



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102020011569-3

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102020011569-3

(22) Data do Depósito: 09/06/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 14/12/2021

(51) Classificação Internacional: C07C 255/41; A01N 37/38; A01P 7/04.

(52) Classificação CPC: C07C 255/41; A01N 37/38.

(54) Título: USO DO (E)-ETIL-2-CIANO-3-(3,5-DI-TERC-BUTIL-4-HIDROXIFENIL)ACRILATO (LQM353) E SUA APLICAÇÃO COMO AGENTE LARVICIDA PARA CONTROLE DE MOSQUITOS DA ESPÉCIE AEDES AEGYPTI (DIPTERA: CULICIDAE)

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 24464109000148. Endereço: AV. LOURIVAL MELO MOTA, S/N, TABULEIRO DO MARTINS, MACEIÓ, AL, BRASIL(BR), 57072-970, Brasileira

(72) Inventor: MATHEUS GABRIEL MOURA GOMES; EDEILDO FERREIRA DA SILVA JÚNIOR; GABRIEL PASSOS; SARALINY BEZERRA FRANÇA; THIAGO MENDONÇA DE AQUINO; JOÃO XAVIER DE ARAÚJO JÚNIOR; DIMAS JOSÉ DA PAZ LIMA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 09/06/2020, observadas as condições legais

Expedida em: 26/11/2024

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**Uso do (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) e sua Aplicação como Agente Larvicida para Controle de Mosquitos da Espécie *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**”

[001] O presente pedido de patente descreve o uso do (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**), com massa molecular igual a 329,43 g/mol e fórmula química $C_{20}H_{27}NO_3$, bem como, utilizar esse como um novo inseticida sintético capaz de matar formas imaturas (larvas do 4º instar e pupas) de mosquitos da espécie *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

[002] Até a presente data, não há registros de patentes e/ou depósitos utilizando tal composto para combater esta espécie de artrópode, nem de nenhuma outra espécie. De acordo com Govindarajan e Karuppannan (Govindarajan, Marimuthu & Karuppannan. Mosquito larvicidal and ovicidal properties of *Eclipta alba* (L.) Hassk (Asteraceae) against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(1), 24–28, 2011), mosquitos são responsáveis pela disseminação de várias doenças infecciosas entre os seres humanos.

[003] A espécie *Ae. aegypti* é considerada o principal vetor dentre as arboviroses, sendo responsável pela transmissão dos vírus Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV), de acordo com Lindsay et al. (Lindsay, Steve et al. Improving the Built Environment in Urban Areas to Control *Aedes aegypti* – Borne Diseases. *Bulletin of the World Health Organization*, 95(8), 607-608, 2017).

[004] De acordo com Cui et al (Cui, Yan Chao et al. Bone Breaking Infections – A Focus on Bacterial and Mosquito-Borne Viral Infections. *Microbial Pathogenesis*, 122, 130-136, 2018), a principal doença transmitida por mosquitos *Ae. aegypti* e a febre do Dengue (DENV), cujo causa grande impactos na saúde do indivíduo acometido (com elevada morbimortalidade) e ainda, apresenta alta taxa de disseminação.

[005] Essa disseminação facilitada é devido à adaptação do *Ae. aegypti* à vida urbana, em que pode realizar hematofagia em vários indivíduos humanos em um único repasto sanguíneo, assim transmitindo efetivamente diferentes arboviroses.

[006] Tais informações são resultados do estudo desenvolvido por Patterson et al (Patterson, Jessica et al. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *Western Journal of Emergency Medicine*, 17(6), 671-679, 2016).

[007] O *Ae. aegypti* possui obrigatoriamente quatro estágios de desenvolvimento, sendo ovo, larva, pupa e o inseto adulto propriamente dito (Faucon, Frederic et al. Identifying Genomic Changes Associated with Insecticide Resistance in the Dengue Mosquito *Aedes aegypti* by Deep Targeted Sequencing. *Genome Research*, 25(9), 1347-1359, 2015).

[008] Dessa forma, um estudo desenvolvido por McFee et al (McFee, Robin et al. Mosquito Vector. *Disease-a-Month*, 64(5), 213-221, 2018) sugere que o controle efetivo de mosquitos *Ae. aegypti*, bem como outros vetores, seja realizado por meio do combate às formas imaturas destes, as quais são os ovos, larvas e pupas.

[009] As larvas de mosquitos *Ae. aegypti* possuem uma alta plasticidade ecológica, o que permite que elas sobrevivam até 48 horas em um ambiente completamente desidratado, segundo Estrada-Franco & Craig (Estrada-Franco & Craig. Biology, disease relationships and control of *Aedes albopictus*. Technical Paper No. 42, Pan American Health Organization, *Regional Office of World Health Organization*, 1-49, 1995).

[010] Além disso, mosquitos e larvas de *Ae. aegypti* podem desenvolver diferentes graus de resistências aos inseticidas utilizados atualmente (principalmente, organofosforados e piretroides), segundo Deming et al (Deming, Regan et al. Spatial Variation of Insecticide Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti* Presents Unique Vector Control Challenges. *Parasites & Vectors*, 9(1), 67, 2016) e Smith et al (Smith, Letícia B. et al. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important Mosquito Vectors of Human Diseases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 133, 1-12, 2016).

[011] Assim, o desenvolvimento e aplicação de novos agentes larvicidas (inseticidas) se torna extremamente urgente, caracterizando-se como uma necessidade não atendida. Além disso, esses têm a habilidade de atuar sobre as formas imaturas do mosquito e impedir o surgimento de mosquitos adultos, reduzindo, consequentemente, a disseminação de impactantes arboviroses que acometem o hospedeiro humano.

[012] Nesse contexto, o presente pedido de patente descreve o uso do (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**), como agente larvicida e pupicida deste análogo nitrilado frente a larvas do 4º instar e pupas de *Ae. aegypti*, cujo métodos *in silico* sugerem que são provenientes de interações do (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) com a isoforma épsilon-2 da glutationa S-transferase (GSTe2) do *Ae. aegypti*.

PROBLEMA QUE A INVENÇÃO SE PROPOE A RESOLVER

[013] Mosquitos *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), assim como outros vetores de doenças infecciosas, são pragas importantes que transmitem diversas doenças, incluindo a febre do dengue (DENF) e encefalites virais (MEHLHORN; SCHMAHL; SCHMIDT, 2005).

[014] A DENF é transmitida principalmente por mosquitos *Ae. aegypti* que circulam em ambientes peri-domésticos que contenham reservatórios de água limpa e parada, tanto fora quanto dentro das casas (BENELLI; MEHLHORN, 2016). As fêmeas adultas de *Ae. aegypti* possuem caráter extremamente antropofílico, demonstrando preferência por ambientes urbanos (LIU-HELMERSSON et al., 2014; MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017). Esses utilizam os reservatórios de água humanos para depositarem seus ovos, permitindo o desenvolvimento de seu ciclo de vida bifásico (CUI et al., 2018; LINDSAY et al., 2017).

[015] Esta espécie de mosquito exibe uma alta plasticidade ecológica, o que permite que ele explore uma grande variedade de ambientes (naturais e urbanos) e seja capaz de sobreviver a temperaturas abaixo de zero, até -10 °C (WALDOCK et al., 2013). As larvas que eclodem dos ovos resistem à desidratação completa do ambiente por até 48 horas. À temperatura ótima de 25 °C, essas se tornam pupas, após o 4º instar. Por fim, os mosquitos adultos emergem e pronto para reproduzirem, após aproximadamente 48 horas (ESTRADA-FRANCO; CRAIG, 1995).

[016] Campanhas para controle do mosquito têm encorajado a população a reduzir os reservatórios de água e utilizar compostos larvicidas nestes, visando o controle da população de mosquitos adultos. Estas técnicas integradas ajudam a reduzir as populações de larvas e mosquitos (NEVES FILHO et al., 2009). No entanto, uma vez na água, as larvas irão evoluir para mosquitos adultos, quando o agente larvicida não for devidamente eficaz.

Ademais, McFee et al. afirmam que o controle de mosquitos *Ae. aegypti* (ou outros vetores) deve se concentrar em suas formas imaturas (ovo, larva e pupa). Desse modo, a utilização de compostos como inseticidas/larvicidas é de fundamental importância para o controle efetivo dos vetores e, conseqüentemente, das doenças infecciosas que esses podem transmitir (MCFEE; BUSH; VAZQUEZ-PERTEJO, 2018).

[017] Por fim, almeja-se que com a utilização do (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) como agente larvicida possa ser capaz de reduzir significativamente as populações de mosquitos *Ae. aegypti*, assim, reduzindo (a longo prazo) o número de novos casos de humanos infectados por arboviroses, uma vez que o (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) impede o desenvolvimento completo do ciclo de vida desta espécie de mosquito, por provável interação com a isoforma épsilon-2 da glutathione S-transferase (GSTe2) do *Ae. aegypti*.

CAMPO DE ATUAÇÃO

[018] O (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) acrilato (**LQM353**), um análogo nitrilado, abrangerá o campo da ecologia química, uma vez que esse poderá ser aplicado no controle de pragas, nesse caso, de mosquitos da espécie *Aedes egypti* (Diptera, Culicidae).

[019] Desse modo, o (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) irá atuar como um agente larvicida para combater o principal vetor das febres do Dengue, Chikungunya e Zika, reduzindo o número de novos casos de infecções por arboviroses em humanos e, de certa forma, refletindo seu efeito no campo da saúde pública.

