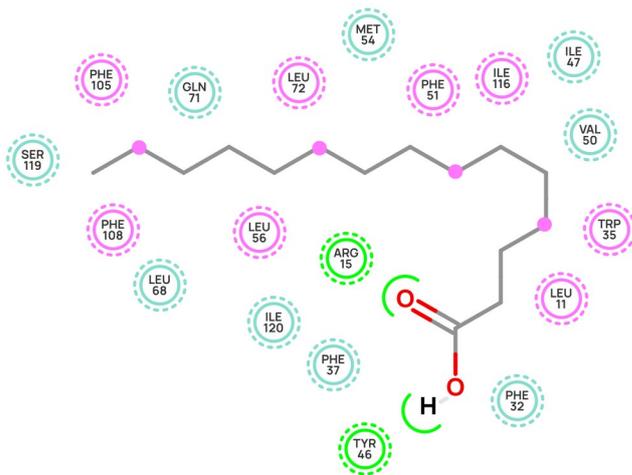
Gly104, Leu72 e Val50. Um resíduo de Gly104 torna o N-(3-Metilbutil)-benzamida um ligante mais efetivo para AeOBP22 do que o DEET ($-6,38 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), quando realiza uma ligação de hidrogênio com o grupo amida do composto. Um efeito parecido também ocorre com a Icaridina ($-6,42 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), onde o aminoácido Gly104 realiza uma interação de hidrogênio clássica com o grupo hidroxila da molécula; e uma ligação de hidrogênio não-clássica do tipo carbono-hidrogênio também é estabelecida entre o resíduo Leu56 e o carbono 5 localizado no anel da estrutura da Icaridina.

Li et al. (2008) relataram anteriormente que os melhores ligantes para AeOBP22 são moléculas com dois anéis aromáticos conectados por uma cadeia rígida, exercendo um papel importante no transporte de feromônios através da linfa. De forma análoga, identificamos que a Nepelactona, uma molécula constituída de dois anéis interconectados, é um ligante altamente eficaz para essa OBP, apresentando um $K_i = 14,12$ e $EF = -0,55$, assim como o 1-Metilnaftaleno ($K_i = 26,38$ e $EF = -0,57$). Nesse caso, os anéis aromáticos de ambas as estruturas estabelecem interações hidrofóbicas com vários resíduos de aminoácidos, tais como Tyr46, Phe51, Gly104, Ile116 e Trp35.

O repelente IR3535 se destacou como o ligante menos eficiente para a AeOBP22, com um $\Delta G = -4,93 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, $K_i = 243,43$ e $EF = -0,33$. O composto realizou interações de hidrogênio clássicas com o resíduo Arg15 e hidrofóbicas com os resíduos Trp35, Phe37, Ile120, Met54 e Ile116, bem como interações de van der Waals com os resíduos Phe51, Phe105, Ile47, Leu72, Gln71, Ser119, Val50, Leu11, Tyr46, Phe32 e Lys33. Ao passo que o repelente PMD exibiu uma interação de hidrogênio com o resíduo Tyr46 e uma interação não favorável com o resíduo 15, o que resultou em um $\Delta G = -5,68 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, $K_i = 68,68$ e $EF = -0,47$. Os mapas de interações podem ser observados na Fig. 11.

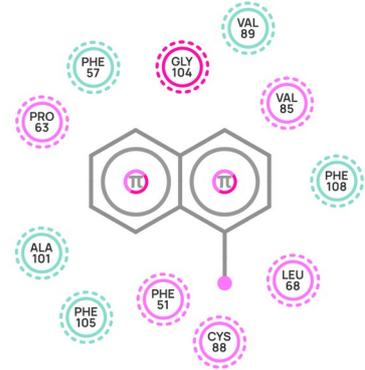
Figura 11 – Mapas de interações intermoleculares da proteína AeOBP22 com os repelentes.





Ácido Pentadecílico

21,27 μM



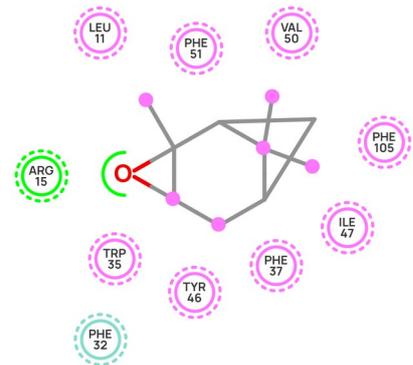
1-Metilnaftaleno

26,38 μM



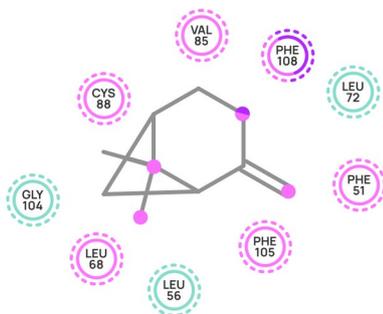
Ácido Mirístico

30,33 μM



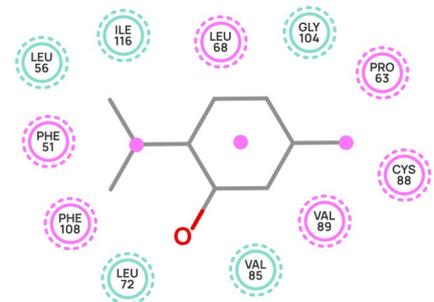
α -Pirino

37,40 μM



β -Pirino

42,43 μM

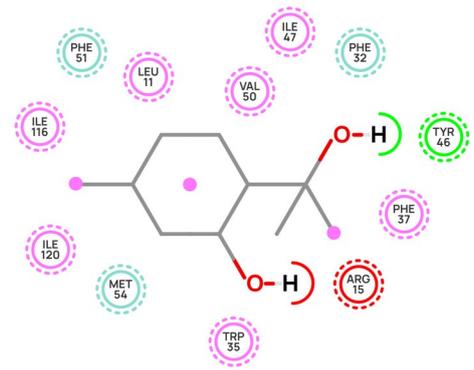


Mentol

49,65 μM



Ácido láurico
64,14 μM



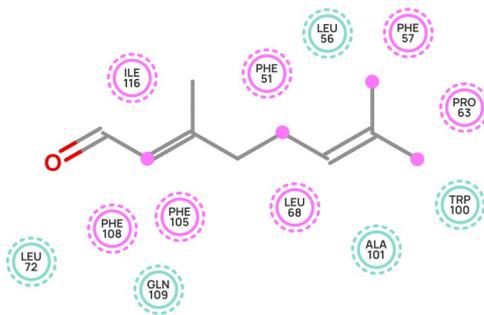
PMD
68,68 μM



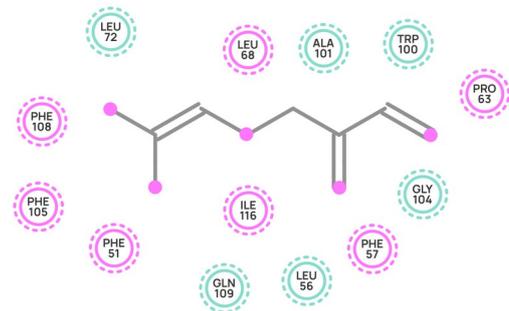
p-Cimeno
69,08 μM



Ftalato de dimetila
75,41 μM



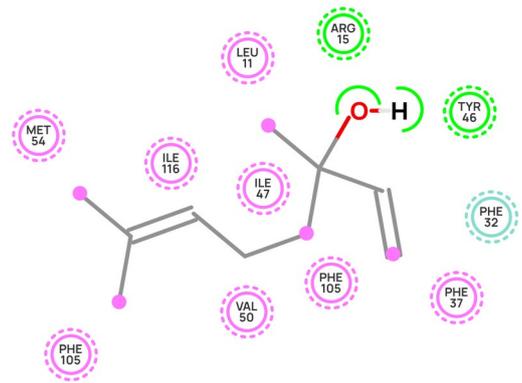
Citral
83,13 μM



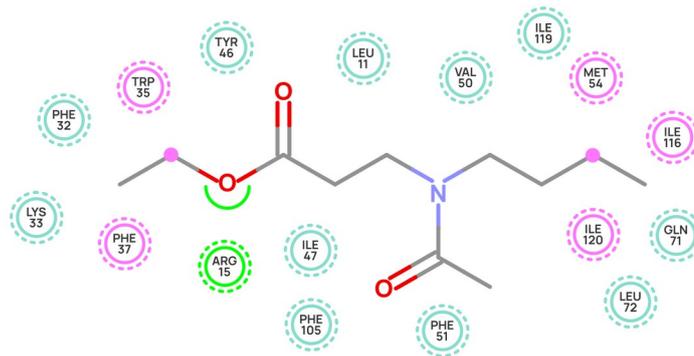
β -Mirceno
85,39 μM



Eugenol
92,44 μM



Linalol
111,10 μM



IR3535
29,17 μM

Legendas

- Ligações de hidrogênio clássicas
- Ligações de hidrogênio não-clássicas
- Interações hidrofóbicas
- Interações π -enxofre
- Forças de van der Waals
- Não favorável

(Fonte: Elaborado pelo autor).

