



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

EMERSON YVAY ALMEIDA DE SOUSA

**OBTENÇÃO DE DERIVADOS DO (-)-MENTOL E AVALIAÇÃO
DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS: INIBIÇÃO DA ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE, LARVICIDA E ANSIOLÍTICA**

FORTALEZA

2023

EMERSON YVAY ALMEIDA DE SOUSA

OBTENÇÃO DE DERIVADOS DO (-)-MENTOL E AVALIAÇÃO
DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS: INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE,
LARVICIDA E ANSIOLÍTICA

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos.

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S696o Sousa, Emerson Yvay Almeida de.
Obtenção de derivados do (-)-mentol e avaliação de atividades biológicas: inibição da enzima acetilcolinesterase, larvicida e ansiolítica / Emerson Yvay Almeida de Sousa. – 2023.
106 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos.
Coorientação: Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte.
1. (-)-mentol. 2. Derivados do (-)-mentol. 3. Atividade larvicida. 4. Atividade acetilcolinesterásica. 5. Atividade ansiolítica. I. Título.

CDD 540

EMERSON YVAY ALMEIDA DE SOUSA

OBTENÇÃO DE DERIVADOS DO (-)-MENTOL E AVALIAÇÃO
DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS: INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE,
LARVICIDA E ANSIOLÍTICA

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 28/08/2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Nagila Maria Pontes Silva Ricardo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Aluisio Marques da Fonseca
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos
Universidade Vale do Acaraú (UVA)

Dedico este trabalho a Deus primeiramente,
que iluminou meus passos rumo a conquista
do saber.

A todos meus familiares, à minha mãe e meu
pai, aos meus irmãos, minha esposa e meus
filhos, são pessoas que fizeram parte de minha
vida ao longo desse período e alcance deste
título tão almejado.

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente a minha mãe Maria de Fátima e ao meu pai Francisco Valter, aos meus irmãos Ellison, Enderson[†] e Lucibele que sempre estiveram ao meu lado e me ajudaram em todos os momentos, fundamentando o ser humano que me tornei.

A minha esposa, Mayara Oliveira, mostrando-se uma companheira que me ajudou e me motivou nos momentos de desânimos e de dificuldades nas atividades experimentais exigidas na Pós-Graduação.

Aos meus filhos Pedro Enderson e Lucca Biorne, pela alegria gerada ao meu coração do acordar ao deitar, sempre sorrindo, sempre dispostos a estarem ao meu lado. São os melhores meninos que eu poderia ter.

A minha orientadora, Dra. Telma Leda Gomes de Lemos, pela confiança, amizade, apoio, pelos ensinamentos e pela orientação que resultou nesse trabalho. Professora cuja trajetória de vida e profissional me inspira e serve de exemplo.

Ao professor Dr. Francisco de Queiroz Monte, meu co-orientador, que não dispensou esforços ao apoiar meu trabalho, dando contribuições fundamentais e decisivas para sua conclusão. Professor que aprendi a admirar por sua brilhante atuação profissional e por seu carisma inigualável.

Aos amigos e colegas do LBPN por estarem presentes no cotidiano das atividades experimentais, sendo decisivos para realização desse trabalho, especialmente ao André Martins, Gisele Rocha, Bruna Marques[†], Patrícia Georgina, Iolanda Frota, Felipe Maia, Daniele Alves, Juliana Maria e Marcia Cleane.

Em especial as alunas de iniciação científica Alyne Prudêncio, Amanda Carolino e Natanielly Quintela que me ajudaram durante um momento importante dessa trajetória. Deus colocou vocês no meu caminho para que pudesse concluí-lo.

Aos amigos e colegas do LABS em especial a Bruna Rocha, Carol Lustosa, Daniely Holanda, Maria Vieira, Francisco Aquino, Diana Kelly e ao Marcos Reinaldo pelos ensinamentos.

Aos colegas da turma de doutorado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

A UFC e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de me qualificar profissionalmente nesta instituição.

À CAPES pela bolsa concedida, CNPq e FUNCAP pelo fomento.

A todos, meu sincero e fraterno muito obrigado!

“Elevo os meus olhos para os montes; de onde me vem o meu socorro?
O meu socorro vem do Senhor, que fez os céus e a terra. Não deixará vacilar o teu pé; aquele que te guarda não dormitará. Eis que não dormitará nem dormirá aquele que guarda a Israel.” (Salmos 121).

RESUMO

Neste trabalho foram sintetizados derivados do mentol e da mentona entre estes, nove ésteres, uma tiossemicarbazona e duas hidrazonas. Todos caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN ^1H), cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Considerando que mentol e mentona são os constituintes majoritários presentes em muitos óleos essenciais de plantas com atividade larvicida comprovada, principalmente no gênero *Mentha*, o trabalho teve como objetivo central avaliar o potencial larvicida dos derivados obtidos frente as larvas do mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor responsável pela transmissão de doenças como Febre Chikungunya, Zika e Dengue. Os compostos foram avaliados quanto a atividade larvicida usando larvas de 3º estágio do mosquito *Aedes aegypti*, em diferentes concentrações (4 – 10 – 20 – 40 – 100) ppm dos bioprodutos. Os compostos MDODEC, MBENZ, MBENZ 4-OCH₃, MBENZ 4-Cl, MAC, MCINAM, MCINAM 4-OCH₃, MENTIO E MENTISO, obtiveram pontencil larvicida com valores de CL₅₀ menor que 100 ppm, destacando-se MDODEC E MENTIO com valores de CL₅₀ de 8 e 22ppm, respectivamente, próximos ao do larvicida temefos, 4 ppm. As amostras também foram avaliadas quanto a sua atividade ansiolítica, modificando a atividade lomotora e comportamental do zebrafish, atuando via GABA. Todos os compostos foram testados quanto a ação inibitória da enzima Acetilcolinesterase (AChE), apresentando halos de inibição próximos e, em alguns casos, maior que o padrão Eserina.

Palavras-chave: (-)-mentol; derivados do (-)-mentol; atividade larvicida; atividade acetilcolinesterásica, atividade ansiolítica.