[020]

ESTADO DA TÉCNICA

[021] Os mosquitos são responsáveis pela disseminação de mais doenças do que qualquer outro artrópode no planeta (GOVINDARAJAN, 2010; GOVINDARAJAN; KARUPPANNAN, 2011), em que todos esses possuem quatro estágios distintos em seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e inseto adulto (FAUCON et al., 2015).

[022] Estes artrópodes têm evoluído para desenvolverem seu ciclo de vida, desde o estágio larval até o inseto adulto, próximo aos hospedeiros humanos, preferindo alimentar-se de sangue humano a outros mamíferos, podendo realizar hematofagia em vários indivíduos em um único repasto sanguíneo.

[023] Esse comportamento pode transmitir rapidamente um vírus a múltiplos hospedeiros em um curto período de tempo, assim, eficientemente propagando doenças (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016). Dentre tais doenças, a malária (*Anopheles stephensi*), filariose linfática (*Culex quinquefasciatus*), febre do Nilo Ocidental, e as encefalites japonesa equina e St. Louis são espalhadas por meio destes artrópodes em todo o mundo (BENELLI; MEHLHORN, 2016; BERNHARD; BERNHARD; MAGNUSSEN, 2003; SANTHOSH; YUVARAJAN; NATARAJAN, 2015).

[024] A espécie de mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) representa o principal vetor de doenças transmitidas por artrópodes (arboviroses), tais como a febre do Dengue (DENV), do Chikungunya (CHIKF) e do Zika (ZIKF) (LINDSAY et al., 2017; LO PRESTI et al., 2014; RODRIGUEZ-MORALES, 2015).

[025] Adicionalmente, a espécie *Ae. albopictus* (Skuse), conhecida por mosquito tigre asiático, é responsável por transmitir tais arboviroses (DA SILVA-JÚNIOR et al., 2017; KRAEMER et al., 2019; SILVA-JÚNIOR; SCHIRMEISTER; ARAÚJO-JÚNIOR, 2018; SKUSE, 1895). A globalização dessas é um produto da presença de mosquitos do gênero *Aedes* em muitas partes do mundo, e do aumento das viagens intercontinentais humanas, que favorecem a distribuição geográfica de tais doenças infecciosas.

[026] Entretanto, a proliferação de mosquitos do gênero *Aedes* é de difícil previsão, porém, pode ser restringida aplicando-se medidas preventivas apropriadas (IMPERATO, 2016).

[027] Dentre tais doenças infecciosas, a DENV, causada pelo DENV, é considerada como a mais predominante e facilmente disseminada entre seres humanos, causando

sérios impactos na saúde dos indivíduos infectados (CUI et al., 2018; GUZMAN; HARRIS, 2015; PANDIYAN; MATHEW; MUNUSAMY, 2019).

[028] Além disso, as doenças transmitidas por mosquitos não somente causam altos níveis de morbimortalidade, mas também afetam grandiosamente a economia global, incluindo principalmente perdas na comercialização de produtos, particularmente, em países tropicais e subtropicais.

[029] Entretanto, nenhuma parte do mundo está completamente a salvo de uma epidemia destas doenças (FRADIN; DAY, 2002). Nas últimas décadas, há indícios de que esta doença tem aumentado, atingindo novos países e vem sendo motivo de preocupação para o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) nos Estados Unidos da América (EUA), bem como, para o governo brasileiro (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016; PETERSEN et al., 2016).

[030] Nas Américas, cerca de 2,8 milhões de casos foram reportados em 2019, em que apenas no Brasil foram registrados 1,5 milhões destes casos, representando uma marca histórica (MOLOO, 2020).

[031] Recentemente, as infecções causadas pelos CHIKV e ZIKV têm recebido mais atenção devido a um aumento da taxa de incidência desses e à associação de ZIKV e microcefalia em recém-nascidos, entre os anos de 2014 e 2015 no Nordeste do Brasil (CARNEIRO; TRAVASSOS, 2016; PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016). Além disso, o ZIKV tem o agravante fator de está associado à transmissão vertical (mãe-bebê) em pacientes gestantes (MENESES et al., 2017; PLATT; MINER, 2017).

[032] De modo geral, o combate às doenças infecciosas supracitadas é altamente dependente do controle das populações de seus vetores por meio de inseticidas/larvicidas (HADDI et al., 2017; LIMA et al., 2011; RANSON; LISSENDEN, 2016; RODRÍGUEZ; BISSET; FERNÁNDEZ, 2007).

INSETICIDAS NO COMBATE A MOSQUITOS *Aedes aegypti*

[033] Um método óbvio para prevenção da disseminação de doenças transmitidas por mosquitos vetores é o controle populacional desses por meio do uso de inseticidas, que têm sido empregados em campo com considerável sucesso, desde a Segunda Guerra Mundial (FAUCON et al., 2015; REDWANE et al., 2002; SIVAKUMAR et al., 2011).

[034] Ainda, a erradicação destes artrópodes durante o estágio larval é considerado um método de prevenção e gerenciamento de pragas ainda mais eficaz (ELUMALAI et al., 2016). O controle do vetor utilizando agentes larvicidas em reservatórios que contêm ovos do mosquito representa uma técnica primordial para controle e gerenciamento desse (DUSFOUR et al., 2011).

[035] A aplicação de planos de controle e combate a mosquitos vetores de doenças infecciosas, juntamente com resistência a inseticidas observada em alguns casos, têm sido associadas ao surgimento de episódios epidêmicos (BESERRA et al., 2007; BRAGA et al., 2004; MEDRONHO, 2008). Sabe-se que a resistência a inseticidas ocorre em função de uma atividade metabólica mais intensa, em que o metabolismo de insetos-resistentes é capaz de metabolizar mais eficientemente o inseticida do que insetos-susceptíveis (LIU, 2015).

[036] Nesse contexto, uma importante via metabólica no *Ae. aegypti* é kinurenina, que é a maior via de catabolismo de triptofano e desintoxicação (remoção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio).

[037] O triptofano, por sua vez, pode ser oxidado a ácido quinolínico, ácido kinurênico ou ácido xanturênico, dependendo do organismo em questão (CHEN; GUILLEMIN, 2009; HAN; BEERNTSEN; LI, 2007; LI, 1999; LI; LI, 1997; STONE, 2000, 2001; STONE; DARLINGTON, 2002).

[038] No caso de mosquitos do gênero *Anopheles*, o ácido xanturênico é essencial para reprodução sexual do *Plasmodium falciparum* (GARCIA et al., 1998; HAN; BEERNTSEN; LI, 2007).

[039] Consequências ambientais desfavoráveis devido à utilização de agentes químicos para controle de insetos têm encorajado a exploração de novas alternativas toxicologicamente mais seguras, por exemplo, larvicidas ecologicamente “amigáveis” (PANDIYAN; MATHEW; MUNUSAMY, 2019). Esses devem ser mais eficientes no controle de insetos, sem danos na população não-alvo, e facilmente degradável (REDWANE et al., 2002).

[040] Os inseticidas que conseguem atuar no estágio larval de desenvolvido do mosquito (portanto, atuando como larvicida) têm recebido mais atenção, uma vez que

esses previnem a emergência das formas adultas (FARNESI; VALLE, 2013; FAUCON et al., 2015).

[041] No entanto, alguns casos de larvas resistentes a inseticidas do tipo piretroides têm sido reportados (SMITH; KASAI; SCOTT, 2016).

(Bio)inseticidas de Origem Natural

[042] Diferentes organismos, tais como plantas e bactérias têm sido usadas para o desenvolvimento de novos produtos. Embora, poucos componentes e formulações de origem biológica estejam comercialmente disponíveis no mundo (CETIN; ERLER; YANIKOGLU, 2004). A atividade larvicida de compostos fitoquímicos tem sido reportada em derivados, tais como espinosina, pipiahina, acetato de leptostachiol, furanos diterpenoides, 17- β -lactona, ácido 7- β -diidroxivouacapan-17- β -óico, rotenona, tetranortriterpenoides, dentre outros (NDUNG'U et al., 2004; YENESEW et al., 2006). Adicionalmente, outros compostos naturais e extratos de espécies vegetais têm exibido interessantes resultados frente a larvas de *Ae. aegypti*, tais como óleos essenciais de *Citrus aurantifolia* (Rutaceae) (SARMA et al., 2019), um derivado isoquinolínico extraído do fungo *Fusarium moniliforme* (PRADEEP et al., 2015), mistura de óleos essenciais (BORRERO-LANDAZABAL; DUQUE; MENDEZ-SANCHEZ, 2020), compostos fitoquímicos extraídos da alga vermelha *Halymenia palmata* (DEEPAK et al., 2019), derivados 12,13-epoxitricotec-9-enos (GROVE; MORTIMER, 1969), extrato etanólico de *Tabernaemontana cymosa* (Apocynaceae), cujo apresentou valores de LC₅₀, LC₉₀ e LC_{99,9} de 37,58; 78,61 e 143,51 ppm, respectivamente, após 12 horas (RODRÍGUEZ-CAVALLO et al., 2019).

[043] A avaliação larvicida de 53 óleos essenciais e suas combinações também tem sido reportada em larvas de *Ae. albopictus* (SHENG et al., 2020). Em adição, monoterpenos e seus derivados têm demonstrado atividade contra larvas de *Ae. aegypti*, sendo o *R*-Limoneno o melhor composto natural, com uma CL₅₀ de 27 ppm e 95%IC de 23-31 (SANTOS et al., 2011).

[044] A toxicidade dos compostos *ar*-curcumeno e *epi*- β -bisabolol extraídos do óleo essencial de *Hedychium larsenii* (Zingiberaceae) tem sido reportada sobre larvas de *A. stephensi*, *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*.