5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Desde muito tempo, a repelência tem sido atribuída aos aspectos estruturais dos compostos, tais como o número de carbonos, estereoquímica e grupos funcionais. Por exemplo, as amidas representam a classe de repelentes mais efetiva para a maioria dos insetos. Isômeros do DEET são até hoje amplamente utilizados comercialmente e a sua estrutura é frequentemente usada como padrão para a busca de novos princípios ativos. O IR3535 e o N,N-dietil fenilacetamida, a saber, são repelentes que contêm um grupo funcional amida e são repelentes tão eficazes quanto o DEET. Uma tendência também foi observada entre a quantidade de carbonos localizados entre o anel aromático e o grupo amida, indicando que o aumento no número de carbonos pode diminuir a atividade repelente (GOUCK et al., 1957). O trabalho de Paluch, Bartholomay e Coats (2010) destaca a eficácia dos repelentes para o *Ae. Aegypti*, baseado em seus grupos funcionais (Tabela 4).

Tabela 4 – Eficácia e tempo de proteção de repelentes com base nos seus grupos funcionais.

Classe química	Tempo de proteção	
	3 – 5h	≥5h
Hidrocarbonetos	0	0
Ácidos e anidridos	1,9	6,8
Aldeídos	1,7	1,7
Ésteres, lactonas	30,4	16,9
Éters, acetais	17,8	10,2
Cetonas	1,7	0
Álcoois (incluindo fenóis)	14,2	16,9
Compostos nitrogenados		
a. Amidas, imidas	18,5	35,6
b. Aminas	4,9	1,7
c. Nitrilas	2,6	1,7
Halidas	1,7	3,4
a. Compostos sulfurados	0,6	0
b. Compostos fosforados	0,3	0

(Fonte: Adaptado de Paluch, Bartholomay e Coats, 2010).

Um dos primeiros estudos que tentaram relacionar as propriedades eletrônicas de repelentes análogos ao DEET com a sua eficácia foi realizado por Ma et al. (1999). Neste trabalho, um total de 30 repelentes tiveram os parâmetros de potencial eletrostático, cargas atômicas de nitrogênio e o momento de dipolo calculados por AM1, indicando que esses descritores possuem uma estreita relação com a repelência. Katritzky et al. (2006)

melhoraram um modelo QSAR proposto por Suryanarayana et al. (1991) adicionando a pressão de vapor como um descritor, juntamente com outras propriedades moleculares, que podem estar relacionadas com a repelência. A atividade repelente também foi prevista para um conjunto de 12 sesquiterpenos via QSAR utilizando pressão de vapor, a polarizabilidade, a energia do LUMO e a População de Mulliken (PALUCH et al., 2009).

Considerando esses estudos anteriores, foi realizado no presente trabalho uma análise estatística com tratamento multivariado por análise de componentes principais (PCA), a fim de buscar inter-relações entre as propriedades químico quânticas dos repelentes obtidas no MOPAC/2016, os resultados provenientes do Docking para a proteína AaegOBP1 e mais dois parâmetros dos compostos obtidos diretamente do Pubchem: o coeficiente de partição octanol/água ($\log P$) e Pressão de Vapor (P). Antes da PCA, utilizou-se o programa PAST para mostrar a correlação entre as propriedades selecionadas (Tabela 5).

Tabela 5 – Correlação entre as propriedades selecionadas para a PCA.

	μ	H	L	Δ	η	S	V	E	I	A	$\log P$	P	ΔG	K_i	EF
μ	0	0,72	0,57	0,84	0,84	0,97	0,74	0,31	0,72	0,57	0,02	0,13	0,25	0,08	0,82
H	-0,08	0	0,48	0,00	0,00	0,00	0,05	0,13	0,00	0,48	0,15	0,56	0,09	0,00	0,02
L	-0,13	-0,16	0	0,00	0,00	0,00	0,43	0,25	0,48	0,00	0,90	0,07	0,98	0,47	0,05
Δ	-0,05	-0,70	0,82	0	0,00	0,00	0,63	0,98	0,00	0,00	0,47	0,35	0,33	0,32	0,97
η	-0,05	-0,70	0,82	1	0	0,00	0,63	0,98	0,00	0,00	0,47	0,35	0,33	0,32	0,97
S	0,01	-0,73	-0,79	-0,99	-0,99	0	0,57	0,94	0,00	0,00	0,49	0,35	0,28	0,27	0,93
V	0,08	-0,43	-0,18	0,11	0,11	-0,13	0	0,00	0,05	0,43	0,01	0,09	0,11	0,25	0,00
E	-0,23	0,34	0,26	-0,01	-0,01	0,02	-0,94	0	0,13	0,25	0,13	0,05	0,02	0,69	0,00
I	0,08	-1	0,16	0,70	0,70	-0,73	0,43	-0,34	0	0,48	0,15	0,56	0,09	0,00	0,02
A	0,13	0,16	-1	-0,82	-0,82	0,79	0,18	-0,26	-0,16	0	0,90	0,07	0,98	0,47	0,05
$\log P$	-0,52	-0,32	-0,03	0,17	0,17	-0,16	0,56	-0,34	0,32	0,03	0	0,34	0,96	0,02	0,07
P	-0,34	0,14	0,40	0,21	0,21	-0,22	-0,38	0,44	-0,14	-0,40	0,22	0	0,72	0,68	0,04
ΔG	-0,26	-0,38	0,01	0,22	0,22	-0,25	-0,36	0,49	0,38	-0,01	0,01	0,08	0	0,00	0,45
K_i	-0,39	-0,61	-0,17	0,23	0,23	-0,25	0,26	-0,09	0,61	0,17	0,50	-0,10	0,66	0	0,00
EF	0,05	-0,52	-0,43	-0,01	-0,01	-0,02	0,71	-0,70	0,52	0,43	0,41	-0,45	0,18	0,60	0

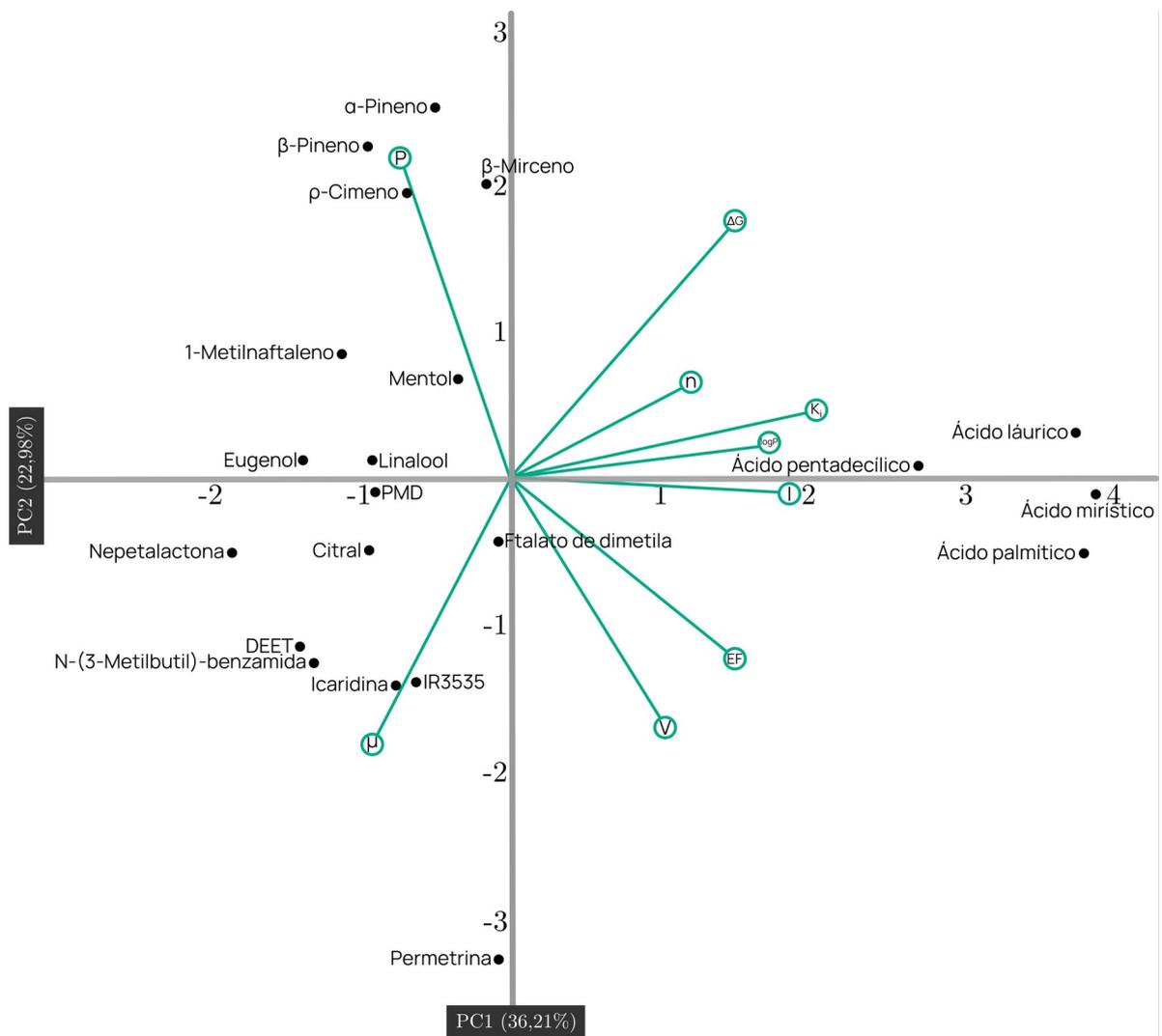
(Fonte: Elaborado pelo autor).