ABSTRACT

In this work, menthol and menthone derivatives were synthesized, including nine esters, one thiosemicarbazone and two hydrazones. All characterized by nuclear magnetic resonance (^1H NMR), gas chromatography coupled to mass spectrometer (GC-MS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Aiming to evaluate its larvicidal potential against the larvae of the *Aedes aegypti* mosquito, the main vector responsible for the transmission of diseases such as Chikungunya Fever, Zika and Dengue. Considering that menthol and menthone are the major constituents present in many essential oils of plants, mainly of the genus *Mentha*, with proven larvicidal activity. The compounds were evaluated for larvicidal activity using 3rd stage larvae of the *Aedes aegypti* mosquito, at different concentrations (4 – 10 – 20 – 40 – 100) ppm of bioproducts. The compounds MDODEC, MBENZ, MBENZ 4-OCH₃, MBENZ 4-Cl, MAC, MCINAM, MCINAM 4-OCH₃, MENTIO AND MENTISO, obtained larvicidal pontencil with LC50 values lower than 100 ppm, with emphasis on MDODEC AND MENTIO with values of CL50 close to that of the larvicide fearfos. The samples were also evaluated for their anxiolytic activity, modifying the zebrafish's locomotor and behavioral activity, acting via GABA. All compounds were tested for the inhibitory action of the enzyme Acetylcholinesterase (AChE), showing inhibition halos close to and, in some cases, greater than the Eserine standard.

Keywords: (-)-menthol; (-)-menthol derivatives; larvicidal activity; acetylcholinesterase activity, anxiolytic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura química do (-)-Mentol e (-)-Mentona	20
Figura 2	– Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	22
Figura 3	– Ciclo de reprodução do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	23
Figura 4	– Áreas que apresentam o vírus da dengue	24
Figura 5	– Estrutura química Temefos	28
Figura 6	– Estrutura química do Pyriproxyfen	28
Figura 7	– Estrutura químicas de fármacos ansiolíticos	31
Figura 8	– Fotografia do CG-EM modelo QP2010 da SHIMADZU	35
Figura 9	– Mecanismo para a formação de ésteres derivados do (-)-mentol	37
Figura 10	– Estrutura química do MBENZ	38
Figura 11	– Estrutura química do MBENZ 4-OCH ₃	38
Figura 12	– Estrutura química do MBENZ 4-NO ₂	39
Figura 13	– Estrutura química do MBENZ 4-Cl	40
Figura 14	– Estrutura química do MDODEC	41
Figura 15	– Estrutura química do MEST	42
Figura 16	– Estrutura química do MAC	42
Figura 17	– Estrutura química do MCINAM	43
Figura 18	– Estrutura química do MCINAM 4-OCH ₃	44
Figura 19	– Estrutura química do MENTIO	45
Figura 20	– Estrutura química do MENTISO	46
Figura 21	– Estrutura química do MHID 2,4-DINITRO	47
Figura 22	– Injeção, via intraperitoneal (i.p.), das amostras no zebrafish	51
Figura 23	– Espectro de infravermelho do benzoato de mentila (MBENZ)	56
Figura 24	– Espectro de massa do benzoato de mentila (MBENZ)	57

Figura 25	– Espectro de RMN ¹ H do Benzoato de mentila (MBENZ)	57
Figura 26	– Espectro de infravermelho do 4-metóxi benzoato de mentila (MBENZ 4-OCH ₃)	58
Figura 27	– Espectro de massa do 4-metóxi benzoato de mentila (MBENZ 4-OCH ₃)	58
Figura 28	– Espectro de RMN ¹ H do 4-metóxi benzoato de mentila (MBENZ 4-OCH ₃)	59
Figura 29	– Espectro de infravermelho do 4-nitro benzoato de mentila (MBENZ 4-NO ₂)	60
Figura 30	– Espectro de massa do 4-nitro benzoato de mentila (MBENZ 4-NO ₂)	60
Figura 31	– Espectro de RMN ¹ H do 4-nitro benzoato de mentila (MBENZ 4-NO ₂)	61
Figura 32	– Espectro de infravermelho do 4-cloro benzoato de mentila (MBENZ 4-Cl)	62
Figura 33	– Espectro de massas do 4-cloro benzoato de mentila (MBENZ 4-Cl)	62
Figura 34	– Espectro de RMN ¹ H do 4-cloro benzoato de mentila (MBENZ 4-Cl)	63
Figura 35	– Espectro de infravermelho do dodecanoato de mentila (MODEC)	64
Figura 36	– Espectro de massa do dodecanoato de mentila (MODEC)	64
Figura 37	– Espectro de RMN ¹ H do dodecanoato de mentila (MODEC)	65
Figura 38	– Espectro de infravermelho do octadecanoato de mentila (MEST)	66
Figura 39	– Espectro de massa do octadecanoato de mentila (MEST)	66
Figura 40	– Espectro de RMN ¹ H do octadecanoato de mentila (MEST)	67
Figura 41	– Espectro de infravermelho do acetato de mentila (MAC)	68
Figura 42	– Espectro de massas do acetato de mentila (MAC)	68

Figura 43	– Espectro de RMN ¹ H do acetato de mentila (MAC).....	69
Figura 44	– Espectro de infravermelho do cinamato de mentila (MCINAM).....	70
Figura 45	– Espectro de massas do cinamato de mentila (MCINAM).....	70
Figura 46	– Espectro de RMN ¹ H do cinamato de mentila (MCINAM).....	71
Figura 47	– Espectro de infravermelho do 4-metóxicinamato de mentila (MCINAM 4-OCH ₃)	72
Figura 48	– Espectro de massa do do 4-metóxicinamato de mentila (MCINAM 4-OCH ₃)	72
Figura 49	– Espectro de RMN ¹ H do do 4-metóxicinamato de mentila (MCINAM 4-OCH ₃)	73
Figura 50	– Espectro de infravermelho do (E) -2 - ((2S, 5R) -2-isopropil-5-metilciclohexilideno) hidrazinacarbotoamida (MENTIO)	76
Figura 51	– Espectro de massa do (E) -2 - ((2S, 5R) -2-isopropil-5-metilciclohexilideno) hidrazinacarbotoamida (MENTIO)	76
Figura 52	– Espectro de RMN ¹ H do (E) -2 - ((2S, 5R) -2-isopropil-5-metilciclohexilideno) hidrazinacarbotoamida (MENTIO)	77
Figura 53	– Espectro de infravermelho do (E)-N'-((2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclohexilideno) benzo-hidrazida (MENTISO)	78
Figura 54	– Espectro de massa do (E)-N'-((2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclohexilideno) benzo-hidrazida (MENTISO)	78
Figura 55	– Espectro de RMN ¹ H do (E)-N'-((2S, 5R)-2 isopropil-5-metilciclohexilideno) benzo-hidrazida (MENTISO)	79
Figura 56	– Espectro de infravermelho do (E)-1-(2,4-dinitrofenil)-2-((2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) hidrazina (MHID 2,4-DINITRO)	80
Figura 57	– Espectro de massa do (E)-1-(2,4-dinitrofenil)-2-((2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) hidrazina (MHID 2,4-DINITRO)	80
Figura 58	– Espectro de RMN ¹ H do (E)-1-(2,4-dinitrofenil)-2-((2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) hidrazina (MHID 2,4-DINITRO)	81
Figura 59	– Oxidação enzimática do paration a paraoxon pelo citocromo CYP	86