[045] Foi verificado que o extrato de folhas dessa espécie vegetal exibiu moderada atividade larvicida, com valores de LC_{50} de 82,02; 88,6 e 96,4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Paralelamente, o *ar-curcumeno* exibiu uma CL_{50} de 10,45; 11,24 e 12,24 $\mu\text{g/mL}$ e o *epi- β -bisabolol*, 14,68; 15,83 e 17,27 $\mu\text{g/mL}$, frente às espécies *A. stephensi*, *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, respectivamente (ALSHEBLY et al., 2017).

[046] O bioinseticida spinosad (derivado da fermentação do *Saccharopolyspora spinosa*) produz mosquitos adultos *Ae. aegypti* com danos no intestino e com fertilidade reduzida (FERNANDES et al., 2019; MARCOMBE et al., 2018; MARINA et al., 2018).

[047] Esta substância afeta o sistema nervoso da larva, agindo como um antagonista de acetilcolina (ACh) e ácido γ -aminobutírico (GABA) em receptores nicotínicos (HERTLEIN et al., 2010). Ainda, concentrações subletais de spinosad diminui a mobilidade de larvas e pupas de *Ae. aegypti* (TOMÉ et al., 2014).

[048] A esquamicina atua sobre as papilas anais de larvas *Ae. aegypti*, reduzindo os níveis primários de aquaporina-4 (AQP4) e H^+ -ATPase tipo-V, sugerindo que este composto fitoquímico provavelmente interfere na osmorregulação e íon-regulação da larva, conduzindo-o à morte (CHASIOTIS et al., 2016; COSTA et al., 2018; KUMAR; WARIKOO; WAHAB, 2010).

[049] Recentemente, abordagens mais tecnológicas têm sido empregadas no desenvolvimento de bioinseticidas, como no caso de nanosuspensões contendo quercetina (PESSOA et al., 2018) e nanopartículas de prata contendo extrato de folhas de *Ricinus communis* (Castor) (Euphorbiaceae) para combater larvas de *Ae. aegypti* dos 2º e 3º instares, em que tais nanopartículas apresentaram valores de LC_{50} de 231,83 e 455,96 ppm, com X^2 de 5,84 e 0,17, respectivamente (WARIS et al., 2020).

[050] Nanopartículas verdes são consideradas menos tóxicas do que compostos fitoquímicos isolados (BILAL; HASSAN, 2012), e são larvicidas mais eficientes devido seu tamanho pequeno (1-100 nm) e maior área superficial, fazendo com que esses sejam efetivas em baixas concentrações (BORASE; D PATIL, 2013).

Inseticidas de Origem Sintética

[051] A maioria dos inseticidas disponíveis no mercado é de origem sintética, pertencente a uma das quatro classes de compostos químicos, tais como: piretroides (p. ex. deltametrina, cipermetina e ciflutrina), carbamatos (p. ex. propoxur), organofosforados (p. ex. malation, paration e temefós) e organoclorados (p.ex. DDT, BHC e HHC), cujo são amplamente empregados como inseticidas contra mosquitos da espécie *Ae. aegypti* (ELLIOTT; JANES, 1978; FAUCON et al., 2015; FUKUTO, 1990; GRISALES et al., 2013; MAESTRE-SERRANO et al., 2014).

[052] No entanto, alguns estudos têm demonstrado que mosquitos podem desenvolver diferentes graus de resistência contra estes compostos (DEMING et al., 2016; VONTAS et al., 2012). Além disso, tais inseticidas estão associados à poluição ambiental, causando danos a organismos aquáticos que não são alvos dos agentes químicos (MOHANKUMAR; SHIVANNA; ACHUTTAN, 2016; PATEL; GUPTA; OSWAL, 2012; SUMITHA; THOPPIL, 2016).

[053] Outras técnicas como, por exemplo, armadilhas e reguladores do crescimento do inseto, podem controlar somente o estágio adulto de mosquitos, porém não são capazes de controlar os vetores em seu estágio larval (BENELLI, 2015a, 2015b; SUMITHA; THOPPIL, 2016).

[054] Ainda com relação à resistência a inseticidas, a aplicação de temefós e malation pode gerar larvas e insetos adultos mais resistentes em regiões tropicais e subtropicais do mundo (BRAGA et al., 2004; POLSON et al., 2011).

[055] Muitos agentes químicos que estão disponíveis para o controle dos mosquitos não são seletivos e, ainda, podem gerar mais malefícios do que benefícios. Em adição, muitas espécies de mosquitos podem desenvolver pelo menos resistência parcial a estes agentes (MEHLHORN; SCHMAHL; SCHMIDT, 2005).

[056] Um dos larvicidas mais empregados para combater mosquitos da espécie *Ae. aegypti* é o temefós (BRAGA; VALLE, 2007). Embora bastante efetivo, este organofosforado está relacionado a cepas resistentes de mosquitos. Há 20 anos, este tipo de resistência foi observado em mosquitos *Ae. aegypti* no Rio de Janeiro (LIMA et al., 2003). Ainda, a resistência ao temefós foi reportada por pesquisadores na Índia (TIKAR et al., 2009).

[057] Em contraste, a resistência de mosquitos *Ae. aegypti* a piretroides está associada à alta atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) (APONTE et al., 2019; LIU, 2015) e mutações do tipo Val1016Ile e Phe1534Cys (AGUIRRE-OBANDO; MARTINS; NAVARRO-SILVA, 2017; ALVAREZ et al., 2015; APONTE et al., 2019; BRENGUES et al., 2003; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2018).

[058] De modo geral, inseticidas organofosforados têm sido cada vez menos recomendados, devido características tais como forte odor, efeitos corrosivos e por possivelmente estarem associados com câncer em humanos (BONNER et al., 2010; DUSFOUR et al., 2011; SRITHARAN et al., 2017).

[059] Na literatura, a obtenção de diversos compostos sintéticos e semissintéticos é descrita e suas correspondentes atividades frente a larvas do gênero *Aedes* e outros gêneros de interesse biológico. Nesse contexto, compostos nitrilados têm exibido notórias atividades e são frequentemente sugeridos como promissores para serem utilizados com agentes larvicidas.

[060] Em um estudo realizado por Carreño Otero et al., uma série de α -aminonitrilas foi planejada a partir da estrutura do alcaloide girsensohnina, onde os análogos obtidos foram avaliados frente a larvas de *Ae. aegypti*.

[061] O derivado mais promissor apresentou uma CL_{50} de 88.1 ppm, com X^2 de 0.58, após 24 horas. Ainda, tal derivado apresentou uma CI_{50} de 45 μ M frente à acetilcolinesterase (AChE) (CARREÑO OTERO et al., 2014). Rueda et al. realizaram um estudo envolvendo essa classe de nitrilas frente a larvas de *Ae. aegypti*. Os autores encontraram que uma α -aminonitrila apresentou uma LC_{50} de 50,55 ppm (95%IC= 48,13-52,98) e LC_{90} de 86,39 ppm (95%IC= 79,02-97,77), com X^2 de 3,77 e inclinação de $8,82 \pm 0,82$, após 24 horas. Ainda, verificou-se que tal molécula apresenta 100% de mortalidade após 2 horas, à concentração de 30 ppm, em ensaios adulticidas. Por fim, constatou-se que esta se liga com pouca eficiência à AChE, exibindo uma CI_{50} de 148,8 μ M, em ensaios enzimáticos (RUEDA et al., 2018).

[062] Uma revisão da literatura tem descrito o emprego da reação de Strecker para obtenção de α -aminonitrilas, bem como, discute a química e propriedades biológicas desta classe de compostos (KOUZNETSOV; GALVIS, 2018).

[063] Ademais, a utilização de complexos de carbenos contendo Prata(I)-*N*-heterociclos funcionalizados com nitrilas têm demonstrado significativa atividade frente a larvas de *Ae. albopictus*, tendo, o melhor composto, uma CL₅₀ de 11,68 ppm (95%IC= 9,92-13,75), CL₉₀ de 27,73 ppm (95%IC= 22,82-33,7) e inclinação de $2,54 \pm 0,22$.

[064] Estudos relacionados ao desenvolvimento de 1,2,4-oxadiazóis ativos frente à 3-hidroxicinurenina transaminase (3-HKT) do *Ae. aegypti*, bem como, contra larvas desse têm sido desenvolvidos. O melhor composto do estudo exibiu uma CL₅₀ de 10.6 µM em ensaio larvicida, após 24 horas. Ainda, este exibiu uma Cl₅₀ de 110 µM frente à enzima 3-HKT (MACIEL et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2013). Para tais compostos, ainda o mecanismo de ação não está totalmente elucidado, mas algumas evidências experimentais mostram que essa classe de substâncias realmente pode atuar sobre a via kinurenina, causando a morte da larva por apoptose de células neuronais (HAN; BEERNTSEN; LI, 2007; LI; LI, 1997; RIVERO, 2006; STONE, 2000, 2001; STONE; DARLINGTON, 2002). Oliveira et al. também desenvolveram um estudo com essa classe de compostos frente à 3-HKT de *Ae. aegypti*, em que se verificou que os resíduos de aminoácidos relacionados à atividade dos compostos são Gly²⁵, Ser⁴³ e Arg³⁵⁶ (OLIVEIRA et al., 2013).

