



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 C₂₀H₂₇NO₃, 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 (DENF), 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 ecodem 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 larvícida 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, consequentemente, 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 larvícida possa ser capaz de reduzir显著mente 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 glutationa 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 larvícida 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; MAGNUSEN, 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 (DENF), 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 DENF, 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 larvícida) 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 LC₅₀ de 82,02; 88,6 e 96,4 µg/mL, respectivamente. Paralelamente, o ar-curcumeno exibiu uma CL₅₀ de 10,45; 11,24 e 12,24 µg/mL e o epi-β-bisabolol, 14,68; 15,83 e 17,27 µg/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 quer cetina (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 LC₅₀ de 231,83 e 455,96 ppm, com X² 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, cipermetrina e ciflutirna), 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 glutationa S-transferease (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 gingensohnina, onde os análogos obtidos foram avaliados frente a larvas de *Ae. aegypti*.

[061] O derivado mais promissor apresentou uma CL₅₀ de 88,1 ppm, com X² de 0,58, após 24 horas. Ainda, tal derivado apresentou uma Cl₅₀ 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 LC₅₀ de 50,55 ppm (95%IC= 48,13-52,98) e LC₉₀ de 86,39 ppm (95%IC= 79,02-97,77), com X² 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 Cl₅₀ 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 significante 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 ± 0,22.

[064] Estudos relacionados ao desenvolvimento de 1,2,4-oxadiazóis ativos frente à 3-hidroxikinurenina 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 ± 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 ± 0,01; 0,32 ± 0,01; e 0,39 ± 0,03 uM, respectivamente (ENG et al., 2007).

[068] Uma série de ésteres derivados do ácido 4-mercaptop-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 larvicia contra *Ae. aegypti*. Estas demonstraram uma taxa 100% de mortalidade após 1,4 horas, à concentração de 100 mg/L. Ademais 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 larvicia 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 (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-terc-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 (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-terc-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 (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) apresenta eficiente ação larvícida 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 (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-terc-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 (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-terc-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 (<i>E</i>)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) possui atividade larvícida efetiva, não permitindo o progresso do ciclo biológico. Assim, não surgem mosquitos <i>Ae. aegypti</i> resistentes. |

| | |
|--|---|
| A glutationa 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-terc-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-terc-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353). No esquema mostrado, composto (1) : 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzoídeo; 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-terc-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-terc-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-terc-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353). Em (A), sinal do triploto 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 metíleno (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-terc-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-terc-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-terc-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-terc-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-terc-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353) com a enzima glutationa 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-terc-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 ($\geq 99\%$) 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 ^{13}C)

[085] Os espectros de RMN de 1H e ^{13}C foram obtidos utilizando um equipamento *Bruker®*, modelo *UltraShield 600 MHz*. Adicionalmente, clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) 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 ^{13}C 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 (X²), 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 estereo binocular com rácio de zoom de 1:7 (amplicação 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 4^a

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 sterrol 2 e glutationa 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/>) (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-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (LQM353)

[099] O (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-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-*terc*-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-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**).

[101] Ainda, ampliações no espectro de RMN de ^1H foram realizadas para demonstrar os acoplamentos ($J=7,13$ Hz) entre os sinais da metila (triploto para o CH_3) (Figura 4A) e metíleno (quarteto para o CH_2) (Figura 4B) do éster etílico terminal do composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-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 , $J=7,13$ Hz); 1,48 (*s*, 18H, $(\text{CH}_3)_6$); 4,36 (*q*, 2H, CH_2 , $J=7,13$ 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 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*

[103] A partir do bioensaio larvicida qualitativo envolvendo o composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil)acrilato (**LQM353**) foi verificado que esse possui atividade larvicida 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-*terc*-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 larvicida do composto (*E*)-Etil-2-ciano-3-(3,5-di-*terc*-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) | | | X² | |
|-----------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|------|
| | CL₁₀ | CL₅₀ | CL₉₀ | CL₁₀ | CL₅₀ | | |
| 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 larvicida com um valor de CL₁₀ (2,9 µg/mL) similar à CL₁₀ (2,5 µg/mL) do temefós, e seus resultados são de confiabilidade significante, observado pelos parâmetros calculados no modelo matemático, a qual mostra que a atividade (representada pela a 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 larvicida 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 |
| Temeffós | 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 abdómen; esse último por sua vez com oito seguimentos (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 larvicida 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 mosquitos *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 glutationa 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 viabilidade 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 glutationa 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 epsilon-2 da enzima glutationa 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