Figura 60	– Fotos de larvas do 3º estágio do <i>Aedes aegypti</i> após a ação dos bioprodutos: MDODEC (a) e MENTIO (b), usando microscópio	87
Figura 61	– Micrografias de larvas do 3º estágio do <i>Aedes aegypti</i> após a ação dos bioprodutos: MDODEC (a) e MENTIO (b)	88
Figura 62	– Micrografias ampliadas de larvas do 3º estágio do <i>Aedes aegypti</i> após a ação dos bioprodutos: MDODEC (a) e MENTIO (b)	89
Figura 63	– Ilustração do aquário onde é realizado o teste claro/escuro	91
Figura 64	– Avaliação da locomoção dos animais avaliados através do teste de campo aberto	93
Figura 65	– Avaliação do efeito ansiolítico do MDODEC	94
Figura 66	– Mecanismo de ação ansiolítica via GABA	95
Figura 67	– Espectro de massas de 7 , $T_R = 5,839$ minutos	96

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	– Síntese e hidrólise da Acetilcolina	30
Esquema 2	– Esquema reacional dos ésteres derivados do (-)-mentol através de esterificação com ácidos carboxílicos aromáticos	30
Esquema 3	– Esquema reacional dos ésteres derivados do (-)-mentol através de esterificação com ácidos carboxílicos de cadeia aberta	38
Esquema 4	– Esquema reacional do éster derivado do (-)-mentol através de esterificação com anidrido acético	41
Esquema 5	– Esquema reacional dos ésteres derivados do (-)-mentol através de esterificação com ácidos carboxílicos	45
Esquema 6	– Esquema reacional dos derivados da (-)-mentona através de reação com tiossemicarbazida e hidrazinas	45
Esquema 7	– Esquema reacional da biorredução da (-)-mentona	46
Esquema 8	– Reação da acetilcolina com a enzima acetilcolinesterase	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rendimento das reações de esterificação do mentol com ácidos carboxílicos aromáticos	35
Tabela 2 – Rendimento das reações de esterificação do mentol com ácidos carboxílicos de cadeia aberta	37
Tabela 3 – Rendimento das reações de esterificação do mentol com ácido cinâmico e 4-metóxi-cinâmico	43
Tabela 4 – Rendimento das reações de esterificação do mentol com ácidos carboxílicos	48
Tabela 5 – Tamanho dos halos para o teste acetilcolinesterase dos derivados do (-)-mentol e da (-)-mentona	59
Tabela 6 – CL ₅₀ para os derivados do (-)-mentol e da (-)-mentona	62
Tabela 7 – Resultados dos testes de toxicidade aguda (96h)	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
BSA	Albumina Bovina
CC	Coluna Cromatográfica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CENAUREMN	Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IV	Infravermelho
IPA	Isopropanol
NADH/NA ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADP/NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótideo Fosfato
pH	Potencial Hidrogeniônico
r.p.m	Rotação por minuto
Tr	Tempo de retenção
UV-Vis	Ultravioleta Visível
Φ	Diâmetro
%PZC	Porcentagem de permanencia na zona clara
AChE	Acetilcolinesterase
BZD	Benzodiazepinicos
CL50	Concentracao letal mediana
DMSO	Dimetilsulfoxido
DZP	Diazepam
FMZ	Flumazenil
FT-IR	Espectroscopia Vibracional na Regiao do Infravermelho com Transformada de Fourier
γ-GABA	Ácido gama-aminobutírico
MEV	Microscopia Eletronica de Varredura
NUVET	Nucleo de Controle de Vetores e Endemias
OMS	Organizacao Mundial da Saude
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UFC	Universidade Federal do Ceara

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	20
2.1	MENTOL E MENTONA	20
2.2	DENGUE.....	21
2.3	ACETILCOLINESTERASE	26
2.4	AÇÃO LARVICIDA	27
2.5	ATIVIDADE ANSIOLÍTICA	29
3	OBJETIVOS	33
3.1	GERAL.....	33
3.2	ESPECÍFICOS.....	33
4	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	34
4.1	MÉTODO DE SEPARAÇÃO E ANÁLISES	34
4.1.1	<i>Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</i>	<i>34</i>
4.1.2	<i>Cromatografia de Adsorção em Coluna (CC).....</i>	<i>34</i>
4.1.3	<i>Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM).....</i>	<i>35</i>
4.1.4	<i>Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H).....</i>	<i>36</i>
4.1.5	<i>Espectroscopia de Infravermelho (IV).....</i>	<i>36</i>
4.2	SÍNTESE DOS DERIVADOS DO MENTOL.....	36
4.2.1	<i>Benzoato de mentila (MBENZ).....</i>	<i>37</i>
4.2.2	<i>4-metóxi-benzoato de mentila (MBENZ 4-OCH₃).....</i>	<i>38</i>
4.2.3	<i>4-nitro-benzoato de mentila (MBENZ 4-NO₂).....</i>	<i>39</i>
4.2.4	<i>4-cloro-benzoato de mentila (MBENZ 4-Cl).....</i>	<i>39</i>
4.2.5	<i>Dodecanoato de mentila (MDODEC)</i>	<i>40</i>
4.2.6	<i>Octadecanoato de mentila (MEST)</i>	<i>41</i>
4.2.7	<i>Acetato de mentila (MAC)</i>	<i>42</i>
4.2.8	<i>Cinamato de mentila (MCINAM)</i>	<i>42</i>
4.2.9	<i>4-metóxi-cinamato de mentila (MCINAM 4-OCH₃).....</i>	<i>43</i>
4.2.10	<i>(E) -2-((2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) hidrazinacarbotioamida (MENTIO).....</i>	<i>44</i>
4.2.11	<i>(E)-N'-((2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) benzo-hidrazida (MENTISO)</i>	<i>45</i>