Parâmetros com correlação $\geq +0,80$ e $\leq -0,80$ não foram incluídos na PCA, uma vez que eles poderiam representar o mesmo peso na estatística dos dados. Assim, foram removidos: a energia do LUMO (L), a energia do HOMO (H), e a afinidade eletrônica (A). Para esta etapa, foram considerados apenas os valores do Docking para a proteína AaegOBP1, pois

representou uma melhor tendência à análise estatística.

A Fig. 12 ilustra os scores (pontos) e os pesos (em ciano) gerados pela Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) para o conjunto de repelentes selecionados neste trabalho. De acordo com os pesos, observa-se que o eixo de maior variância é explicado pela PC1, onde as propriedades η , I , $\log P$, K_i e EF representam os maiores pesos. A PC2 também contribui significativamente para a separação dos dados, em que μ , V , P e ΔG são os parâmetros com os maiores pesos. A variância total (PC1 + PC2) foi de 59,19%.

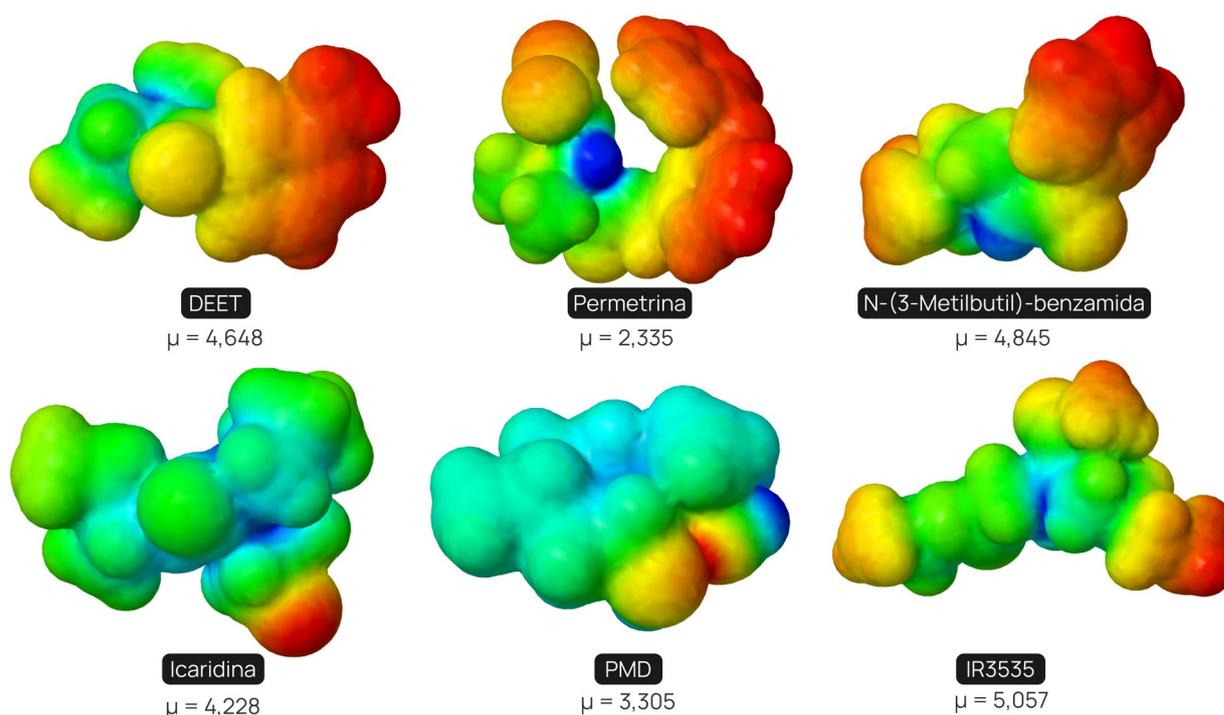
Figura 12 – PCA dos repelentes selecionados.



(Fonte: Elaborado pelo autor).

Momento de Dipolo: Os repelentes com maior afinidade de ligação com $-11 \leq \Delta G \leq -7$ kcal·mol⁻¹ [Permetrina, N-(3-Metilbutil)-benzamida, Nepetalactona e Icaridina] encontram-se localizados no terceiro quadrante, assim como o PMD, o Citral, o DEET, o Ftalato de dimetila e o IR3535 que também possuem uma ótima afinidade de ligação com AegOBP1 ($-6,95 \leq \Delta G \leq -5,50$ kcal·mol⁻¹). Esses compostos possuem valores elevados para o momento de dipolo (μ), uma propriedade que indica a polaridade intrínseca das moléculas. A magnitude de μ denota a lipofilicidade ou a hidrofobicidade de um composto; nesse caso, quanto maior essa magnitude, mais provável é que o composto seja hidrofílico. Para os repelentes citados anteriormente, a magnitude do momento de dipolo é $2 \leq \mu \leq 6$ D, indicando que uma polaridade ideal é necessária para que a molécula seja um repelente ativo e interaja efetivamente com a proteína AegOBP1. A Fig. 13 elucida as distribuições tridimensionais de carga elétrica em alguns dos compostos com melhor afinidade de ligação, por meio de mapas de potencial eletrostático.

Figura 13 – Superfícies de potencial eletrostático de alguns repelentes com melhor afinidade de ligação à AegOBP1. As regiões em azul indicam uma densidade de carga positiva e a vermelha indica uma densidade de carga negativa.



(Fonte: Elaborado pelo autor).

Coefficiente de Partição: O valor numérico do coeficiente de partição ($\log P$) é frequentemente usado como uma medida quantitativa da lipofilicidade de compostos bioativos. Os resultados deste trabalho sugerem que valores elevados para $\log P$ intensificam a quantidade de interações hidrofóbicas realizadas entre o repelente e a AaegOBP1. Essa tendência pôde ser observada nos Ácidos graxos insaturados e na Permetrina, que é estabilizada no sítio de ligação da proteína exclusivamente por interações hidrofóbicas. Entretanto, apesar da Permetrina ser o ligante mais efetivo devido ao grande número de contatos hidrofóbicos, uma alta afinidade AaegOBP1-repelente parece ser mediada por um $\log P$ ideal entre 1,3 e 3,0, valores que são favoráveis para a realização de ligações de hidrogênio.

Energia de Ionização e Dureza: Para os compostos selecionados neste trabalho, valores baixos para a energia de ionização (I), mais especificamente entre 9 e 10 eV, estão associados à uma alta afinidade, indicando possíveis mecanismos de transferências de cargas na interação AaegOBP1-repelente. Em contrapartida, os compostos com maiores valores para I possuem alta dureza, uma vez que a diferença energética entre os orbitais de fronteira HOMO e LUMO é grande, dificultando a transição eletrônica entre o receptor e o ligante. Considerando os resíduos Phe123 e Ile125 da proteína, é possível que ocorra uma transferência de carga HOMO-LUMO entre os repelentes e esses aminoácidos, resultando em interações de hidrogênio no interior do sítio hidrofóbico. Para testar esta hipótese, foi realizado uma otimização geométrica seguido de um cálculo de energia via PM6 para os aminoácidos Fenilalanina e Isoleucina isolados. Os resultados mostraram valores de energia de ionização próximos aos repelentes que melhor interagem com a AaegOBP1, sendo 9,547 eV para a Fenilalanina e 9,879 eV para a Isoleucina. Isso é um indicador de transferência de carga favorável.