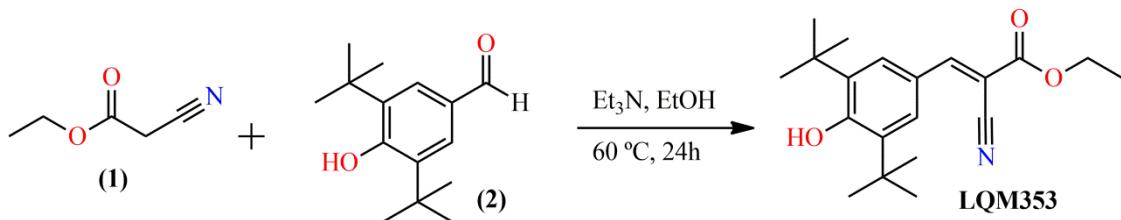


Figura 1

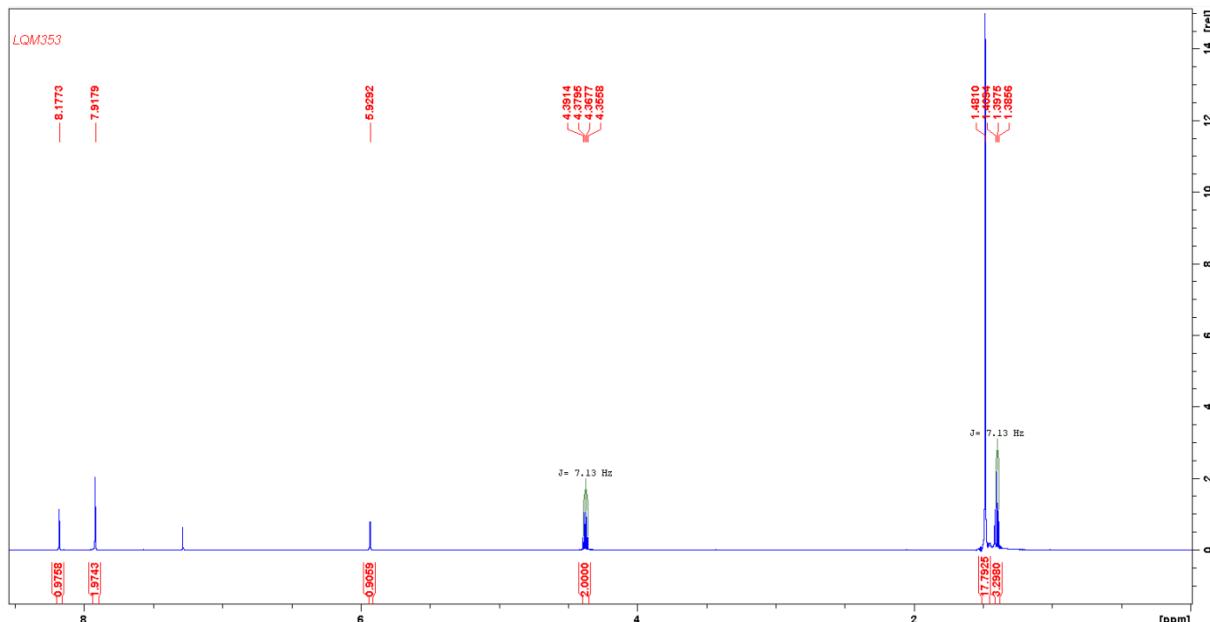


Figura 2