4.2.12	<i>(E)</i> -1-(2,4-dinitrofenil)-2-((2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) hidrazina (MHID 2,4-DINITRO).....	45
4.3	ENSAIOS DA ATIVIDADE LARVICIDA	46
4.4	ATIVIDADE ANSIOLÍTICA	47
4.4.1	<i>Materiais</i>	47
4.4.2	<i>Ensaio da atividade ansiolítica</i>	47
4.4.3	<i>Teste de campo aberto</i>	48
4.4.4	<i>Teste claro/escuro</i>	48
4.4.5	<i>Participação do sistema GABAérgico</i>	49
4.5	TOXICIDADE AGUDA (96 HORAS).....	49
4.6	ENSAIO PARA INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	PARTE 1: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS	51
5.1.1	<i>Síntese dos derivados do (-)-mentol</i>	51
5.1.2	<i>Caracterização dos derivados do (-)-mentol</i>	54
5.1.2.1	Caracterização do benzoato de mentila (MBENZ)	55
5.1.2.2	Caracterização do 4-metóxi benzoato de mentila (MBENZ 4-OCH ₃)	57
5.1.2.3	Caracterização do 4-nitrobenzoato de mentila (MBENZ 4-NO ₂)	58
5.1.2.4	Caracterização do 4-clorobenzoato de mentila (MBENZ 4-Cl).....	61
5.1.2.5	Caracterização do dodecanoato de mentila (MODEC)	62
5.1.2.6	Caracterização do octadecanoato de mentila (MEST)	65
5.1.2.7	Caracterização do acetato de mentila (MAC)	67
5.1.2.8	Caracterização do cinamato de mentila (MCINAM)	69
5.1.2.9	Caracterização do 4-metóxicinamato de mentila (MCINAM 4-OCH ₃).....	70
5.1.3	<i>Síntese dos derivados da (-)-mentona</i>	72
5.1.3.1	Caracterização do (<i>E</i>)-2- ((2 <i>S</i> , 5 <i>R</i>) -2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) hidrazinacarbotoamida (MENTIO)	75
5.1.3.2	Caracterização do (<i>E</i>)- <i>N'</i> -((2 <i>S</i> , 5 <i>R</i>)-2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) benzo- hidrazida (MENTISO)	77
5.1.3.3	Caracterização do (<i>E</i>)-1-(2,4-dinitrofenil)-2-((2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-isopropil-5-metilciclo- hexilideno) hidrazina (MHID 2,4-DINITRO)	79
5.2	PARTE 2: ATIVIDADES DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE, LARVICIDA E ANSIOLÍTICA	81

5.2.1	<i>Avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase dos derivados do mentol e da mentona</i>	81
5.2.2	<i>Avaliação atividade larvicida dos derivados do (-)-mentol e da (-)-mentona ...</i>	83
5.2.2.1	<i>Alterações morfológicas</i>	86
5.2.3	<i>Análise de ansiedade em zebrafish</i>	90
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
	REFERÊNCIAS	98

1. INTRODUÇÃO

A obtenção de novos intermediários químicos como precursores para a síntese de compostos constitui uma importante etapa no processo de descoberta e desenvolvimento de produtos com diferentes aplicações nas indústrias química e farmacêutica. Uma das principais estratégias para a obtenção de substâncias biologicamente ativas, por exemplo, consiste na modificação molecular em estruturas de substâncias biologicamente ativas. Nesse contexto, usar compostos derivados de fontes naturais como modelos para a síntese de estruturas análogas com atividade biológica desempenha um papel importante na criação de novos e promissores produtos terapêuticos. As alterações moleculares frequentemente enriquecem as atividades biológicas e podem também reduzir potenciais efeitos colaterais.

Mentol e mentona são monoterpenos presentes em muitos óleos essenciais de plantas, principalmente do gênero *Mentha*, com atividade larvicida comprovada. Estas características tornam ambos, moléculas alvo de modificações estruturais para a produção de substâncias com propriedades terapêuticas.

O presente trabalho aborda, em primeira mão, a síntese de ésteres derivados do mentol em reações com ácidos carboxílicos aromáticos, ácidos graxos e ácidos cinâmicos e, de tiosemicarbazonas e hidrazonas derivados da mentona, em reações com tiosemicarbazidas e com hidrazinas, respectivamente. Todos os produtos foram submetidos avaliação larvicida, ansiolítica e quanto ao potencial inibitório da enzima acetilcolinesterase (AChE), com resultados gerais bastante satisfatórios.

As plantas contêm enzimas com diferentes propriedades que permitem utilizá-las em vários tipos de reações biocatalíticas (BIROLI et al., 2015). A utilização de enzimas como biocatalisadores vem crescendo nos últimos anos nas mais diversas áreas do conhecimento, com aplicações nas indústrias química, farmacêutica, cosmética e de alimentos. O estudo das enzimas sob o ponto de vista reacional químico, permite um melhor entendimento de seu comportamento, norteador as várias aplicações de novas enzimas como proteases, acilases, oxirredutases, amilase, glicosidase, celulasas e lipases (BARON, 2008). As reações de biocatálise surgiram como uma alternativa eficaz para a chamada química verde, através das quais muitos processos industriais poderão ocorrer de forma a minimizar os impactos ambientais (SOUZA, 2012; VIEIRA et al., 2010). Particularmente, biocatálise é uma

importante opção para a síntese de intermediários quirais enantiomericamente puros para a indústria farmacêutica e outros produtos comerciais.

A intensa busca por compostos com atividade farmacológica, na qual a grande maioria são compostos quirais apresentam pelo menos um centro estereogênico, é fortemente dificultada através de reações via química convencional. Como a atividade biológica desses compostos depende de sua pureza enantiomérica, as reações estereosseletivas merecem destaque na síntese de moléculas com ação agrotóxica e de fragrâncias, sobretudo, com atividade farmacológica. Nessa perspectiva, uma segunda parte do trabalho, neste campo de pesquisas, teve como objetivo investigar as sementes de *Sinapis alba* L. (mostarda amarela), buscando a redução da (-)-mentona em (-)-mentol. Foi obtido o álcool (-)-mentol com excelente excesso enantiomérico (DE SOUSA et al., 2019). A caracterização deste produto foi realizada por cromatografia em camada delgada.

Com base no trabalho de Almeida (ALMEIDA et al., 2019), foram realizados testes para verificar a possível atividade larvicida de determinada substância. Além disso, também foi avaliada a ação inibitória da enzima Acetilcolinesterase (AChE), com o intuito de correlacionar a atividade larvicida com a inibição dessa enzima. Os resultados obtidos revelaram a presença de halos, iguais ou até maiores do que aqueles observados no padrão Eserina. Destacando-se o derivado MDODEC que revelou halos de inibição maiores do que o padrão Eserina, demonstrando um potencial promissor para atividade larvicida. Parte inferior do formulário

Com bases no resultado de ação larvicida obtido anteriormente, realizou-se um estudo para investigar a atividade citotóxica do derivado do mentol MDODEC, utilizando os peixes da espécie zebra fish (*Danio rerio*). Essa espécie é muito utilizada em estudos toxicológicos devido sua semelhança ao ser humano e sua sensibilidade a agentes químicos. Os peixes foram expostos ao MDODEC por 96 horas e não foi observado efeito adverso.