[065] Em adição, análogos estruturais desses compostos, os isoxazóis, também têm sido descritos como larvicidas contra *Ae. aegypti*, em que o melhor composto apresentou uma CL₅₀ de $3,4 \pm 0,1$ ppm, com 95%IC igual a 3,2-3,6 (SILVA-ALVES et al., 2013).

[066] Eng et al. desenvolveram um estudo envolvendo análogos 2-(*p*-clorofenil)-3-metilbutiratos da trioganotina e avaliou a atividade larvicida desses em larvas do 2º instar das espécies *A. stephensi*, *Ae. aegypti* e *C. pipiens quinquefasciatus*.

[067] Dessa forma, verificou-se que após 24 horas o derivado *n*-butil substituído apresentou CL₅₀ de $0,31 \pm 0,01$; $0,32 \pm 0,01$; e $0,39 \pm 0,03$ uM, respectivamente (ENG et al., 2007).

[068] Uma série de ésteres derivados do ácido 4-mercapto-2-butenóico foi sintetizada e avaliada frente a larvas de *Ae. aegypti*. Assim, verificou-se que o melhor composto apresentou uma CL₅₀ de 13,27 ppm, com 95%IC de 11,74-14,99, após 24 horas. Ainda, este apresentou uma potência relativa de 0,136 (PEZZI et al., 2019).

[069] Silva et al. sintetizaram e avaliaram tiossemicarbazonas como potenciais agentes larvicidas contra *Ae. aegypti*. O melhor análogo apresentou uma CL₅₀ de 5,8 ppm, após 24 horas. Adicionalmente, métodos *in silico* verificaram que esse interage com o resíduo Phe105 da proteína-2 carreadora de esterol (AeSCP-2) (SILVA et al., 2015).

[070] Hansch & Verma estudaram os efeitos tóxicos de organotinas contra larvas de *Ae. aegypti* e *A. stephensi* em modelos de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR). Assim, as variáveis hidrofóbicas (π) e eletrônicas de Hammett (σ) foram identificadas como sendo aquelas que melhor se correlacionam com a toxicidade observada para tais compostos, em ambas as espécies de mosquitos (HANSCH; VERMA, 2009).

[071] Alternativas tecnológicas têm sido desenvolvidas, tais como a síntese de clorina-e6 em nanopartículas de γ -Fe₂O₃, visando à atividade larvicida contra *Ae. aegypti*. Estas demonstraram uma taxa 100% de mortalidade após 1,4 horas, à concentração de 100 mg/L. Ademias tais nanopartículas apresentaram ecotoxicidade ambiental reduzida (MAGRO et al., 2019).

[072] Por outro lado, a quitosana extraída de cascas de camarões, utilizada em nanopartículas obtidas por tripolifosfato de sódio, apresentou atividade larvicida contra larvas de *Ae. aegypti* do 3º instar, com valores de LC₅₀ e LC₉₀ de 66,42 e 92,58 mg/L, respectivamente, após 24 horas (ANAND et al., 2018).

O Composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353)

[073] O composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) tem sido reportado em diferentes trabalhos na literatura, podendo ser obtido por diferentes métodos de síntese orgânica.

[074] Em 1961, o (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) foi obtido como produto da condensação de Knoevenagel utilizando-se o 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxibenzaldeído e cianoacetato de etila, na presença de uma mistura de piridina com piperidina (catalisador), à temperatura de 100 °C (MÜLLER et al., 1961). Em contraste, o (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) também poderia ser obtido, com rendimentos variando entre 17 e 46%, por reação entre o 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxibenzaldeído e cianoacetato de etila, na presença de etanol e piridina (catalisador), em temperaturas entre 50 e 60 °C, durante 4 horas (KATSUMI et al., 1986).

[075] Em 1986, o (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) foi descrito como produto sintético proveniente de duas reações diferentes, podendo ser originado a partir de uma reação entre o 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxibenzaldeído com um trifenilfosforano, em dimetilsulfóxido, à temperatura de 80 °C, durante 40 horas; obtendo-se o compostos nitirlado por um mecanismo via Olefinação de Wittig.

[076] Em 1993, uma patente japonesa da *Sumitomo Electric Industries* descreveu outro método para obtenção do (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**), em que 0,05 mol de cianoacetato de etila foi dissolvidos em 500 mL de etanol absoluto. Então, a solução foi aquecida até 50 °C sob agitação e, em seguida, piperidina (catalisador) foi adicionada gota-a-gota. Após 3 horas, o solvente foi removido e o sólido resultante foi purificado por cromatografia, utilizando diclorometano como eluente (TAKAGI et al., 1993).

[077] No que diz respeito as propriedades que o (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) apresenta, esse tem sido associado a estudos químicos voltados para o desenvolvimento de compostos e/ou materiais contendo propriedades: ópticas não-lineares (JIPA et al., 2002; MATSUOKA et al., 1992; TAKAGI et al., 1992), desacoplantes envolvendo mitocôndrias (EBATO et al., 1993; MIYOSHI et al., 1993; MIYOSHI; FUJITA, 1988; MIYOSHI; NISHIOKA; FUJITA, 1987), anti-inflamatórias (KATSUMI et al., 1986), estudos de distribuição de spins por ressonância magnética nuclear - RMN (ESPERSEN; KREILICK, 1969) e alterações em espectros de absorção de ultravioleta de merocianinas (LAUERER et al., 1957).

[078] Adicionalmente, algumas patentes também descrevem a aplicação do (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) no desenvolvimento de novos materiais: quimioluminescentes (TAKAGI et al., 1993), fotorreceptores eletrofotográficos de carga positiva (SUZUKI, 2000) e estabilizantes para redução da deterioração de plásticos (KNAPP; WORREL, 1966).

[079] Ainda, algumas patentes destinam-se ao desenvolvimento de inibidores da agregação plaquetária (KATSUMI et al., 1983), tratamento da obesidade (HANSEN et al., 2004) e/ou prevenção do diabetes (GOJO-ZORRILLA; GOJON-ROMANILLOS, 2016).

[080] Por fim, não há nenhuma patente ou artigo científico (nacional ou internacional) que descreva a utilização do (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) como agente larvicida frente ao *Ae. aegypti* ou qualquer outra espécie de artrópode.

DESCRIÇÃO DA ABORDAGEM DO PROBLEMA TÉCNICO

Quadro 01: Comparação entre os problemas encontrados no estado da técnica e as soluções da patente pretendida.

Problema	Solução
As metodologias de obtenção do (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) descritas na literatura necessitam de mais de uma etapa de purificação, incluindo cromatografia em coluna	O (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) é obtido de modo eficiente, sem necessidade de etapas complexas de purificação.
A maioria dos inseticidas sintéticos pertence a uma das quatro classes químicas (organofosforado, organoclorados, piretroides ou carbamatos). Entretanto, mosquitos <i>Ae. aegypti</i> apresentam resistência a estes.	O (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) apresenta maior solubilidade em água do que o inseticida sintético organofosforado temefós.
A maioria dos inseticidas sintéticos possui baixa solubilidade em água.	O (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) apresenta melhor solubilidade em água do que o inseticida sintético organofosforado temefós.
A grande maioria dos inseticidas disponíveis no mercado possui odor forte, o que limita seu uso.	O (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) é completamente inodoro.

Mosquitos <i>Ae. aegypti</i> representam o principal vetor das doenças causadas por DENV, CHIKV e ZIKV.	O (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) é capaz de reduzir a população de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> , uma vez que atua em larvas do 4º instar desses.
Mosquitos <i>Ae. aegypti</i> desenvolvem seu ciclo biológico em reservatórios contendo água parada.	O (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato pode ser adicionado na água parada, matando as larvas do 4º instar do mosquito <i>Ae. aegypti</i> .
Larvas do 4º instar de <i>Ae. aegypti</i> são mais resistentes à ação de larvicidas/inseticidas.	O (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) apresenta eficiente ação larvicida frente a larvas do 4º instar de mosquitos da espécie <i>Ae. aegypti</i> .
A pupa de <i>Aedes aegypti</i> é resistente à ação de larvicidas/inseticidas.	O (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) é capaz também de matar pulpas de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .
Desenvolvimento de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> resistentes.	O (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) não induz o surgimento de cepas de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> resistentes, uma vez que este mata efetivamente as larvas do 4º instar dos mosquitos.
Larvas de <i>Aedes aegypti</i> resistentes a larvicidas se tornam mosquitos adultos resistentes.	O (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) possui atividade larvicida efetiva, não permitindo o progresso do ciclo biológico. Assim, não surgem mosquitos <i>Ae. aegypti</i> resistentes.

A glutathione S-transferase (GST) é a principal enzima do <i>Ae. aegypti</i> responsável por sua resistência à ação de inseticidas.	O (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>tert</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) provavelmente atua por meio de inibição da GST, resultados visualizados por métodos <i>in silico</i> .
---	--

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Quadro 02: Descrições das figuras relacionadas a este pedido de patente.

Figura	Descrição
Figura 1	Rota sintética utilizada para obtenção do (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>tert</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353). No esquema mostrado, composto (1) : 3,5-di- <i>tert</i> -butil-4-hidroxibenzaldeído; composto (2) : cianoacetato de etila; Et ₃ N: trietilamina; EtOH: etanol; 24 h: 24 horas.
Figura 2	Espectro de RMN de ¹ H para o (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>tert</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353), mostrando todos os sinais presentes na amostra, com seus respectivos valores de deslocamento químico. As constantes de acoplamento (<i>J</i>) também estão mostradas.
Figura 3	Espectro de RMN de ¹³ C para o (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>tert</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353), mostrando todos os sinais presentes na amostra, com seus respectivos valores de deslocamento químico.
Figura 4	São zonas de ampliações em dois sinais do espectro de RMN de ¹ H para o (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>tert</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353). Em (A), sinal do tripleto referente à metila (CH ₃) pertencente ao éster etílico ampliado, mostrando a multiplicidade do sinal e sua respectiva constante de acoplamento (<i>J</i>) de 7,13 Hz. Em (B), sinal do quarteto referente ao metileno (CH ₂) pertencente ao éster etílico ampliado, mostrando a multiplicidade do sinal e sua respectiva constante de acoplamento (<i>J</i>) de 7,13 Hz.