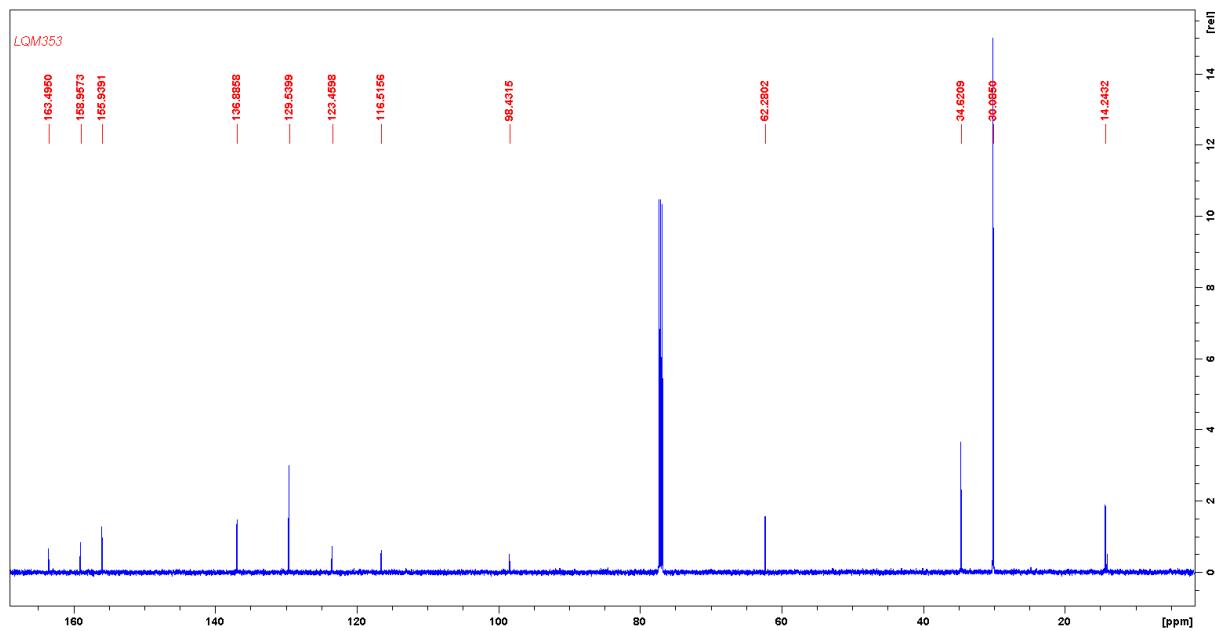


Figura 3

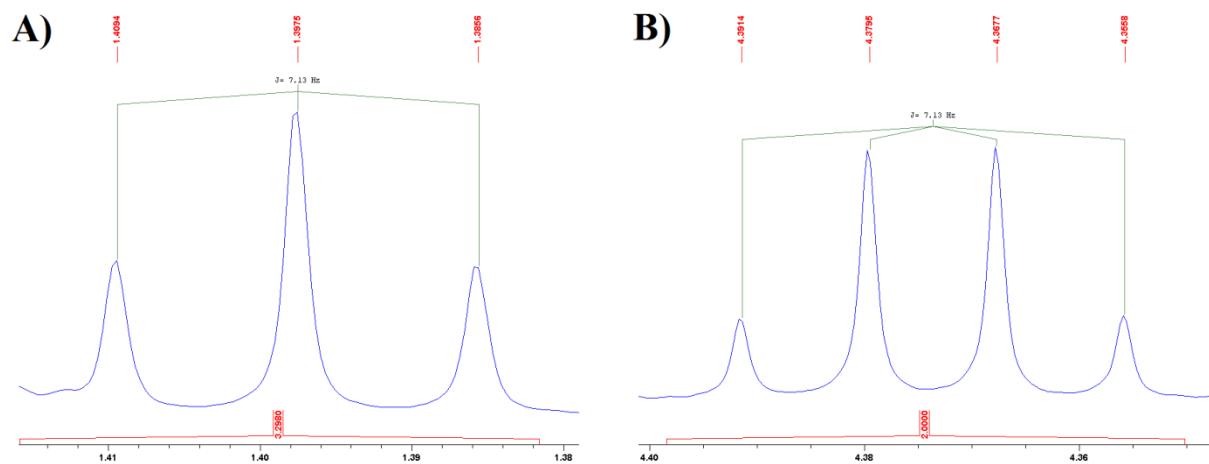


Figura 4

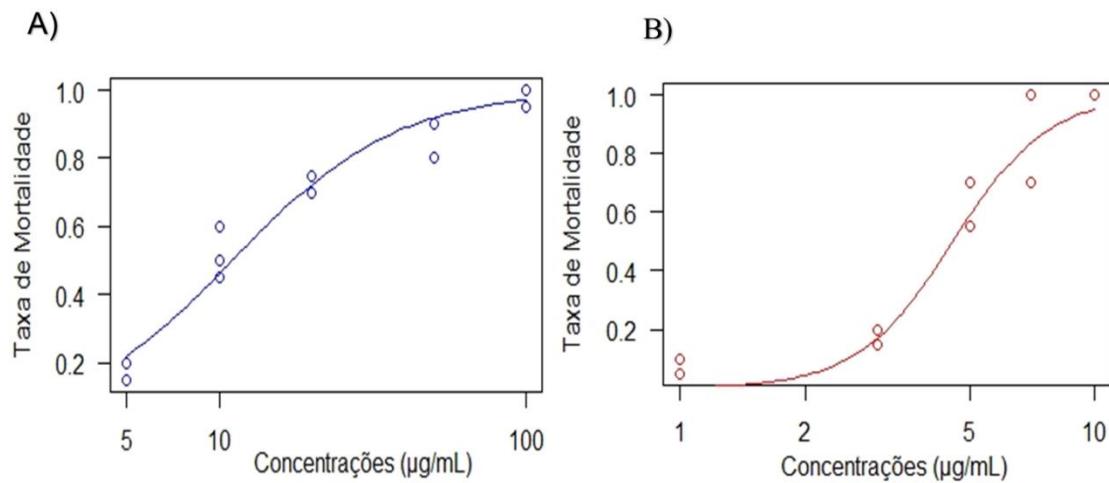