O mentol, com propriedades refrescantes e calmantes, motivou a utilização do “peixe zebra” como modelo animal para avaliar algum efeito farmacológico do derivado acima, sendo observado a atividade ansiolítica através do canal GABAérgico.

Finalmente, todos os derivados foram caracterizados através das técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H), ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN ¹³) e por espectrometria de massa (CG-EM).

No presente trabalho, também foi feito um estudo para monitorar a eficácia do composto MDODEC frente as larvas do mosquito da espécie *Aedes Aegypti*. A dL50 (dose

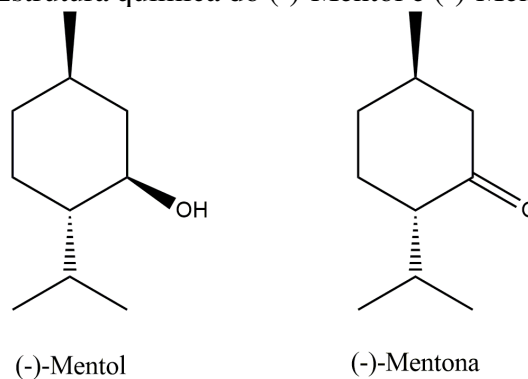
letal para 50% dos indivíduos) foi de 8ppm, ou seja, demonstrando alta eficácia no controle da população dessa espécie, controlando uma possível infestação. Essa descoberta pode ter impacto positivo no desenvolvimento de estratégias eficientes de combate a infestações e contribuir para a saúde pública.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.1 MENTOL E MENTONA

O mentol e a mentona (Figura 1) são dois monoterpênicos encontrados no óleo essencial de plantas do gênero *Mentha Piperita* (KAWASAKI et al., 2013; STRINGARO; COLONE; ANGIOLELLA, 2018), espécie pertencente a família Lamiaceae, umas das mais importantes na produção de óleo essencial. Seu principal constituinte ativo é o (-)-mentol, sendo consumido em sua forma pura ou presente em óleo essencial, em torno de 30 000 toneladas por ano (CURRIN et al., 2018).

Figura 1 - Estrutura química do (-)-Mentol e (-)-Mentona.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O grande destaque para este composto está relacionado a suas ações farmacológicas, como atividade analgésica (RODRIGUES et al., 2019), antifúngica (KHALEDI; TAHERI; TARIGHI, 2015), anti-inflamatória (LUO et al., 2019), antimicrobiana (KOT et al., 2018), inseticida (RADHIKA SAMARASEKERA, INDIRA S WEERASINGHE, 2008) e larvicida (PANDEY et al., 2013), como também, ao seu emprego em vários setores das indústrias cosmética (ABUALHASAN et al., 2017), farmacêutica (KAWASAKI et al., 2013), alimentícia (KUMAR; SINGH; CHHOKAR, 2011), cigarros (JACCARD et al., 2019) e agroquímica.

No tocante a área agroquímica, no trabalho de Khaledi (KHALEDI; TAHERI; TARIGHI, 2015) o óleo essencial de *Mentha piperita*, em que os constituintes principais são o (-)-mentol e a (-)-mentona, foi testado em sementes de feijão que apresentam o crescimento

de fungos patógenos de *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia Solani*. Utilizando-se concentração de 2000 ppm do óleo essencial resultou em efeito inibitório de 100% no crescimento de *M. phaseolina* e de *R. Solani*.

No tocante a área agroquímica, no trabalho de Khaledi (KHALEDI; TAHERI; TARIGHI, 2015), o óleo essencial de *Mentha piperita*, em que os constituintes principais são o (-)-mentol e a (-)-mentona, foi testado em sementes de feijão que apresentam o crescimento de fungos patógenos *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia Solani*. Utilizando concentração de 2000 ppm do óleo essencial resultou em efeito inibitório de 100% no crescimento de ambos os fungos.

A atividade larvicida do mentol e de outros monoterpenos foi estudada por Pandey (PANDEY et al., 2013). Além dos monoterpenos originais, seus derivados acetilados foram testados, obtendo-se resultados melhores que os respectivos monoterpenos puros, mas com valores inferiores ao padrão utilizado como larvicida. Devido ao número crescente de casos de dengue no Brasil e no mundo, busca-se uma alternativa de combate ao vetor responsável a transmissão dessas doenças. Os óleos essenciais e extratos de plantas, em que os componentes majoritários são o mentol e a mentona, mostraram boa atividade contra as larvas do vetor *Aedes aegypti*.

Com base nesses resultados, a obtenção de novos compostos oriundos de fontes naturais encorajam a preparação de seus derivados para avaliar a eficácia contra as larvas do *Aedes aegypti*. Desta maneira, serão obtidos derivados do (-)-mentol, que é o princípio ativo do óleo essencial da *Mentha piperita*. Alguns derivados do mentol já são relatados na literatura, mas ainda não foram avaliados quanto à sua eficácia larvicida.

2.2 DENGUE

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor responsável pela transmissão de algumas doenças virais, como a Febre Chikungunya, Zika e Dengue, que têm causado milhares de mortes nos últimos anos em todo o mundo (Figura 1) (CHARAN et al., 2013; SUNDARARAJAN; RANJITHA KUMARI, 2017; TIBAYRENC; AYALA, 2014). Assim, surgiu a necessidade urgente da criação de programas de controle, entre eles, a obtenção de novas substâncias que possam combater as formas de transmissão do mosquito da dengue

(BOSCO SIQUEIRA et al., 2005; CHAN, 2012; DUANE J. GUBLER; EONG OOI; SUBHASH VASUDEVAN; JEREMY FARRAR, 2014). Um dos modos de combate ao mosquito pode ser realizado mediante a aplicação de larvicidas em recipientes de água e do uso de inseticidas para combater os mosquitos em sua forma adulta (ESMERALDO, 2016; GUPTA; REDDY, 2013; KONISHI, 2011).

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor responsável pela transmissão de algumas doenças virais, como a Febre Chikungunya, Zika e Dengue, que têm causado milhares de mortes nos últimos anos (Figura 2) (CHARAN et al., 2013; SUNDARARAJAN; RANJITHA KUMARI, 2017; TIBAYRENC; AYALA, 2014).