Figura 5	Determinação da Concentração Letal (CL) para o organismo vivo por aplicação do modelo matemático logaritmo linear. Em (A), (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353). Em (B), o temefós (controle positivo).
Figura 6	Imagens obtidas por microscopia óptica, comparando-se as larvas do 4º instar submetidas ao composto teste ((<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353)) e ao composto usado como grupo controle positivo (temefós). Legenda: Larva do grupo controle negativo (A); grupo de larvas expostas ao temefós mostrando encurtamento, curvamento e escurecimento do intestino (B); grupo de larvas expostas ao (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353), apresentando curvamento e escurecimento do intestino (C); Grupo de larvas expostas ao (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) em estado de transição (pupal) (D – F).
Figura 7	Interações do (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) com a enzima glutathione S-transferase épsilon-2 (GSTe2). Os resíduos inerentes da enzima estão mostrados em verde. O (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) está mostrado em cinza. Os átomos de oxigênio e nitrogênio estão mostrados em vermelho e azul, respectivamente.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

Síntese do (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**)

Reagentes, Solventes e Procedimentos

[081] Todos os reagentes iniciais e solventes foram adquiridos comercialmente por meio da companhia *Merck/Sigma-Aldrich*® (St. Louis, Missouri, EUA), como sendo produtos com alto grau de pureza (>98%). Igualmente, os solventes usados nas etapas de síntese do (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) e na determinação

do grau de pureza por Cromatografia Líquida de Alta-Eficiência (CLAE) foram adquiridos comercialmente na *Tedia® High Purity Solvents Company* (Fairfield, Ohio, EUA).

[082] Os procedimentos reacionais para obtenção do (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) foram realizados via adaptação da reação de Knoevenagel. No entanto, fazendo-se várias otimizações das metodologias descritas em trabalhos prévios (MÜLLER et al., 1961; KATSUMI et al., 1986; TAKAGI et al., 1993; LUO; VASUDEVAN; LESCAR, 2015). Inicialmente, 0,06 mL de cianoacetato de etila (**1**) (1 eq.) foram adicionados a um balão de fundo redondo, contendo 5 mL de etanol. Em seguida, 0,059 mL de trietilamina (Et₃N) (1 eq.) foram adicionados à solução, gota-a-gota. A mistura reacional permaneceu sob aquecimento (70 °C) e agitação durante 2 horas. Posteriormente, 0,1 g de 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxibenzaldeído (**2**) (0,5 eq.) foram adicionados à mistura. Após 24 horas a 70 °C e sob agitação, o solvente foi rotaevaporado e o sólido resultante foi solubilizado em clorofórmio puro para análise (P.A.). Em seguida, uma extração líquido-líquido foi realizada, utilizando-se 3 x 25 mL de uma solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi coletada e filtrada em sulfato de sódio anidro aquecido (80 °C). Por fim, a solução resultante foi rotaevaporada, rendendo o composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) puro.

Caracterização Estrutural do Composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353**)**

Cromatografia Líquida de Alta-Eficiência (CLAE)

[083] Para determinação do grau de pureza (%) e o tempo de retenção (R_T) do (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) foi utilizado um cromatógrafo *Shimadzu®*, modelo *SIL-20AHT*, utilizando uma coluna *Luna®* 5 µm C18(2) 100 Å, com dimensões de 250 x 4.6 mm, e comprimento de onda (λ) de 254 nm. Para a corrida, metanol grau HPLC (≥99%) foi utilizado como fase móvel.

[084] Adicionalmente, os parâmetros de análise foram configurados como sendo (a) concentração da amostra igual a 1 mg/mL; (b) fluxo de 1 mL/min; (c) tempo de corrida igual a 15 min; e (d) volume de injeção igual a 5 µL. Por fim, o R_T foi computado em minutos (min) e a intensidade do sinal no cromatograma, em miliunidades de absorbância (mAU) (DE BRITO et al., 2017).

Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e Carbono Treze (RMN ¹³C)

[085] Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram obtidos utilizando um equipamento *Bruker*[®], modelo *UltraShield 600 MHz*. Adicionalmente, clorofórmio deuterado (CDCl₃) foi utilizado como solvente analítico. No total, foram admitidos números de pulsos iguais a 16 e 1024, para os núcleos hidrogênio e carbono, respectivamente. Todos os deslocamentos químicos (δ) foram computados em parte por milhão (ppm). As constantes de acoplamento (*J*) foram determinadas em Hertz (Hz). Além disso, as multiplicidades dos sinais foram atribuídas com sendo: simpleto (*s*), simpleto de base larga (*br s*), tripleto (*t*) e quarteto (*q*) (JACOBSEN, 2017; SILVA-JÚNIOR et al., 2016). Finalmente, os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram tratados e analisados utilizando o software *Bruker TopSpin*[®], versão 4.0.7, 2019.

Determinação da Atividade Larvicida do (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) Frente a Larvas do 4º Instar de Mosquitos *Aedes aegypti*

[086] O ensaio larvicida *in vitro* constituiu-se de duas análises (qualitativa e quantitativa), em que foram utilizadas larvas jovens do 4º instar de mosquitos de espécie *Ae. aegypti* obtidas no insetário do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. Inicialmente, os ovos foram eclodidos em água isenta de cloro, contendo ração de gato (*Beauty Pet*[®]), sob uma temperatura e umidade correspondente a 28 ± 2 °C e $80 \pm 4\%$, respectivamente, em fotoperíodo de 12 horas. Após 72 horas de eclosão, foram selecionadas as larvas do 4º instar seguindo o método estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005) com algumas adaptações (BARROS et al., 2015; FUJIWARA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2009).

[087] Para os ensaios larvicidas propriamente ditos, uma solução estoque (200 µg/mL) foi preparada solubilizando 0,02 g do (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,33% (v/v), seguida da adição de água destilada (20 mL).

[088] Os ensaios *in vitro* foram realizados em triplicata, em que foram utilizadas 20 larvas do 4º instar em copos descartáveis com a solução do composto (E)-Etil-2-ciano-

3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) (20 mL), em concentrações variando de 5 µg/mL a 100 µg/mL (Tabela 1).

[089] Como controle positivo e negativo utilizou-se o inseticida sintético organofosforado temefós à concentração de 5 µg/mL em 0,33% de DMSO (v/v) e uma solução aquosa de DMSO a 0,33% (v/v), respectivamente. Para a análise qualitativa foi realizada uma varredura empregando três concentrações (100, 50 e 5 µg/mL) (Tabela 1), com a finalidade de verificar a faixa de ação biológica do (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**). A partir da solução estoque do (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) (200 µg/mL) foi retirada uma alíquota equivalente a cada concentração calculada pela fórmula da diluição da concentração, seguida da adição de água destilada até completar o volume desejado (20 mL) para cada réplica (Tabela 1) (SKOOG e HOLLER, 2006).

Tabela 1: Balanço de concentração do composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) em função de sua solução estoque (200 µg/mL).

[] (µg/mL)	A (mL)	Volume (mL)
100,0	10,0	10,0
50,0	5,0	15,0
20,0	2,0	18,0
10,0	1,0	19,0
5,0	0,5	19,5

Legenda: [] = Concentração; A = Alíquota coletada a partir da solução estoque do analito, (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**); V = Volume de água destilada suficiente para completar o volume total de 20 mL.

[090] O percentual de mortalidade larval foi computado em 24 e 48 horas, quando não mais se observou movimentação das larvas. Entretanto, o grau de atividade foi considerado após 48 horas, seguindo os critérios pré-estabelecidos, conforme mostrado na Tabela 2 (FERREIRA-JÚNIOR, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION., 2005).

Tabela 2: Critérios para determinação do grau de atividade do (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**)

% de Mortalidade (%M)	Atividade
%M > 75	Promissor
75 < %M > 50	Moderado
50 < %M > 25	Fracamente promissor
%M < 25	Inativo

[091] A análise quantitativa do ensaio larvicida que corresponde ao cálculo das concentrações letais (CL) para o organismo vivo foi realizada a partir de cinco concentrações (Tabela 1). O percentual de mortalidade (%M) foi computado após 48 horas de exposição e, posteriormente, foram realizados os cálculos para determinação das CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₀, bem como seus intervalos de confiança de 95% (95%IC) e grau de validação (X^2), aplicando uma regressão não-linear fornecida pelo método *Probit* e com aplicação do logaritmo linear como modelo matemático, realizados por meio do software R® (FINNEY, 1972; BENZEKRY et al., 2014; BURRILL et al., 1999; CARVALHO et al., 2017).

[092] Para o estudo da morfologia das larvas submetidas ao controle positivo e ao (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**), a microscopia óptica foi empregada utilizando-se comparações entre as observações verificadas nos grupos controle e tratado. Assim, para estudo estrutural morfológico foi utilizado um microscópio stereo binocular com rácio de zoom de 1:7 (ampliação de 0,65x a 4,5x) (FUJIWARA et al., 2017).