Volume Molecular: Analisando o volume molecular (V) dos repelentes ao longo da segunda componente principal, é possível notar uma tendência dos valores de V com os valores de ΔG . Para os ácidos graxos, quanto maior o V , menor o ΔG e, conseqüentemente, maior a afinidade de ligação. O parâmetro V separou a Permetrina dos demais compostos no 3º quadrante da PCA, pois este repelente apresenta o maior valor de V (460,12 Å³) dentre as demais moléculas selecionadas. O N-(3-Metilbutil)-benzamida, encontra-se bem próximo do DEET, já que apresentam volumes e demais propriedades similares, sendo que o primeiro é um ligante mais

efetivo. Apesar do volume molecular ter sido indicado como um parâmetro importante para a afinidade de ligação, ele por si só não é capaz de descrever os mecanismos de interação OBP-repelente, já que alguns compostos, tais como o β -Pinenos e o 1-Metilnaftaleno, apesar de possuírem um volume menor ($< 200 \text{ \AA}^3$) foram ligantes mais efetivos do que o Ftalato de dimetila, o Citral e o Eugenol, por exemplo.

Pressão de Vapor: A pressão de vapor (P) tem sido relatada como uma propriedade que pode estar diretamente interligada com a repelência de um composto. A tendência geral apresentada em dados teóricos e experimentais é que a repelência aumenta com o decréscimo de P (PALUCH et al., 2009; FABBRO; NAZZI, 2013). É um parâmetro físico que mede a volatilidade de uma substância e é dependente da temperatura do sistema; substâncias com alta pressão de vapor são mais voláteis. A volatilidade, por sua vez, depende da natureza química da substância e está diretamente relacionada com as forças que mantêm as moléculas coesas, como as forças de van der Waals. Para os estudos deste trabalho, foram obtidos valores de P a 25°C para os repelentes selecionados. A PCA mostrou que a afinidade de ligação repelente-AaegOBP1 aumenta com o decréscimo de P – destaques para Permetrina ($P = 0,000 \text{ Pa}$), N-(3-Metilbutil)-benzamida ($P = 0,022 \text{ Pa}$), Nepetalactona ($0,673 \text{ Pa}$), Icaridina ($0,059 \text{ Pa}$) e DEET ($0,266 \text{ Pa}$). Esses resultados são similares aos obtidos por Paluch et al. (2009), Fabbro e Nazzi (2013).

5.4 MODELO QSAR PARA A PREVISÃO DE ΔG

Em seguida, cerca de 20 modelos de Regressão Linear Múltipla foram testados para prever os valores de ΔG estimados pelo Docking, com o objetivo de mapear relações quantitativas entre as propriedades químico quânticas e a afinidade de ligação AaegOBP1-repelente. A análise resultou em um modelo estatisticamente significativo [$F(2,18) = 8,260$; $< 0,005$; $R^2 = 0,479$]. A energia de ionização ($\beta = 0,444$; $t = 2,594$; $p > 0,005$) e a correlação $e^{\log P \times V/RT}$ ($\beta = -0,582$; $t = -3,400$; $p < 0,005$) são previsores da energia de Gibbs, conforme a Eq. 4:

$$\Delta G_{lig} = -\beta_0 + \beta_1 I - \beta_2 e^{\frac{\log(P)V}{RT}} \quad (4)$$

onde I , $\log P$ e V são a energia de ionização, o coeficiente de partição e o volume molecular dos repelentes, respectivamente; R é a constante universal dos gases nas unidades $\text{cal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ que vale 1,987 e T é a temperatura em 298,15 K. Os coeficientes β_0 , β_1 e β_2 são iguais a 13,209, 0,740 e 0,019, respectivamente.

A equação exibe uma hipersuperfície de três variáveis (uma vez que R e T são constantes), com dependências negativa, positiva e exponencial. O termo $+\beta_1 I$ descreve as transferências de carga OBP-repelente em que, quanto maior o seu valor, maior deverá ser a energia de ligação e, conseqüentemente, menor a interação entre o ligante e a proteína. Curiosamente, o ajuste do modelo resultou em um coeficiente (β_1) muito próximo à constante de Boltzmann (k_B) que é $\cong 0,695 \text{ cm}^{-1}\cdot\text{K}$, onde $1\text{cm}^{-1} hc \cong 1,986\times 10^{-23} \text{ J}$. k_B é uma constante física que relaciona a temperatura e a energia cinética média relativa das moléculas com N graus de liberdade. Nesse caso, $+\beta_1 I$ também pode estar relacionado com a descrição real do complexo OBP-repelente, pois se o sistema for considerado com temperatura e pressão constantes (como foi no caso deste trabalho), a energia livre de Gibbs (G) pode fornecer os estados mais prováveis desse sistema, segundo a Eq. 5:

$$P(H, T) = e^{-\frac{H-TS}{k_B T}} \quad (5)$$

onde $H - TS$ é igual a G .

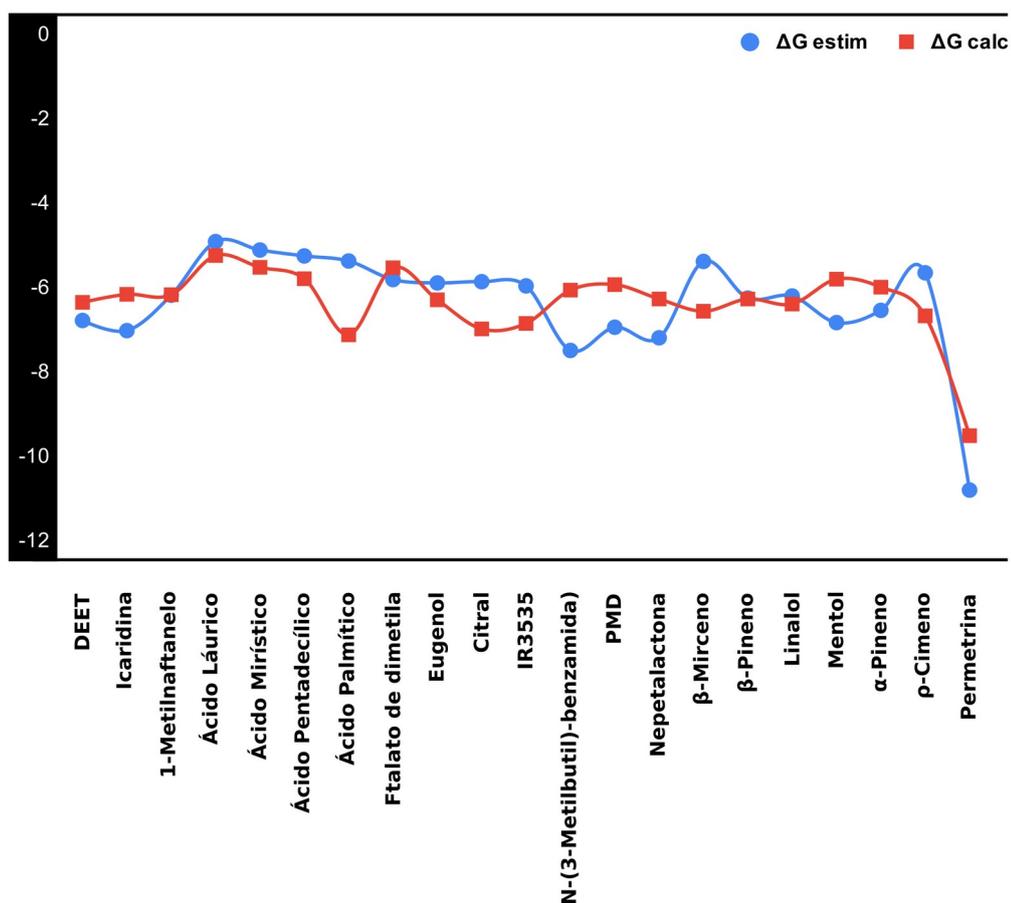
O segundo termo da equação $-\beta_2 e^{\log P \cdot V/RT}$ minimiza a energia do sistema, uma vez que carrega um sinal negativo. Assim, a magnitude de ΔG decresce à medida que o produto de $\log P$ vezes V aumenta. Como mencionado na seção anterior, as análises estatísticas indicaram que a interação OBP-repelente parece ser mediada por um valor de $\log P$ ideal, enquanto que o V do ligante deve possuir um valor próximo aos dos repelentes convencionais. Dado que o coeficiente de partição é uma constante de equilíbrio, a isotérmica de Van't Hoff diz que (Eq. 6):

$$\log(P) = -2,303\Delta H/RT + c \quad (6)$$

Isso é um indicativo de que o termo $-\beta_2 e^{\log P \cdot V/RT}$ pode ter uma relação direta com a entropia do sistema. O gráfico da Fig. 14 apresenta a proximidade entre os valores de energia de ligação

estimados pelo Docking (ΔG_{estim}) e calculados pela equação obtida da regressão linear múltipla (ΔG_{calc}) para a proteína AaegOBP1.