Figura 5

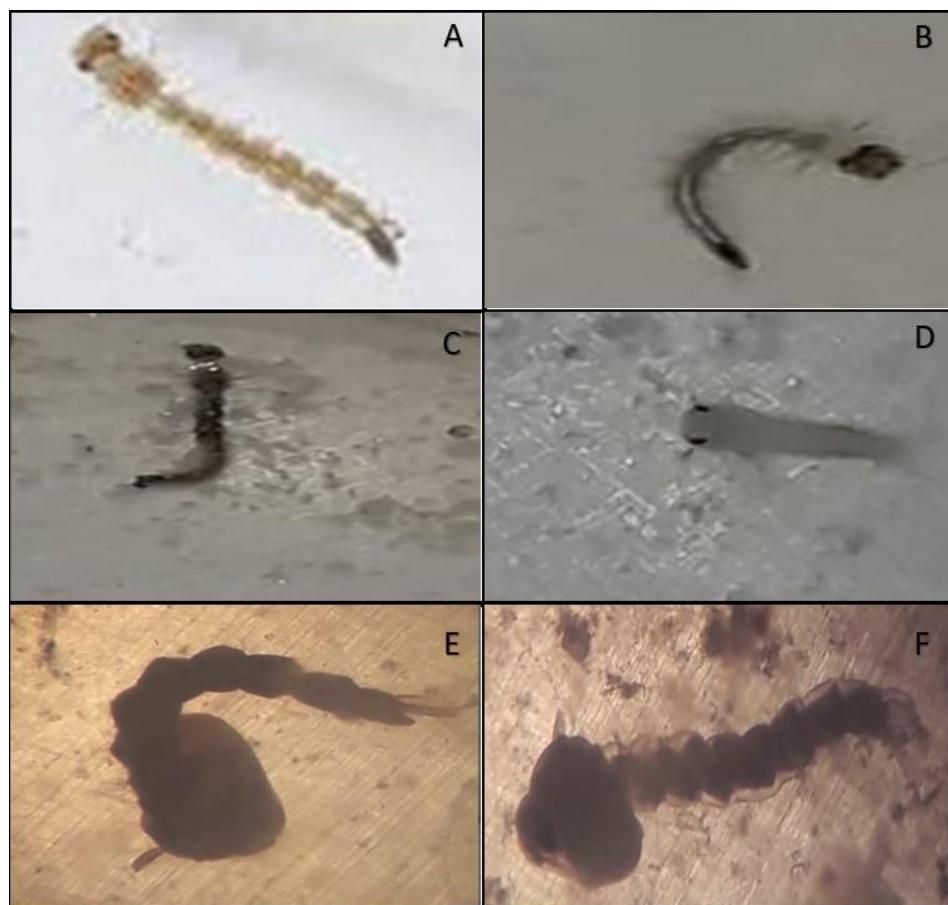


Figura 6

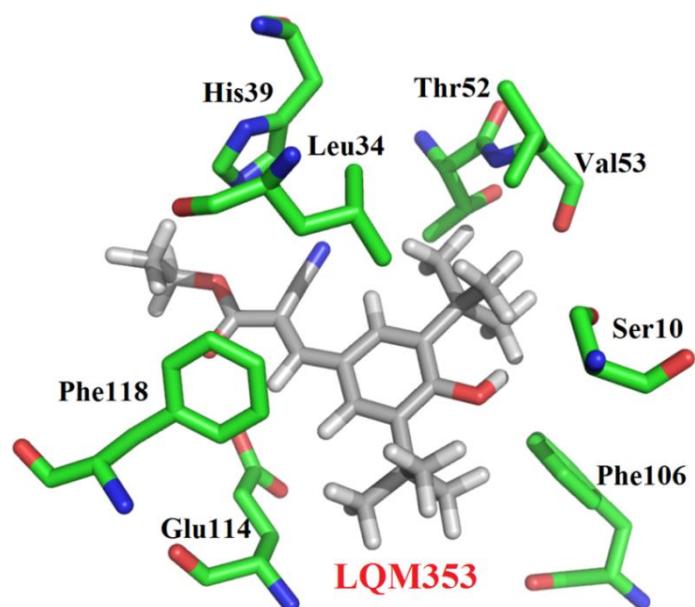


Figura 7