Estudo *in silico* do (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353**) Frente a Alvos Biológicos do *Aedes aegypti***

Detalhes Computacionais

[093] Todos os experimentos *in silico* envolvendo docking molecular foram realizados em um notebook Dell®, modelo 5500U, contendo um processador Intel® Core™ i-7 4ª

geração, CPU de 2,4 GHz, memória RAM de 16 GB, rodando em plataforma *Windows*® 8.1.

Procedimentos de docking molecular

[094] Inicialmente, o composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) foi desenhado, convertido em estrutura tridimensional e minimizado energeticamente utilizando-se o método semi-empírico *Austin Model 1* (AM1) no software *ArgusLab*®, versão 4.0.1 (<http://www.arguslab.com>) (THOMPSON, 2004). As enzimas kinurenina aminotransferase, 3-hidroxikinurenina transaminase, proteína ligante-odorizante 1, proteína ligante-odorizante 22, piruvato quinase 1, arilalquilamina *N*-acetiltransferase 5b, proteína carreadora de sterol 2 e glutatona *S*-transferase épsilon-2 foram investigadas.

[095] Estas foram obtidas como estruturas tridimensionais, no formato *.pdb*, por meio do website do *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank - RCSB PDB* (<https://www.rcsb.org>), sob os códigos: 1YIZ, 6MFB, 3K1E, 2P2E, 6DUD, 5YAG, 2NBM e 5FT3, respectivamente.

[096] Estas enzimas foram pré-tratadas e as simulações de docking molecular propriamente ditas foram executadas utilizando o software GOLD®, versão 5.8.1 ([https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery /components/gold/](https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/)) (CAMBRIDGE CRYSTALLOGRAPHIC DATA CENTRE, 2015).

[097] Todos os ligantes, incluindo moléculas de água, cofatores e íons, previamente co-cristalizados nestes alvos foram removidas. Então, os átomos aceptores e doadores de interação de hidrogênio foram admitidos como acessíveis ao solvente. Ainda, as quatro funções de pontuação do GOLD® foram empregadas, sendo elas: *Chemical Piecewise Linear Potential* (CHEMPLP), *GoldScore*, *ChemScore* e *Astex Statistical Potential* (ASP). Além disso, todas as contribuições energéticas e interações (de hidrogênio, hidrofóbicas e van der Waals) foram individualmente analisadas. As ilustrações geradas foram obtidas a partir do software PyMol®, versão 0.99 (<https://pymol.org/2/>).

[098] Por fim, todos os procedimentos realizados neste pedido de patente estão em total concordância com trabalhos envolvendo métodos *in silico* e publicados por nosso grupo de pesquisa (DE M. SILVA et al., 2018; LOZANO UNTIVEROS et al., 2019; MARQUES

et al., 2018; ROQUE MARQUES et al., 2019; SANTANA et al., 2019; SILVA-JUNIOR et al., 2017; SILVA-JÚNIOR et al., 2018).

RESULTADOS OBTIDOS

Síntese e Caracterização Estrutural do Composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**)

[099] O (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) foi obtido de acordo com a reação de Knoevenagel ilustrada na Figura 1, com rendimento de 86,9% (0,122 g), em que se verificou que o produto desejado apresentou um aspecto de pó marrom-amarelado.

[100] O cromatograma revelou que, por meio da metodologia de CLAE usada, o (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) foi obtido com grau de pureza igual a 98,2% e com tempo de retenção (R_T) de 3,41 min. A espectroscopia de RMN de ^1H revelou que o sinal característico que confirma a condensação do aldeído com o cianoacetato de etila, via reação de Knoevenagel, é um simpleto inerente à metina (HC=), cujo é verificado em campo mais baixo, estando em 8,17 ppm. Igualmente, no espectro de RMN de ^{13}C , o carbono desta metina também caracteriza esta condensação, sendo observado seu sinal correspondente em 158,95 ppm. Os espectros de RMN de ^1H (Figura 2) e ^{13}C (Figura 3) foram suficiente para caracterizar inequivocamente o composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**).

[101] Ainda, ampliações no espectro de RMN de ^1H foram realizadas para demonstrar os acoplamentos ($J = 7,13 \text{ Hz}$) entre os sinais da metila (triplete para o CH_3) (Figura 4A) e metileno (quarteto para o CH_2) (Figura 4B) do éster etílico terminal do composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**).

[102] Abaixo são fornecidas as descrições completas dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , respectivamente:

RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,39 (*t*, 3H, CH_3 , $J = 7,13 \text{ Hz}$); 1,48 (*s*, 18H, $(\text{CH}_3)_6$); 4,36 (*q*, 2H, CH_2 , $J = 7,13 \text{ Hz}$); 5,92 (*br s*, 1H, OH); 7,91 (*s*, 2H, CH_{Ar}); 8,17 (*s*, 1H, CH).

RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14,24 (CH_3); 30,08 ($(\text{CH}_3)_6$); 34,62 (CH); 62,28 (CH_2); 98,43 (C_q); 116,51 (CN); 123,45 (C_{Ar}); 129,53 (C_q); 136,88 (C_q); 155,98 (C-OH); 158,95 (HC=); 163,49 (C=O).

Determinação da Atividade Larvícida do (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) Frente a Larvas do 4º Instar de Mosquitos *Aedes aegypti*

[103] A partir do bioensaio larvícida qualitativo envolvendo o composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) foi verificado que esse possui atividade larvícida promissora, na faixa entre 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$; e inativo para 5 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3). A análise preliminar foi realizada com base nos critérios estabelecidos pela OMS, (2005) e Ferreira – Júnior, (2015), como descritos anteriormente. Além disso, nos períodos após 24 e 48 horas verificou-se uma tendência de crescimento na mortalidade, sendo mais eficiente após 48 horas, o que sugere que há uma provável cinética reacional envolvida na ação do composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) frente às larvas do 4º instar. O percentual de mortalidade (%M) foi calculado utilizando-se a fórmula de porcentagem que se dá pelo número de indivíduos da espécie morta em função da quantidade total de organismos vivos expostos à solução teste (DA CRUZ, 2017), ou seja:

$$\%M = \frac{p}{T} \times 100\%, \text{ onde:}$$

p corresponde ao número de larvas mortas e T ao número total de larvas submetidas ao ensaio *in vitro* da referida concentração.

Tabela 3: Resultado preliminar larvícida do composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**).

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	(% de mortalidade)		Grau de Atividade
	24h	48h	
100	90,0	98,3	Promissor
50	85,0	86,7	Promissor
5	11,7	16,7	Inativo

[104] Os dados (valores das CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₀), assim como o intervalo de confiança de 95% (95%IC) e grau de validação (X²) foram determinados (Tabela 4) com base nos resultados preliminares do composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**), conforme Tabela 3. Para fins comparativos, foi realizada também a análise para o controle positivo (Temefós), que ao se observar os resultados fornecidos pelo método Probit (FINNEY, 1972), mediante uma regressão não-linear, verificou-se que o composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) demonstra atividade larvicida, com uma CL₅₀ correspondente a 11,6 µg/mL. Além disso, o composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) teve melhor grau de validação em relação ao temefós, sendo seus dados mais confiáveis, pois o grau de validação (X²) verifica se a mortalidade observada no experimental difere significativamente da hipótese que é esperada (MILLER e MILLER, 2010). Ademais, o composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) tem melhor solubilidade em água, quando comparado ao temefós.

Tabela 4: Análise estatística larvicida do composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) frente a larvas do 4º instar de mosquitos *Aedes aegypti*.

Composto	Larvicida (µg/mL)			95%IC (LCI – LCS)			X ²
	CL ₁₀	CL ₅₀	CL ₉₀	CL ₁₀	CL ₅₀	CL ₉₀	
LQM353	2,9	11,6	47,1	1,7 – 4,1	9,2 – 14,3	35,4 – 71,3	8,2
Temefós	1,8	4,4	10,4	1,3 – 2,3	3,8 – 4,9	8,6 – 13,6	27,1

Legenda: CL = Concentração Letal para o organismo vivo; LCI = Limite de Concentração Inferior; LCS= Limite de Concentração Superior; X² = Grau de validação.

[105] O tratamento dos resultados feito pelo método Probit e modelado a partir do logaritmo linear (modelo matemático) para ambos os compostos, mostrou parâmetros que confirmam a confiabilidade do composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**). Contudo, dentre esses parâmetros, foi visto uma menor inclinação da reta (Figura 5A) em relação ao temefós (Figura 5B) (BENZEKRY et al., 2014), significando que a resposta de mortalidade foi mais rápida em ínfimas concentrações para o temefós em relação ao composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-

butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) (Tabela 5) (CARVALHO et al., 2017). Entretanto, a significância representada pelo valor de p , foi mais eficaz para o composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**), de acordo com parâmetros para validação estatística descritos na literatura (BURRILL et al., 1999; CARVALHO et al., 2017; MILLER e MILLER, 2010; SAMUELS et al., 2012).

[106] Ainda, o composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) apresentou atividade larvica com um valor de CL_{10} (2,9 µg/mL) similar à CL_{10} (2,5 µg/mL) do temefós, e seus resultados são de confiabilidade significativa, observado pelos parâmetros calculados no modelo matemático, a qual mostra que a atividade (representada pela taxa de mortalidade) é diretamente proporcional à concentração, representada na Figura 5, com dispersão de pontos na faixa a qual a estatística permite.

Tabela 5: Análise estatística larvica com aplicação do modelo matemático logaritmo linear.