Figura 14 – Valores de ΔG estimados pelo Docking e calculados via regressão linear múltipla para a proteína AaegOBP1.



(Fonte: Elaborado pelo autor)

5.5 DISCUSSÕES GERAIS

Há indícios de que as propriedades estruturais e eletrônicas dos compostos se correlacionam com a afinidade de ligação OBP-repelente. Em geral, as duas proteínas, AaegOBP1 e AeOBP22, apesar de serem estruturalmente divergentes, podem interagir com todos os repelentes aqui selecionados de forma similar, considerando o erro médio do cálculo de energia livre nos estudos de Docking ($\pm 2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). AeOBP22 pode se ligar com uma maior afinidade a ácidos graxos de cadeia longa do que AaegOBP1; dependendo da concentração, os ácidos graxos de até 14 carbonos podem ser repelentes ou atrativos para o

Ae. aegypti, e isso reforça a hipótese de que a AeOBP22 pode estar envolvida na busca de hospedeiros e na regulação dos comportamentos alimentares do mosquito; ao passo de que AegOBP1 parece ser uma transportadora de repelentes naturais e sintéticos.

Apesar das ligações de hidrogênio serem primordiais para a potencialização das interações moleculares proteína-ligante, sua interpretação deve ser realizada com cautela, dada a sua natureza, a complexidade e a dinâmica dos sistemas biológicos. Em uma situação real, o processo de ligação de hidrogênio em um complexo proteico será dificultado pela presença das moléculas de água e a mudança na entropia do solvente. Por isso, é razoável que esse efeito possa ocorrer com as OBPs, principalmente considerando que essas biomoléculas se encontram imersas na linfa sensitiva. Uma simulação de Docking não considera as moléculas de água do sistema, o que o distancia consideravelmente de uma situação ideal para que o papel da ligação de hidrogênio seja totalmente elucidado nos mecanismos OBP-repelente.

Os ligantes selecionados neste trabalho realizaram, em média, pouco menos de 2 ligações de hidrogênio no sítio de ligação das proteínas. Dada a magnitude de ΔG apresentada nos resultados, é provável que a energia intrínseca dessas forças individuais não seja suficientemente alta para um ganho líquido na afinidade de ligação total. Simulações de dinâmica molecular poderiam auxiliar no esclarecimento dessas hipóteses, pois seria possível calcular a energia de ligação individual entre os resíduos da proteína e as moléculas. Por outro lado, é reconhecido que as interações hidrofóbicas são relativamente mais fortes do que as demais forças intermoleculares fracas, tais como as ligações de hidrogênio ou as forças de van der Waals. Neste trabalho, tanto as moléculas aromáticas quanto as alifáticas foram estabilizadas no sítio de ligação das proteínas por meio de várias interações hidrofóbicas. Isso sugere que esse tipo de interação impacta diretamente na eficiência dos ligantes e, conseqüentemente, na escolha de repelentes mais promissores que o DEET.

O modelo QSAR proposto sugere que parâmetros específicos do ligante são fundamentais para uma interação efetiva com a proteína AegOBP1, sendo que o potencial de ionização, o volume molecular e o coeficiente de partição se apresentaram como descritores favoráveis para a previsão do valor da energia livre de Gibbs.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mosquito *Ae. Aegypti* representa um sério problema de saúde pública a nível mundial, podendo transmitir várias doenças. A utilização de repelentes é um dos meios de profilaxia mais eficientes para evitar a interação entre vetores hematófagos e humanos, entretanto as pessoas ainda apresentam aversão a algumas propriedades dessas substâncias, como o odor e a aderência na pele. Ainda, pode ser que um dia os insetos acabem se adaptando aos repelentes mais comumente utilizados pela população: o DEET, a Icaridina, o PMD e o IR3535, tornando-os ineficientes ou diminuindo o seu tempo de proteção. Assim, há uma corrida constante pela busca de novos repelentes mais eficazes e acessíveis. Nesse sentido, é de suma importância que haja um conhecimento detalhado sobre as bases moleculares que permeiam a quimiorrecepção nos insetos.

Neste trabalho foram realizados estudos *in silico* com duas OBPs do *Ae. aegypti*, AaegOBP1 e AeOBP22 e 21 repelentes de insetos eficazes contra o mosquito. A metodologia de Docking molecular foi essencial para revelar as interações entre as OBPs e os repelentes selecionados. Os resultados indicaram que as duas OBPs podem se ligar efetivamente a todos os repelentes com afinidades de ligação diferentes, sendo que AaegOBP1 possui uma maior afinidade com os repelentes comerciais e naturais; não obstante, AeOBP22 pode interagir com uma maior especificidade a ácidos graxos de cadeias longas (entre 12 e 16 carbonos). Os ligantes são estabilizados no sítio de ligação das proteínas exclusivamente por interações hidrofóbicas e pelas forças de van der Waals. O inseticida sintético Permetrina apresentou a maior afinidade de ligação às duas OBPs, dentre os demais repelentes, realizando interações várias interações hidrofóbicas com o sítio ativo das proteínas. Enquanto que o *N*-(3-Metilbutil)-benzamida (sintético) e Nepetalactona (natural) exibiram uma interação mais efetiva com as OBPs do que os repelentes convencionais.

As análises estatísticas (PCA) revelaram que repelentes com uma polaridade ideal, mas especificamente, entre 2 e 6 Debye podem interagir mais efetivamente com a proteína AaegOBP1 e que o volume molecular não possui uma relação direta com a energia de Gibbs ou a constante de dissociação. O coeficiente de partição foi indicado como um parâmetro determinante para a intensificação das interações hidrofóbicas OBP-repelente, sendo que a afinidade parece ser mediada por um $\log P$ ideal que está compreendido entre 1,3 e 3,0. Repelentes com baixo potencial de ionização e dureza absoluta podem interagir mais eficientemente com as OBPs do *Ae. aegypti*; ao ponto de que substâncias menos voláteis, ou

seja, com pressão de vapor baixa, foram reportados como ótimos ligantes para AaegOBP1 e AaOBP22, reforçando as hipóteses propostas a nível experimental. Por fim, o modelo QSAR proposto neste trabalho sugere que a interação AaegOBP1 é mediada por valores baixos de potencial de ionização e um produto de $\log P \times V$ alto.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados aqui elucidados podem fornecer a base para a descoberta de novos repelentes de insetos mais eficazes que o DEET, bem como uma melhor compreensão sobre as bases moleculares da quimiorrecepção em *Ae. aegypti*. Desta forma, várias possibilidades estão abertas para a continuação deste trabalho.

A nível teórico:

- Considerar a flexibilidade do sítio ativo das OBPs durante o Docking. Isso aumenta o custo computacional, mas possivelmente é capaz fornecer resultados mais acurados.
- Restringir o estudo a apenas compostos aromáticos e estruturalmente similares ao DEET.
- Realizar simulações de dinâmica molecular com solvente explícito para elucidar a influência de possíveis moléculas de água conservadas no sítio de ligação das OBPs do *Ae. aegypti*.
- Calcular as energias de ligação individuais para cada resíduo de aminoácido interagente com os ligantes, a fim de compreender melhor a magnitude das ligações de hidrogênio no sistema.
- Estender o modelo QSAR com as propriedades $\log P$, V e I para novos repelentes.

A nível experimental:

- Medir as constantes de dissociação em situações de concentração iguais para todos os repelentes que foram selecionados e prever esses valores utilizando o modelo QSAR ajustado proposto neste trabalho.
- Elucidar a estrutura cristalográfica de raios-X de outra OBP do *Ae. aegypti* com identidade próxima à AegOBP1.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUIN, L. et al. Functional architecture of olfactory ionotropic glutamate receptors. **Neuron**, v. 69, n. 1, p. 44-60, 2011.

ALBUQUERQUE, J. V.; DOS SANTOS, L.; PIMENTEL, R. M. M. Olhar muito além do vetor: uma análise a partir do discurso coletivo sobre uso de plantas no controle de vetores. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 6, n. 14, p. 1003-1016, 2019.

ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 694-699, 2010.

BAKER, J. An algorithm for the location of transition states. **Journal of Computational Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 385-395, 1986.

BANCROFT, T. L. On the aetiology of dengue fever. **Australasian Medical Gazette**, v. 25, p. 17-18, 1906.