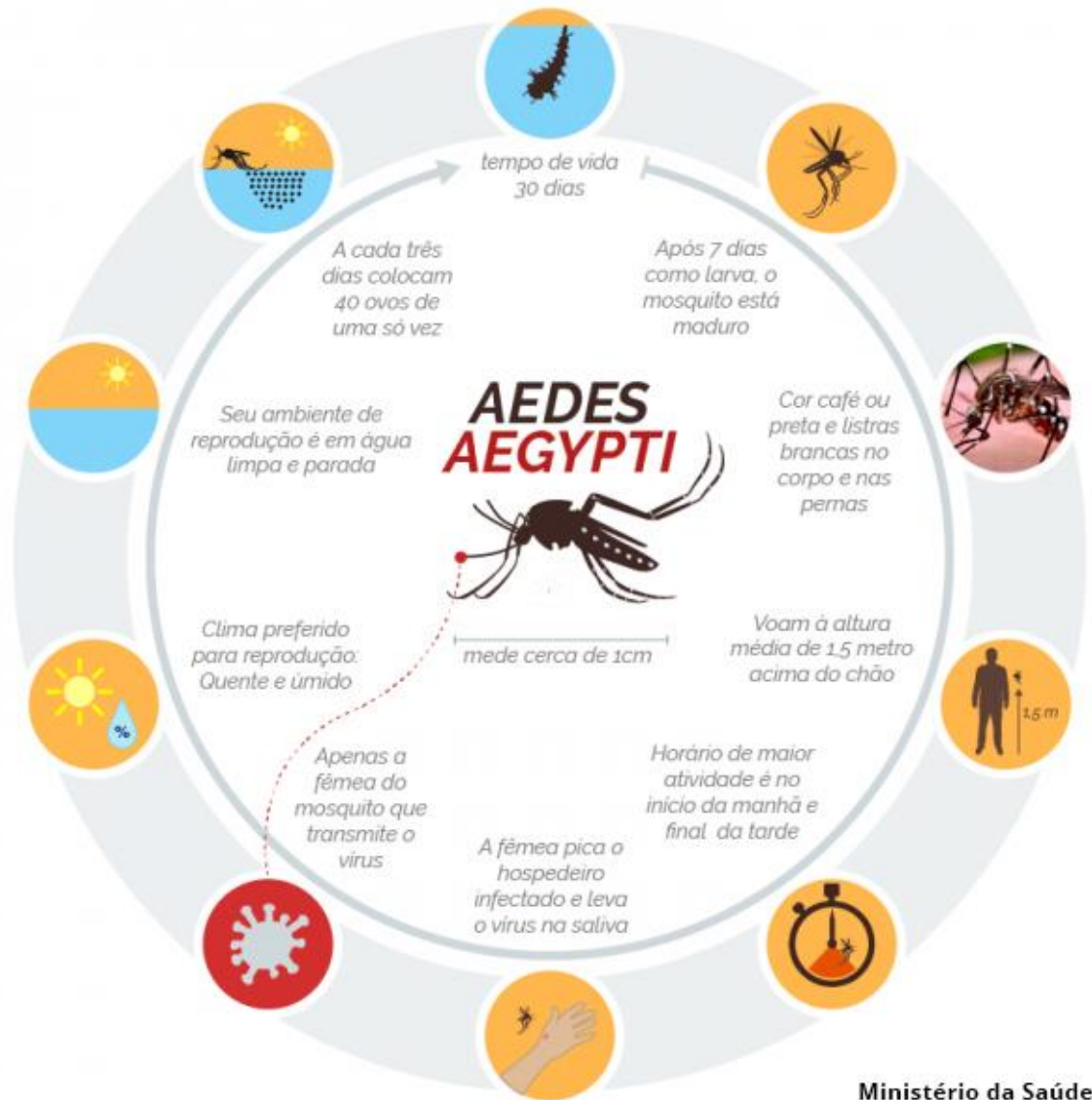
Figura 2 - Mosquito *Aedes aegypti*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Esta espécie de mosquito mede menos de 1 cm e é facilmente identificada pelas manchas brancas presentes no corpo, cabeça e pernas. Foi disseminada por todo o continente americano, pelo próprio homem, através do transporte dos ovos, das larvas e até mesmo do mosquito adulto em navios, aviões e veículos terrestres. O *Aedes aegypti* tem seu desenvolvimento através de metamorfose completa (holometabolismo), que compreende uma fase aquática representada por: ovo, larva (dividida em quatro estágios) e pupa e a fase aérea representada pelo mosquito adulto (Figura 3) (ESMERALDO, 2016).

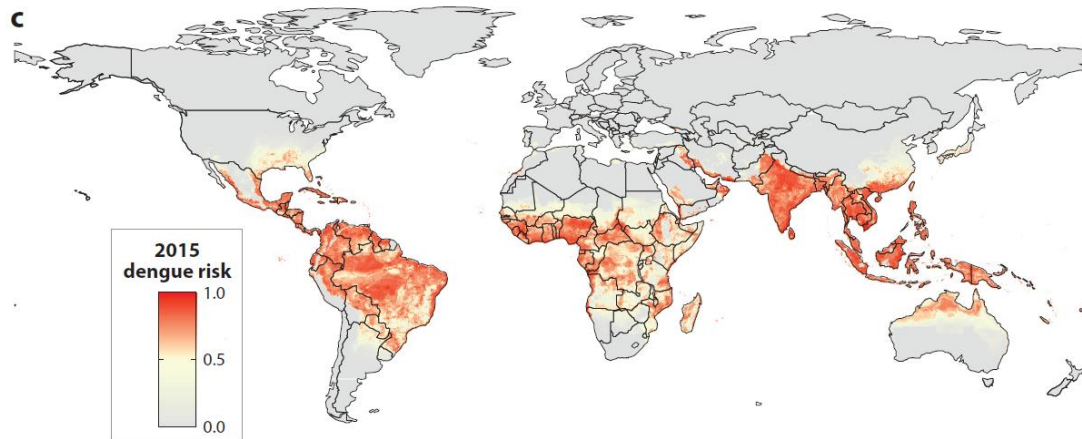
Figura 3 - Ciclo de reprodução do mosquito *Aedes aegypti*.



Fonte: Ministério da saúde.

O *Aedes aegypti* habita em regiões com climas tropicais, subtropicais e temperados, Figura 4 (KNECHT et al., 2018). Entre as doenças transmitidas, a dengue é a mais grave, e por isso, gera mais preocupação na saúde pública dos países de clima tropical e subtropical (BENELLI, 2015; DUPONT-ROUZEYROL et al., 2012). A dengue é uma doença com vários sintomas, onde os principais são febre, dor de cabeça, vômito, dor nas articulações, dor muscular e erupção cutânea (BRADY; HAY, 2020; DIAGNOSIS, 2009; WEAVER et al., 2016; WHITEHORN; VAN; SIMMONS, 2014).