Composto	Inclinação ± (EP)	CL_{10} (95%IC)	CL_{50} (95%IC)	CL_{90} (95%IC)	p - valor
LQM353	1,5 ± 0,8	2,9(1,9 – 3,7)	11,0(9,6 – 12,4)	43,4(28,8 – 58,0)	0,4
Temefós	8,5 ± 0,3	2,5(2,0 – 3,1)	4,5(4,1 – 4,9)	8,1(6,6 – 9,7)	0,7

Legenda: EP = erro-padrão; 95%IC = Intervalo de confiança com diferença significativa baseados nos intervalos de confiança a 95% de probabilidade (em µg/mL).

[107] Na análise morfológica, as larvas tratadas com o controle negativo (água destilada e 0,33% de DMSO (v/v)) apresentaram cabeça, tórax e abdômen; esse último por sua vez com oito segmentos (Figura 6A). Ao passo que as larvas expostas ao temefós expressaram alterações no intestino, tornando-as mais escuras, curtas e mostrando um curvamento (Figura 6B), bem como as larvas submetidas ao composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**), em que se observou o curvamento e escurecimento do intestino (Figura 6C). Ademais, este composto atuou na morte de larvas em estado de transição (passando de uma fase a outra, estágio pupal → pupicida) (Figura 6D – F). As análises morfológicas foram condizentes com a literatura, a qual Fujiwara et al. (2017), ao realizarem o ensaio da atividade larvica do cinamato de metila, observou características similares a estas observadas nas larvas expostas ao composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**).

Estudo *in silico* do (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) Frente a Alvos Biológicos do *Aedes aegypti*

[108] Após a obtenção das simulações de docking molecular do (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) frente aos alvos do mosquito *Ae. aegypti*, foi verificado que o (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) apresentou resultados mais satisfatórios utilizando-se a função de pontuação *GoldScore* do software GOLD®. Em adição, verificou-se que o (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) possui uma maior afinidade frente à isoforma épsilon-2 da enzima glutathione S-transferase (GSTe2), com um valor de *FitScore* de 54,6. Ao analisar as interações observadas entre o (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) e a GSTe2, verificou-se que apenas há interações hidrofóbicas com os resíduos Ser¹⁰, Leu³⁴, His³⁹, Thr⁵², Val⁵³, Phe¹⁰⁶, Glu¹¹⁴ e Phe¹¹⁸ (Figura 7). Por fim, os dados *in silico* sugerem que o (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) exerce sua atividade larvicida, provavelmente, por inibição da enzima GSTe2 em larvas de mosquito *Ae. aegypti*.

VANTAGENS DA PATENTE

[109] O respectivo pedido de patente refere-se à aplicação do (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) como uma nova alternativa de combate à proliferação de mosquitos da espécie *Ae. aegypti* representa o surgimento de um inseticida sintético, para o qual os mosquitos não apresentam resistência, ao contrário do que é observado com a utilização de inseticidas comerciais piretroides e organofosforados.

[110] Além disso, o (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) é efetivo em matar formas imaturas (larvas do 4º instar e pupas) de mosquitos *Ae. aegypti*, impedindo o progresso do ciclo biológico do mosquito. Assim, espera-se que, futuramente, o número de casos de humanos acometidos por arboviroses diminua significativamente.

Ainda, o (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) tem a vantagem de ser completamente inodoro, o que viabiliza sua utilização, sendo o

contrário do que é observado no caso dos organofosforados utilizados atualmente, cujo apresentam odores fortes.

[111] O (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) apresenta maior solubilidade em água, quando comparado com o organofosforado temefós, cujo é amplamente empregado no combate ao *Ae. aegypti*. Em adição, o (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) é um derivado do ácido cinâmico, os quais estão relacionados à baixa ecotoxicidade frente a outros organismos aquáticos, e à inibição de importantes enzimas no organismo-alvo (CHEN et al., 2018; CUI et al., 2017). Vale ressaltar que o composto o (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) foi ativo nas concentrações de CL50 e CL90, bem como provoca a morte do organismo vivo de forma lenta, sendo mais eficaz no período compreendido entre 24 e 48 horas. Estudos envolvendo microscopia óptica mostraram que o (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) atua não somente na fase larval, mas também no estágio de transição pupal, que é tido como um dos mais resistentes, em que há a modificação de proteínas para o surgimento do artrópode *Ae. aegypti*, sugerindo que esse pode atuar como um pupicida. O (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) potencialmente atua através da inibição da isoforma épsilon-2 da enzima glutathione S-transferase (GSTe2), que é a principal enzima responsável pela resistência à ação dos inseticidas comercialmente utilizados, os quais, em sua grande maioria, atuam sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE). Neste contexto, o (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) representa uma novidade no controle de pragas de importância em saúde pública, uma vez que seria o primeiro inseticida sintético destinado à enzima GSTe2 de mosquitos da espécie *Ae. aegypti*.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso do (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353), **caracterizado por** possuir finalidade inseticida contra formas imaturas da espécie *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).
2. Uso do (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) com finalidade larvicida contra larvas do 4º instar de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** sua ação inseticida contra formas imaturas da espécie *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).
3. Uso do (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) com finalidade pupicida contra pupas de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** sua ação inseticida contra formas imaturas da espécie *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).
4. Uso do (E)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) com finalidade inibitória da isoforma épsilon-2 da enzima glutathione S-transferase (GSTe2) de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** seu uso como inseticida contra formas imaturas da espécie *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