BARASA, S. S. et al. Repellent activities of stereoisomers of p-methane-3,8-diols against *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 5, p. 736-741, 2002.

BARCELLOS, C. et al. Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 18, n. 3, p. 285-304, 2009.

BARNARD, D. R. et al. Skip nav destination repellency of IR3535, KBR3023, para-menthane-3,8-diol, and DEET to black salt marsh mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Everglades National Park. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 895-899, 2002.

BENTON, R. et al. Atypical membrane topology and heteromeric function of Drosophila odorant receptors in vivo. **PLoS Biology**, v. 4, p. E20, 2006.

BENTON, R. et al. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors Drosophila. **Cell**, v. 136, n. 1, p. 149-162, 2009.

BERGMANN, E. D. et al. Study of synthetic compounds as repellents against the mosquitoes *Culex pipiens molestus* and *Aedes aegypti*. **Journal of Entomology**, v. 11, p. 15-31, 1976.

BESERRA, E. B. et al. Efeito da qualidade da água no ciclo de vida e na atração para oviposição de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 1016-1023, 2010.

BIESSMANN, H. et al. Isolation of cDNA clones encoding putative odorant binding proteins from the antennae of the malaria-transmitting mosquito, *Anopheles gambiae*. **Insect Molecular Biology**, v. 11, n. 2, p. 123-132, 2002.

- BODHE, Y. G.; WADHAI, V. S. Microbial diseases of fishes and their biological control using *Bacillus thuringiensis* with special references to *Channa marulias* and *Clarias batrachus*: a review. **International Journal of Current Engineering and Scientific Research**, v. 5, n. 1, p. 346- 353, 2018.
- BOHBOT, J. D.; DICKENS, J. C. Insect repellents: modulators of mosquito odorant receptor activity. **Plos One**, v. 5, n. 8, p. E12138, 2010.
- BOHBOT, J. et al. Molecular characterization of the *Aedes aegypti* odorant receptor gene family. **Insect Molecular Biology**, v. 16, n. 5, p. 525-537, 2007.
- BRASIL. **Guia de vigilância em saúde**. 1. ed., v. 3, Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- BRAZIL, R. P. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 263-264, 2013.
- BRITO, N. F. et al. Current and potential biotechnological applications of odorant-binding proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 8631-8648, 2020.
- BUESCHER, M. D. et al. The dose persistence relationship of deet against *Aedes aegypti*. **Mosq. News**, v. 43, n. 3, p. 364-366, 1983.
- BUTENANDT, A. Uber den sexual-lockstoff des seidenspinners *Bombyx mori*. **Reindarstellung und Konstitution. Z. Naturforschg**, b, v. 14, p. 283, 1959.
- BUTTERWICK, J. A. et al. Cryo-EM structure of the insect olfactory receptor Orco. **Nature**, v. 560, p. 447-452, 2018.
- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v. 21, n. 10, p. 1885-1886, 2015.
- CAROLINE, C. Permethrin. **Global Pesticide Campaigner**, v. 9, n. 3, p. 20, 1999.
- CARROLL, J. F. et al. Twelve-hour duration testing of cream formulations of three repellents against *Amblyomma americanum*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 22, n. 2, p. 144-151, 2008.
- CARROLL, S. P.; LOYE, J. PMD, a registred botanical mosquito repellent with DEET-like efficacy. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 3, p. 507-514, 2006.
- CASAS, A. et al. Plant resources of the Tehuacan-Cuicatlan Valley, Mexico. **Economic Botany**, v. 55, p. 129-166, 2001.
- CAVALCANTE, K. R. J.; TAUIL, P. L. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 26, n. 3, p. 617-620, 2017.
- CHEN, Q. et al. Olfactory ionotropic receptors in mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal Medical Entomology**, v. 54, n. 5, p. 1229-1235, 2017.

CHOO, Y-M. et al. Reverse chemical ecology approach for the identification of an oviposition attractant for *Culex quinquefasciatus*. **PNAS**, v. 115, n. 4, p. 714-719, 2018.

CILEK, J. E.; PETERSEN, J. L.; HALLMON, C. F. Comparative efficacy of IR3535 and DEET as repellents against adult *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 20, n. 3, p. 299-304, 2004.

COSTA, Z. G. et al. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 1, p. 11-26, 2011.

COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, p. 1788- 1798, 2013.

CROSET, V. et al. Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 8, p. E1001064, 2010.

DA SILVA, Renato C.; BASTOS, Cristiano C.; PAVÃO, Antonio C. High-TC fullerides. **Physica C: Superconductivity and its Applications**, v. 561, p. 13-17, 2019.

DEGENNARO, M. The mysterious multi-modal repellency of DEET. **Fly**, v. 9, n. 1, p. 45-51, 2015.

DICKE, M.; SABELIS, M. W. Infochemical terminology: should it be based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? **Funct. Ecol.**, v. 2, p. 131-139, 1988.

DITZEN, M. PELLEGRINO, M.; VOSSHALL, L. Insect odorant receptor are molecular targets of the insect repellent DEET. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1838-1842, 2008.

DRAPEAU, J. et al. Green synthesis of para-menthane3,8-diol from *Eucalyptus citriodora*: Application for repellent products. **Comptes Rendus Chimie**, v. 14, n. 7-8, p. 629-635, 2011.

EISNER, T. Catnip: Its raison d'être. **Science**, v.146, n. 3649, p. 1318-1320, 1964.

EPA. *Deet*, 2017. Disponível em: <<https://www.epa.gov/insect-repellents/deet>>. Acesso em 14 dez. 2020.

EPA. Pesticide Product Label, BUG REPELL IR3535 20% AEROSOL. 2008.

FABBRO, S. D.; NAZZI, F. From chemistry to behavior. Molecular structure and bioactivity of repellents against *Ixodes ricinus* ticks. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e67832, 2013.

FISCHER, E. Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 27, n. 3, p. 2985-2993, 1894.

GÖLDI, Emil August; GOELDI, Emílio Augusto. **Os mosquitos no Pará: reunião de quatro trabalhos sobre os mosquitos indígenas, principalmente as espécies que molestam o homem**. C. Wiegandt, 1905.

GOLDING, N. et al. Integrating vector control across diseases. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2015.

GOODYER, L. et al. Characterisation of action of p-methane-3,8-diol repellent formulations against *Aedes aegypti* mosquitoes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 114, n. 9, p. 687-692, 2020.

GOODYER, L. I. et al. Expert review of the evidence base for arthropod bite avoidance. **Journal of Travel Medicine**, v. 17, n. 3, p. 182-192, 2010.

GOODYER, L.; SCHOFIELD, S. Mosquito repellents for the traveller: does picaridin provide longer protection than DEET? **Journal of Travel Medicine**, v. 25, n. suppl_1, p. S10-S15, 2018.

GOUCK, H. K. et al. Repellency of homologous series of cyclohexane aliphatic acids and amides. **J. Econ. Entomol.**, v. 50, p. 175-177, 1957.

GRISOTTI, M. Doenças infecciosas emergentes e a emergência das doenças: uma revisão conceitual e novas questões. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. Supl. 1, p. 1095-1104, 2010.

GUO, M. et al. Variant ionotropic receptors are expressed in olfactory sensory neurons of coeloconic sensilla on the antenna of the desert locust (*Schistocerca gregaria*). **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2013.

HALLEN, E. A.; DAHANUKAR, A.; CARLSON, J. R. Insect odor and taste receptors. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 113-135, 2006.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2012.

HONÓRIO, N. A. et al. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 906-908, 2015.

HONSON, N. et al. Structure-activity studies with pheromone-binding proteins of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Chemical Senses**, v. 28, n. 6, p. 479-489, 2003.

ISHIDA, Y.; LEAL, W. S. Rapid inactivation of a moth pheromone. **PNAS**, v. 102, n. 39, p. 14075-14079, 2005.

JIANG, Q-Y. et al. Binding specificity of locust odorant binding protein and its key binding site for initial recognition of alcohols. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 7, p. 440-447, 2009.

JOHNSON, K. N. The impact of Wolbachia on virus infection in mosquitoes. **Viruses**, v. 7, n. 11, p. 5705-5717, 2015.

JONES, W. D. et al. Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in *Drosophila*. **Nature**, v. 445, n. 7123, p. 86-90, 2007.

KATRITZKY, A. R. et al. QSAR study of mosquito repellents using Condessa Pro. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 2306-2311, 2006.

KATRITZKY, A. R. et al. Quantitative correlation of physical and chemical properties with chemical structure: utility for prediction. **Chemical reviews**, v. 110, n. 10, p. 5714-5789, 2010.

KATRITZKY, A. R. et al. Synthesis and bioassay of improved mosquito repellents predicted from chemical structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 21, p. 7359-7364, 2008.