Figura 4 - Áreas que apresentam o vírus da dengue.



Fonte: Brady 2019.

O agente causador da dengue é um vírus de RNA de fita simples, pertencente ao gênero *Flavivírus*, presente também em doenças emergentes que tem causado preocupação aos sistemas de saúde como, a febre amarela, a febre do nilo, a febre Chikungunya e a Zika (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016; GOULD; SOLOMON, 2008; JAMES et al., 2018). O vírus da dengue (DENV) existe em pelo menos quatro tipos de sorotipos distintos: Den-1, Den-2, Den-3 e Den-4. (ESMERALDO, 2016; PAHO, 2017) Vale destacar que a infecção por um sorotipo resulta em imunidade ao longo da vida a esse sorotipo (BRADY; HAY, 2020; JAMES et al., 2018).

Um dos primeiros relatos sobre epidemia de dengue ocorreu em 992, ocorrendo em cidades específicas na China (BENNETT et al., 2010; BRADY; HAY, 2020; GUBLER, 2011; JAMES et al., 2018). Outros casos relatos entre 1779 e 1916 em localidades variadas como Índia, Caribe e Estados Unidos remete as rotas de navegação como fator primordial para a pandemia do vírus DENV nesse período. A expansão da dengue ocorreu nos anos 90, quando o vírus da dengue migrou para áreas rurais, tornando o vírus onipresente em países tropicais e subtropicais (BRADY et al., 2012; EMA et al., 2011; KHODAVERDILOO et al., 2016; LOW et al., 2015; OOI; GOH; GUBLER, 2006; SIRISENA; NOORDEEN, 2014). O surto de doenças virais tem ampliado seus territórios, ocorrendo em territórios desabitados para o vírus DENV, sendo observados na América do Norte, Flórida em 2009 (Estados Unidos) e na Europa, Madeira em 2012 (Portugal) (BRADY; HAY, 2020; GRUBAUGH et al., 2017; HUMPHREY et al., 2019; MARCHAND et al., 2013; RADKE et al., 2012; REITER et al., 2003). Os surtos desse mosquito, têm despertado a atenção das agências de saúde para o controle desse mosquito e combater suas doenças habituais.

Devido ao grande número de casos de dengue surge a necessidade dos governos dessas regiões criarem programas de controle a dengue, iniciando-se com a elaboração de novos compostos que possam combater as formas de transmissão do vírus da dengue (BOSCO SIQUEIRA et al., 2005; CHAN, 2012; DUANE J. GUBLER; EONG OOI; SUBHASH VASUDEVAN; JEREMY FARRAR, 2014).

Sem métodos eficientes de prevenção das doenças causadas pelo vetor *Aedes aegypti*, surge a necessidade de controlar sua proliferação. O combate do mosquito pode ser realizado através da eliminação dos criadouros, da aplicação de larvicidas em recipientes de água e do uso de inseticidas para combater os mosquitos em sua forma adulta (ESMERALDO, 2016; GUPTA; REDDY, 2013; KONISHI, 2011).

Desde 1960, compostos organofosforados, como o temefos, o malathion e o fenitrothion, têm sido usados no controle da reprodução e proliferação do mosquito *Aedes aegypti*. Entretanto, foi observado que as larvas do mosquito têm adquirido resistência a esses compostos, surgindo conseqüentemente, a necessidade de novos larvicidas eficientes (DÓRIA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2011). Segundo Knecht (KNECHT et al., 2018) os inseticidas podem causar efeitos tóxicos diretos (causa mortalidade) e/ou indiretos (efeitos sub-letais). O segundo efeito pode provocar alterações comportamentais (como evasão) e biológicas (como alterações na fertilidade) dos insetos sobreviventes após o contato com uma dose sub-letal do inseticida. A exposição das larvas a doses sub-letais do temefos parece ter induzido resistência a essas larvas (LEE, 2000).

Tradicionalmente, o uso de compostos químicos sintéticos agridem o meio ambiente, promovendo a contaminação do solo, água e ar (DÓRIA et al., 2017). Estes sintéticos podem ser substituídos por compostos oriundos de fontes naturais, por exemplo, os óleos fixos. O trabalho realizado por Santos (SANTOS et al., 2017) relata a pesquisa feita com óleo fixo de sementes de *Syagrus coronata*, Palmeira Licuri, e sua atividade contra larvas do *Aedes aegypti*, com doses de CL50 de 21,07 ppm. Os resultados apontam que a atividade larvicida foi promovida pela ação dos ácidos decanóico e dodecanóico.

O trabalho realizado por Oliveira (OLIVEIRA et al., 2011), relata o uso de cardol, cardanol e ácido anarcádico extraídos da castanha de caju, onde os três apresentaram atividade larvicida contra as larvas do *Aedes aegypti*, com valores de CL50 = 10,22 para o cardol, 12,40 para o ácido anarcádico e 14,45 para o cardanol. Os resultados também foram promissores para a inibição de enzimas acetilcolinesterase no teste de TLC semelhante ao carbachol, usado como padrão.

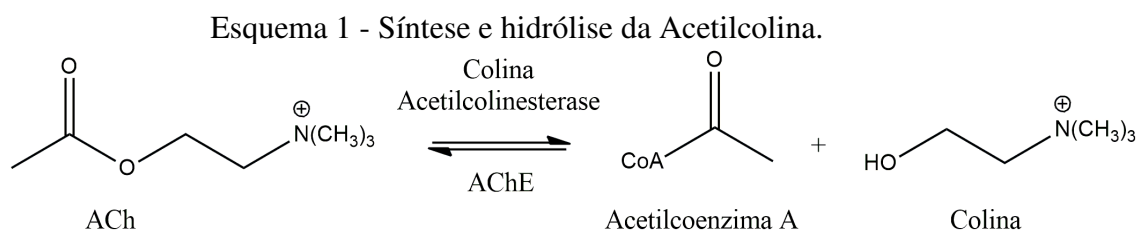
Outra pesquisa realizada na tentativa de se obter substâncias naturais que possam combater as larvas do *Aedes aegypti*, foi realizado por Duarte (DUARTE et al., 2015), que extraiu o óleo essencial de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), usado na forma de nanoemulsão com tamanho médio de 200nm, resultou em mortalidade larval de 80% em 24 horas e 90% em 48 horas, com concentração final de 250 ppm.