DESENHOS

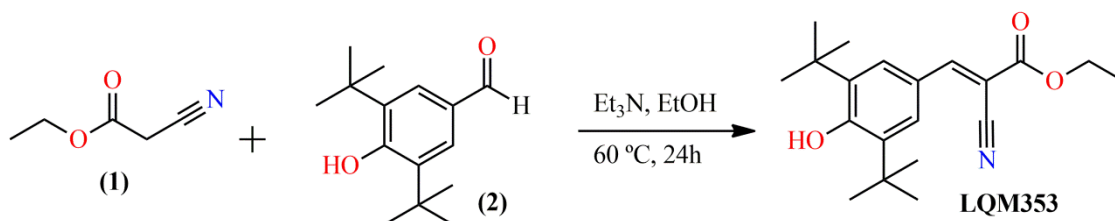


Figura 1

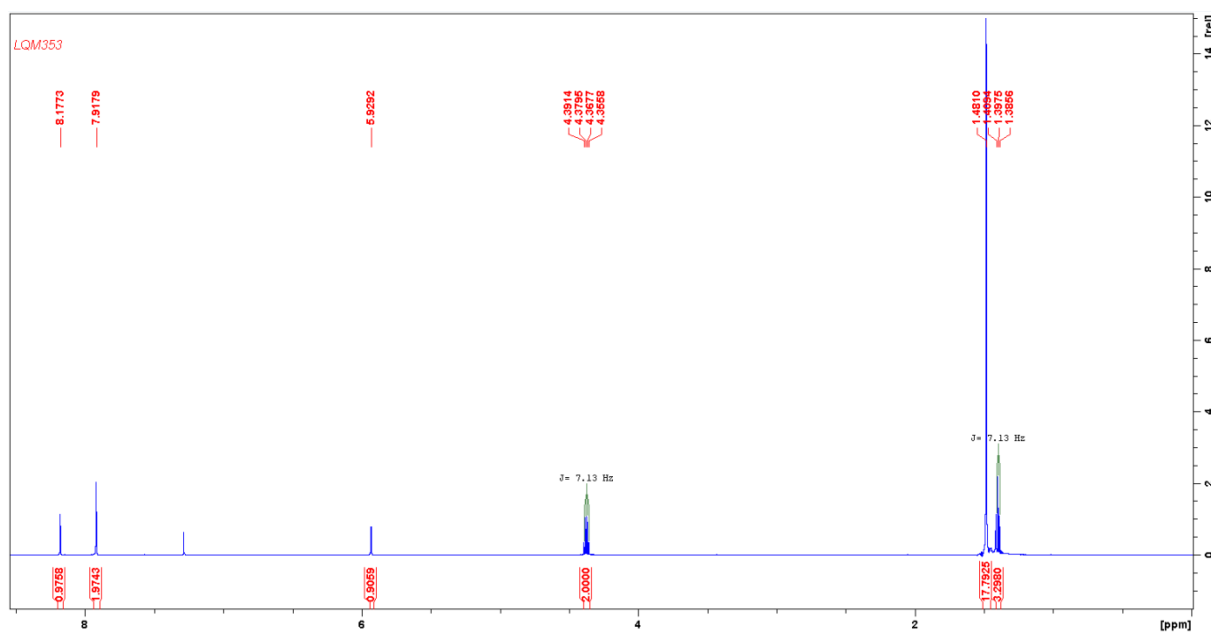


Figura 2

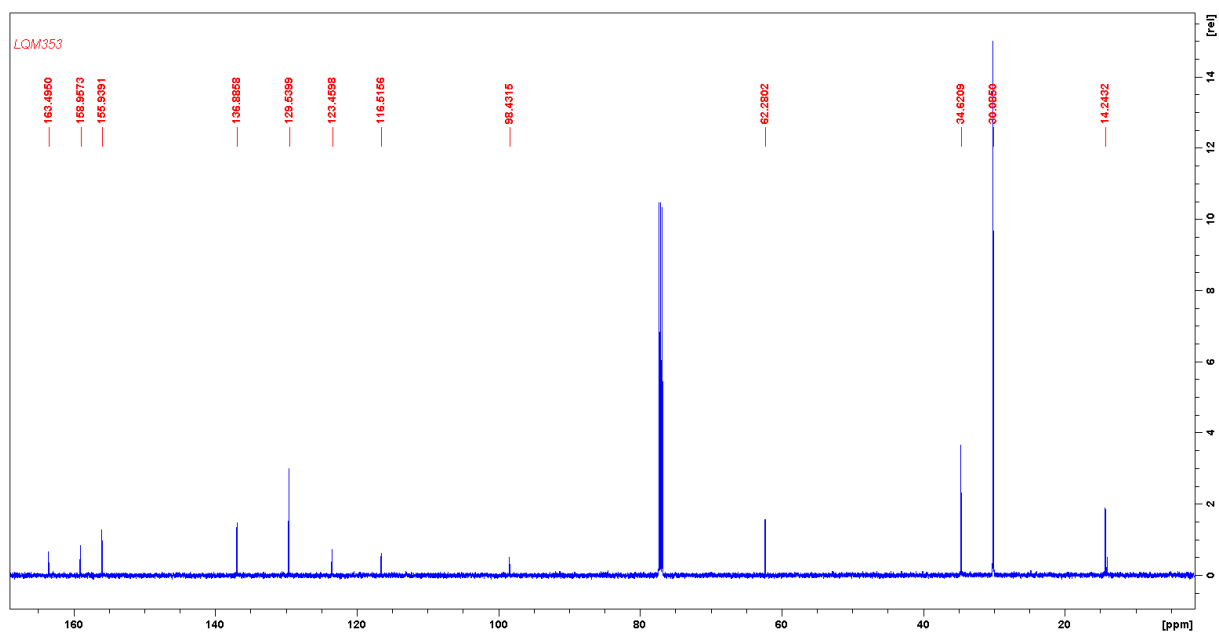


Figura 3

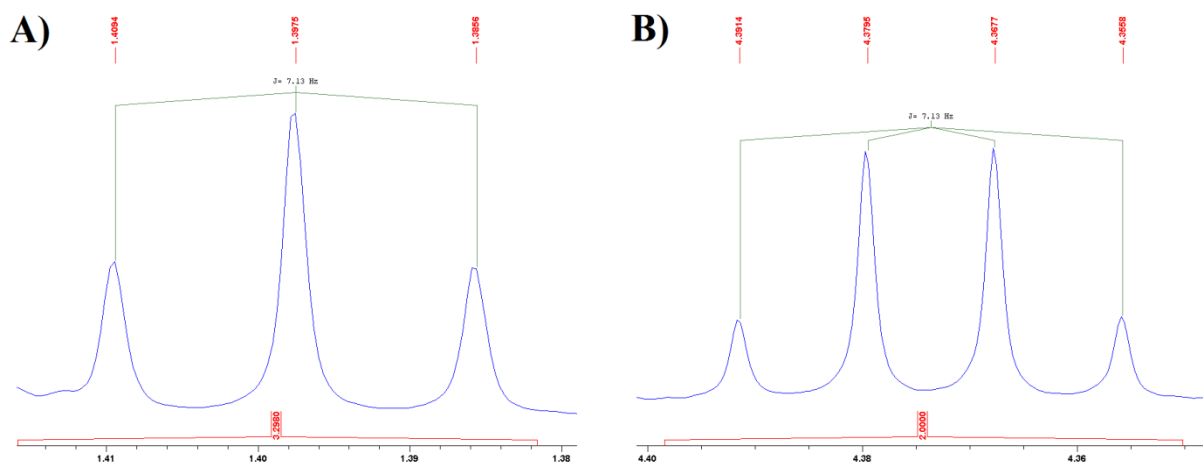


Figura 4

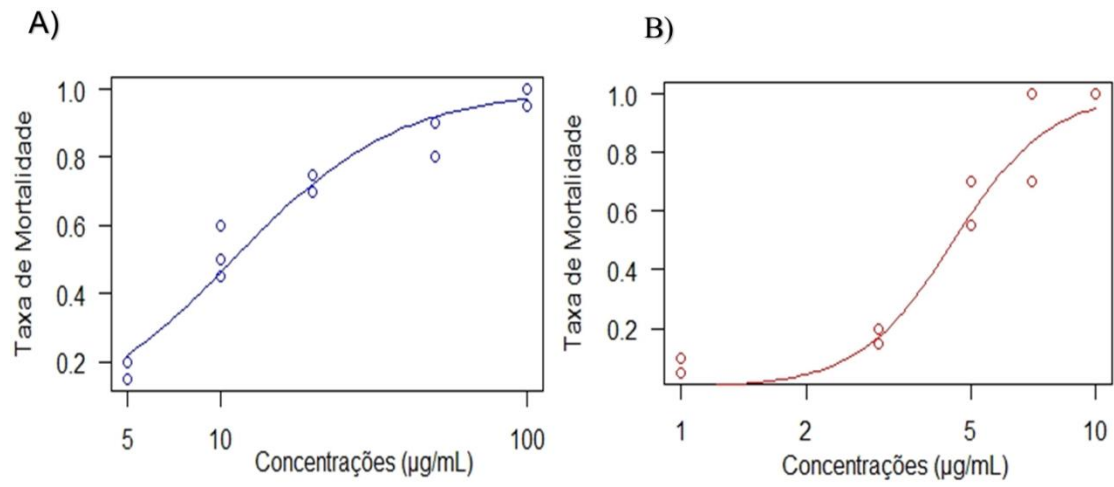


Figura 5

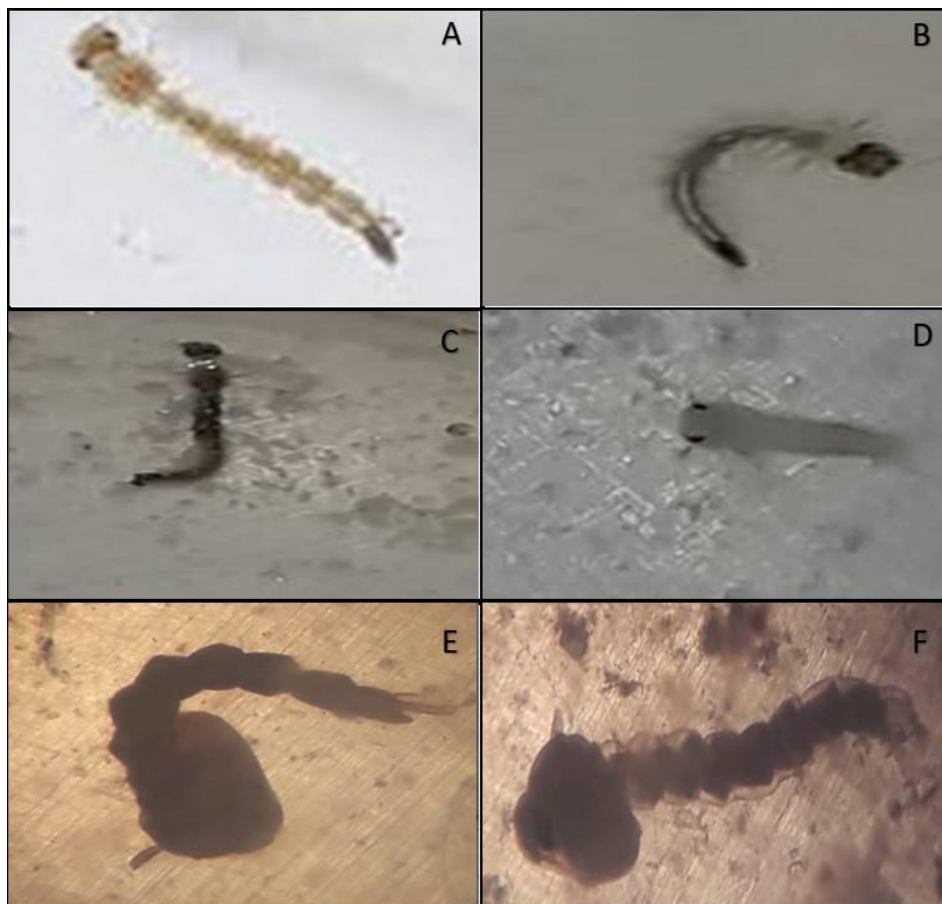


Figura 6

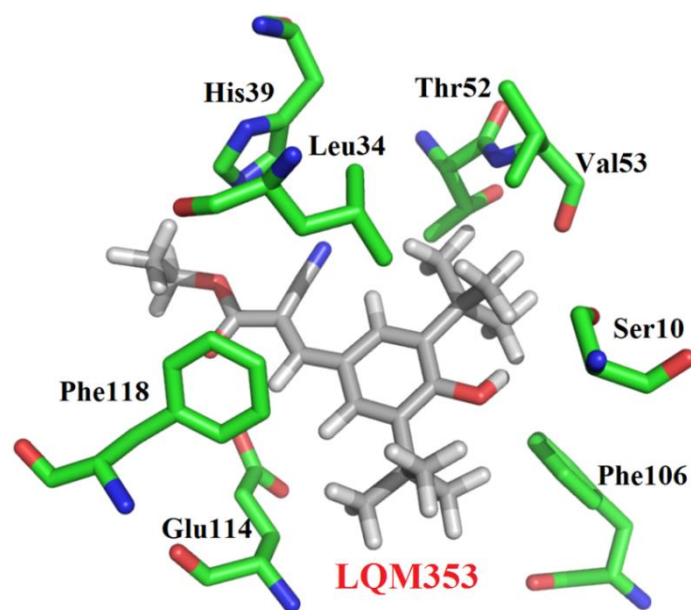


Figura 7