KATZ, T. M.; MILLER, J. H.; MILLER, A. A. Insect repellents: Historical perspectives and new developments. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 5, p. 865-871, 2008.

KAUPP, U. B. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, p. 188-200, 2010.

KNUDSEN, A. B.; SLOOFF, R. Vector-borne disease problems in rapid urbanization: new approaches to vector control. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 70, n. 1, p. 1-6, 1992.

KRONBERG, B. The hydrophobic effect. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 22, p. 14-22, 2016.

LANG, J. Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. Supl. 18, p. S15-S17, 2012.

LARSSON, M. C. et al. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for Drosophila olfaction. **Neuron**, v. 43, n. 5, p. 703-714, 2004.

LEAL, W. S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 373-391, 2013.

LEAL, W. S. Pheromone reception. In: SCHULZ, S. (Ed.) **The chemistry of pheromones and other semiochemicals II**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. p. 1-36.

LEAL, W. S. The enigmatic reception of DEET – the gold standard of insect repellents. **Neuroscience**, v. 6, p. 93-98, 2014.

LEE, J. et al. Effect of the tropical repellent para-methane-3,8-diol on blood feeding behavior and fecundity of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. **Insects**, v. 9, n. 60, p. 1-11, 2018.

LEFFINGWELL, J. C. *Cool without menthol & cooler than menthol and cooling compounds as insect Repellents*, 2018. Disponível em:
<http://www.leffingwell.com/cooler_than_menthol.htm>. Acessado em 15 dez. 2020.

LEITE, N. R. et al. Structure of an odorant-binding protein from the mosquito *Aedes aegypti* suggests a binding pocket covered by a pH-sensitive “lid”. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. E8006, 2009.

- Li et al. Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, n. 3, p. 464-468, 2008.
- LI, Q.; LIBERLES, S. D. Aversion and attraction through olfaction. **Current Biology**, v. 25, n. 3, p. R120-R129, 2015.
- LIMA-CAMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, p. 36, 2016.
- LIU, N-Y.; HE, P.; DONG, S-L. Binding properties of pheromone-binding proteins 1 from the common cutworm *Spodoptera litura*. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part B**, v. 161, n. 4, p. 295-302, 2012.
- LOCROIX, R. et al. Open field release of genetically engineered sterile male *Aedes aegypti* in Malaysia. **PloS One**, v. 7, n. 8, p. E42771, 2012.
- LORENZO, M. G.; MELO, A. C. A. Olfacção e comportamento. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**, v. 1, p. 1-20, 2012.
- LU, T. et al. Odor coding in the maxillary palp of the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. **Current Biology**, v. 17, n. 18, p. 1533-1544, 2007.
- LUNDIN, C. et al. Membrane topology of the Drosophila OR38b odorant receptor. **FEBS Letters**, v. 581, n. 29, p. 5601-5604, 2007.
- LUZ, K. G.; SANTOS, G. I. V.; VIEIRA, R. M. Febre pelo vírus Zika. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 4, p. 785-788, 2015.
- MA, D. et al. Predicting mosquito repellent potency of N,N-Diethyl-m-Toluamide (DEET) analogs from molecular electronic properties. **Med. Hyg.**, v. 60, n. 1, p. 1-6, 1999.
- MAIA, M. F.; MOORE, S. J. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. **Malaria Journal**, v. 10, n. S11, 1-15, 2011.
- MCIVER, S. B. A model for the mechanism of action of the repellent DEET on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal Medical Entomology**, v. 18, n. 5, p. 357-361, 1981.
- MCMENIMAN, C. J. et al. Multimodal integration of carbon dioxide and other sensory cues drives mosquito attraction to humans. **Cell**, v. 156, n. 5, p. 1060-1071, 2014.
- MEDEIROS, A. C. et al. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 34, 2020. **Boletim Epidemiológico**, v. 51, n. 41, 2020a.
- MEDEIROS, A. C. et al. Situação epidemiológica da febre amarela no monitoramento 2019/2020. **Boletim Epidemiológico**, v. 51, n. 24, p. 12-22, 2020b.
- MENGER, D. J. et al. Field evaluation of a push-pull system to reduce malaria transmission. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123415, 2015.

- MISSBACH, C. et al. Evolution of insect olfactory receptors. **eLife**, v. 3, p. E02115, 2014.
- MOMBAERTS, P. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. **Science**, v. 286, n. 5440, p. 707-711, 1999.
- MOORE, S. J.; DEBBOUN, M. History of insect repellents. In: **Insect Repellents: Principles, Methods and Uses**. CRC Press: 2006, p. 1-29.
- MOORE, S. J.; LENGLET, A.; HILL, N. Plant-based insect repellents. In: **Insect repellents: principles, methods, and use**. CRC Press: 2006, p. 276-296.
- MOPAC2016, Stewart, J. J. P. Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net) (2016).
- MOUSSON, L. et al. Phylogeography of *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (L.) and *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) base on mitochondrial DNA variations. **Genetics Research**, v. 86, p. 1-11, 2005.
- MPUHLU, B. **Synthesis of p-methane-3,8-diol**. 2007. Tese de Doutorado. Nelson Mandela Metropolitan University.
- NAKAGAWA, T. et al. Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. **Science**, v. 307, n. 5715, p. 1638-1642, 2005.
- NASCI, R. S. Movement of Chikungunya virus into the Western hemisphere. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 8, p. 1394-1395, 2014.
- NAVES, Y. R.; OCHSNER, P. A. **Acetals of p-menthane-diol-3,8 and p-menthene-1-diol-3,8 and method of preparing same**. U.S. Patent n 3,461,138, 12 ago. 1969.
- NELSON, M. J. ***Aedes aegypti*: biology and ecology**. Washington, DC: Panamerican Health Organization, 1986.
- NENE, V. et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, v. 316, n. 5832, p. 1718-1723, 2007.
- NESTERKINA, M. et al. Repellent activity of monoterpenoid esters with neurotransmitter amino acids against yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Open Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 95-98, 2018.
- NEVES, Ú. *Novo exame detecta 4 tipos de dengue, além de zika e chikungunya*, 2019.
- NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, n. 2, p. 211-220, 1976.
- PALUCH, G. et al. Quantitative structure–activity relationship of botanical sesquiterpenes: Spatial and contact repellency to the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7618-7625, 2009.

PALUCH, G.; BARTHOLOMAY, L.; COATS, J. Mosquito repellents: a review of chemical structure diversity and olfaction. **Pest Manag Sci**, v. 66, p. 925-935, 2010.

PAOLINI, S. et al. Porcine odorant-binding protein: structural stability and ligand affinities measured by Fourier-transform infrared spectroscopy and fluorescence spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1431, n. 1, p. 179-188, 1999.

PARAMASIVAN, R. et al. Prediction of 3-dimensional structure of salivary odorant-binding protein-2 of the mosquito *Culex quinquefasciatus*, the vector of human lymphatic filariasis. **In Silico Biol**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2007.

PELOSI, P. Odorant-binding proteins. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 3, p. 199-228, 1994.

PELOSI, P.; CALVELLO, M.; BAN, L. Diversity of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in insects. **Chemical Senses**, v. 30, n. Suppl 1, p. i291-i292, 2005.

PETERSON, C.; COATS, J. Insects repellents: Past, present and future. **Pestic Outlook**, v. 12, p. 154-158, 2001.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PIALOUX, G. et al. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 319-327, 2007.

POWELL, J. R. Mosquito-borne human viral diseases: why *Aedes aegypti*? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 6, p. 1563-1565, 2018.

PRETORIUS, A-M.; JENSENIUS, M.; CLARKE, F.; RINGERTZ, S. H. Repellent efficacy of DEET and KBR 3023 against *Ambyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 2, p. 245-248, 2003.

RAJI, J. I. et al. *Aedes aegypti* mosquitoes detect acid volatiles found in human odor using the IR8a pathway. **Current Biology**, v. 29, n. 8, p. 1253-1262, 2019.

RAY, A. Reception of odors and repellents in mosquitoes. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 34, p. 158-164, 2015.

REED, W.; CARROLL, J. The prevention of yellow fever. **Public Health Papers and Reports**, v. 27, p. 113-129, 1901.

REICHERT, W. et al. Repellency assessment of *Nepeta cataria* essential oils and isolated nepetalactones on *Aedes aegypti*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

RICE, C. M. et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science**, v. 229, n. 4715, p. 726-733, 1985.

ROBERTSON, H. M. et al. Enormous expansion of the chemosensory gene repertoire in the omnivorous German cockroach *Blattella germanica*. **Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution**, v. 330, n. 5, p. 265-278, 2018.

ROBERTSON, H. M.; KENT, L. B. Evolution of the gene lineage encoding the carbon dioxide receptor in insects. **Journal of Insect Science**, v. 9, n. 19, p. 1-14, 2009.

ROBERTSON, H. M.; WARR, C. G.; CARLSON, J. R. Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. **PNAS**, v. 100, n. Suppl. 2, p. 14537-14542, 2003.

ROUKENS, A. H.; VISSER, L. G. Yellow fever vaccine: past, present and future. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 8, n. 11, p. 1787-1795, 2008.

RUSCONI, B. et al. Mapping the *Anopheles gambiae* odorant binding protein 1 (AgamOBP1) using modeling techniques, site direct mutagenesis, circular dichrois and ligand binding assays. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1824, n. 8, p. 947-953, 2012.

RUST, N. **The development of a commercial production process for p-methane-3,8-diol**. 2009. Tese de Doutorado. Nelson Mandela Metropolitan University.

SABERI, M.; SEYED-ALLAEI, H. S. Odorant receptors of *Drosophila* are sensitive to the molecular volume of odorants. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

SACHSE, S.; KRIEGER, J. Olfaction in insects. **e-Neuroforum**, v. 2, p. 49-60, 2011.

SALGE, A. K. M. et al. Infecção pelo vírus Zika na gestação e microcefalia em recém-nascidos: revisão integrativa de literatura. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 18, p. e.1150, 2016.

SANDLER, B. H. et al. Sexual attraction in the silkworm moth: structure of the pheromone-binding-protein-bombykol complex. **Chemistry & Biology**, v. 7, n. 2, p. 143-151, 2000.

SANFORD, J. L.; SHIELDS, V. D. C.; DICKENS, J. C. Gustatory receptor neuron responds to DEET and other insect repellents in the yellow-fever *Aedes aegypti*. **Naturwissenschaften**, v. 100, n. 3, p. 269-273, 2013.

SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible association between zika virus infection and microcephaly – Brazil, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 59-62, 2016.

SCOTT, K. et al. A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. **Cell**, v. 104, n. 5, p. 661-673, 2001.

SESA. *Mosquito – Aedes aegypti*, 2020.

SILBERING, A. F. et al. Complementary function and integrated wiring of the evolutionarily distinct *Drosophila* olfactory subsystems. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 38, p. 13357-13375, 2011.

SILVA, J. W. F.; PEREIRA, T. A. Oportunidades da química teórica e computacional para a iniciação científica. **Revista Semiárido de Visu**, v. 8, n. 2, 391-419, 2020.

SIMMONS, C. P. et al. Dengue. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, p. 1423-1432, 2012.

SMALLEGANGE, R. C. et al. Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). **Chemical Senses**, v. 30, n. 2, p. 145-152, 2005.

SOUZA, T. M. A. **Vigilância do vírus Chikungunya na atual tríplice epidemia de arbovírus no Brasil: investigação de casos suspeitos e genotipagem dos vírus circulantes**. 2016. 140 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária)-Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2016.

SPECOS, M. M. M. et al. Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 104, n. 10, p. 653-658, 2010.

SUH, E.; BOHBOT, J. D.; ZWIEBEL, L. J. Peripheral olfactory signaling in insects. **Current Opinion in Insect Science**, v. 6, p. 82-92, 2014.

SURYANARAYANA, M. V. S. et al. Structure-activity relationship studies with mosquito repellent amides. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 80, n. 11, p. 1055-1057, 1991.

TABANCA, N. et al. Bioactivity-guided investigation of geranium essential oils as natural tick repellents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 17, p. 4201-4107, 2013.

TANG, R. et al. The olfactory reception of acetic acid and ionotropic receptors in the oriental armyworm, *Mythimna separarata* walker. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 118, p. 103312, 2020.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle da febre amarela no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 3, p. 555-558, 2010.

TAWATSIN, A. et al. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. **Journal of Vector Ecology**, v. 26, n. 1, p. 76-82, 2001.

TESH, R. B. et al. Experimental yellow fever virus infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). I. Virologic, biochemical and immunologic studies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 10, p. 1431-1436, 2001.

THORNE, N.; AMREIN, H. Atypical expression of *Drosophila* gustatory receptor genes in sensory and central neurons. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 506, n. 4, p. 548-568, 2008.

TIAN, Z.; LIU, J.; ZHANG, Y. Structural insights into *Cydia pomonella* pheromone binding protein 2 mediated prediction of potentially active semiochemicals. **Scientific Reports**, v. 6, n. 22336, p. 1-11, 2016.

TURELL, M. J.; LUDWIG, G. V.; BEAMAN, J. R. Transmission of venezuelan equine encephalomyelitis virus by *Aedes sollicitans* and *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 29, n. 1, p. 62-65, 1992.

UJVARI, S. C. A história da disseminação dos microrganismos. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 171-182, 2008.

VASCONCELOS, P. F. C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? **Revista Pan-Amazônica Saúde**, v. 6, n. 2, p. 9-10, 2015.

VENTHUR, H. et al. Ligand binding and homology modelling of insect odorant binding proteins. *Physiological Entomology*, v. 39, n. 3, p. 183-198, 2014.

VERNÈDE, R.; MEER, M. M. M.; ALPERS, M. P. Smoke as form of personal protection against mosquitos, a field study in Papua New Guinea. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 25, p. 771-775, 1994.

VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. Introdução aos semioquímicos e terminologia. In: VILLELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (Eds.). **Feromônios de insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 9-12.

VOGT, R. G.; RIDDIFORD, L. M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. **Nature**, v. 293, n. 5828, p. 161-163, 1981.

VOSSHALL, L. B.; HANSSON, B. S. A unified nomenclature system for the insect olfactory coreceptor. **Chemical Senses**, v. 36, n. 6, p. 497-498, 2011.

WAGMAN, J. M. et al. The field evaluation of a push-pull system control malaria vectors in Northern Belize, Central America. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 184, 2015.

WANG, J. et al. *Aedes aegypti* odorant binding protein 22 selectively binds fatty acids through a conformational change in its C-terminal tail. **Scientific Reports**, v. 10, n. 3300, p. 1-15, 2020.

WANG, Y. et al. PubChem: a public information system for analyzing bioactivities of small molecules. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl_2, p. W623-W633, 2009.

WANNER, K. W. et al. Female-biased expression of odorant receptor genes in the adult antennae of the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Molecular Biology**, v. 16, n. 1, p. 107-119, 2007.

WHO. *Vector-borne diseases*, 2020.

WILLS, B. A. et al. Comparasion of three fluid solutions for ressucitation in dengue shock syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, p. 877-889, 2005.

WILSON, A. L. et al. The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. E0007831, 2020.

WISTRAND, M.; KALL, L.; SONNHAMMER, E. L. A general model of G protein-coupled receptor sequence and its application to detect homologs. **Protein Science**, v. 15, n. 3, p. 509-521, 2006.

WOGULIS, M. T. et al. The crystal structure of an odorant binding protein from *Anopheles gambiae*: evidence for a common ligand release mechanism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, n. 1, p. 157-164, 2006.

XU, P. et al. Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 111, n. 46, 2014.

XU, P. X. ZWIEBEL, L. J.; SMITH, D. P. Identification of a distinct family of genes encoding atypical odorant-binding proteins in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. **Insect Molecular Biology**, v. 12, n. 6, p. 549-560, 2003.

XUE, R-D.; BARNARD, D. Laboratory Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). **J. Med Entomol.**, v. 41, n. 4, p. 726-730, 2004.

YANG, R. et al. Structural transformation detection contributes to screening of behaviorally active compounds: dynamic binding process analysis of DhelOBP21 from *Dastarcus helophoroides*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 43, n. 11-12, p. 1033–1045, 2017.

YAP, H. H. et al. Field efficacy of a new repellent, KBR 3023, against *Aedes albopictus* (SKUSE) and *Culex quinquefasciatus* (SAY) in a tropical environment. **Journal of Vector Ecology**, v. 23, n. 1, p. 62-68, 1998.

YIN, N-N. et al. The ionotropic receptor gene family in Lepidoptera and Trichoptera: annotation, evolutionary and functional perspectives. **Genomics**, 2020.

ZACHARUK, R. Y. Ultrastructure and function of insect chemosensilla. **Annual Review of Entomology**, v. 25, p. 27-47, 1980.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

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

ZHONG, T. et al. Fluorescence competition assay for the assessment of green leaf volatiles and trans- β -farnesene bound to three odorant-binding proteins in the wheat aphid *Sitobion avenae* (Fabricius). **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 6, p. 771-781, 2012.

ZHOU, J-J. et al. Genome and EST analyses and expression of a gene family with putative functions in insect chemoreception. **Chemical Senses**, v. 31, n. 5, p. 453-465, 2006.