Outra alternativa para obtenção de compostos de origem vegetal eficientes na morte de larvas são extratos brutos obtidos com benzeno, hexano, acetato de etila, clorofórmio e metanol de *Terminalia chebula* (*Combretaceae*) planta medicinal originária do continente asiático. O extrato metanólico demonstrou as maiores taxas de mortalidade de larvas de *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, com CL50 de 87,13, 111,98 e 93,24 ppm, respectivamente (VENI; PUSHPANATHAN; MOHANRAJ, 2017).

Alguns trabalhos utilizando o óleo essencial da *Mentha piperita* em que os componentes majoritários são o mentol e a mentona, têm demonstrado atividades biológicas interessantes. A partir dessa perspectiva, o presente estudo realizou a síntese de derivados do mentol e da mentona com o objetivo de avaliar sua atividade larvicida contra larvas do *Aedes aegypti*.

2.3 ACETILCOLINESTERASE

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que atua no sistema nervoso central responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh), um neurotransmissor causador da transmissão sináptica colinérgica. Este neurotransmissor é hidrolisado em acetilcoenzima A e colina, e assim, permitem que o neurônio colinérgico retorne ao seu estado de repouso após ser ativado (Esquema 1) (AWASTHI et al., 2018; JANKOWSKA et al., 2019; ORHAN et al., 2008).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Alguns fármacos podem inibir a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) e por isso são chamados de anticolinesterásicos ou colinérgicos indiretos. A inativação da AChE evita a hidrólise da acetilcolina em acetilcoenzima A e colina, que assim, permanece ativa por um período maior na fenda sináptica e evita a restauração do neurônio ao estado inicial antes da ativação. Se o inibidor da AChE (IAChE) apresenta ação no sistema nervoso central, pode ser usado no tratamento da demência associada às doenças de Alzheimer e Parkinson (TREVISAN et al., 2003).

O trabalho investigado por Almeida (ALMEIDA et al., 2019), mostrou que derivados do cardol e cardanol apresentaram atividade larvicida em larvas do *Aedes aegypti*. Os resultados apontam que os derivados atuam na inibição da AchE, produzindo vários efeitos neurotóxicos e colapso do sistema nervoso central, levando a morte da larva.

2.4 AÇÃO LARVICIDA

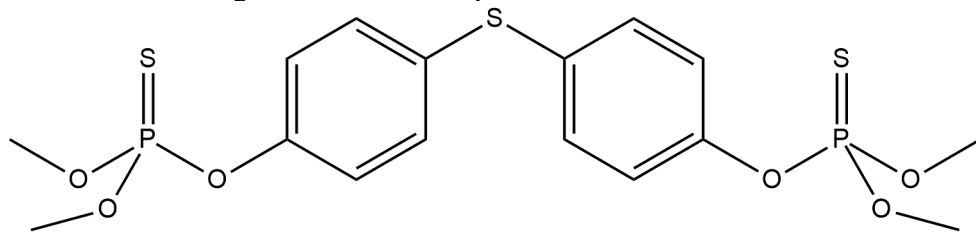
Em todo o mundo, aproximadamente 3.500 espécies de mosquitos foram registradas (HARBACH; HOWARD, 2007). Contudo, apenas uma pequena parcela dessas espécies é responsável por carregar e transmitir patógenos aos seres humanos (MULDERIJ-JANSEN et al., 2022). As doenças arbovirais (virais transmitidas por artrópodes) representam mais de 17% das doenças infecciosas em todo o mundo, afetando milhões de pessoas (ALMEIDA, 2023). Entre essas doenças, a infecção pelo vírus da dengue tem sido particularmente preocupante, visto que a incidência global aumentou 30 vezes nas últimas décadas. Na América Latina e na região do Caribe (ALC), a infecção pelo vírus da dengue tornou-se um sério problema de saúde pública, com um aumento significativo tanto na morbidade quanto na mortalidade (PANDIYAN; MATHEW; MUNUSAMY, 2019; TAPIA-CONYER; BETANCOURT-CRAVIOTO; MÉNDEZ-GALVÁN, 2012).

Além do vírus da dengue, os vírus chikungunya e zika também têm sido motivo de grande apreensão. Ambos se disseminaram rapidamente pela região da ALC nos últimos oito anos, ocasionando epidemias e altos níveis de morbidade. Essas enfermidades adicionais colocaram uma carga adicional nos sistemas de saúde da região (MULDERIJ-JANSEN et al., 2022; SILVA-FILHA et al., 2021).

Na América Latina e na região do Caribe, o *Aedes aegypti* é reconhecido como o principal mosquito vetor dos vírus da dengue, chikungunya e zika (POWELL, 2018; WEEKS et al., 2021). Entretanto, outro vetor preocupante é o *Aedes albopictus*, também conhecido como mosquito tigre asiático, que demonstrou ser um transmissor competente dos mesmos vírus mencionados anteriormente. A presença desse mosquito é de grande importância médica, devido ao seu comportamento agressivo de picar os humanos durante o dia, sua capacidade de adaptação a climas mais frios e sua habilidade de habitar recipientes artificiais e naturais próximos às áreas habitadas por pessoas, o que leva à transmissão de doenças em novas regiões geográficas (ALMEIDA, 2023; MULDERIJ-JANSEN et al., 2022).

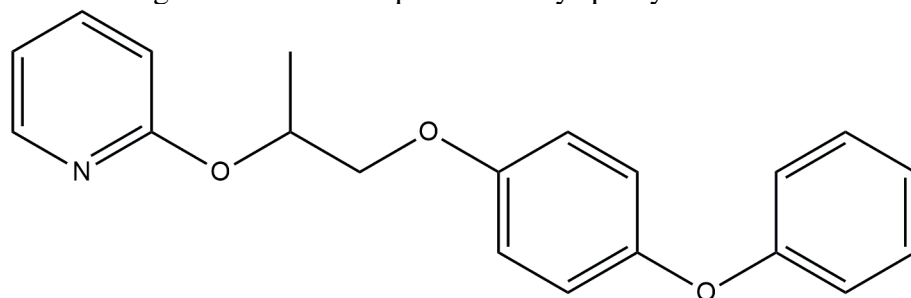
A transmissão do vírus por *Aedes aegypti* pode ser reduzida ou prevenida com manejo ambiental e pelo uso de inseticidas sintéticos pertencentes ao grupo dos organofosforados e piretróides, como o Temefos (Figura 5) e Pyriproxyfen (Figura 6), respectivamente (LIMA et al., 2006). No entanto, o uso frequente desses inseticidas pode resultar em fitotoxicidade, intoxicação humana e surgimento de insetos resistentes (KABIR et al., 2013; KUMAR et al., 2014; PANDEY et al., 2013). Nesse contexto, pesquisadores têm trabalhado para desenvolver estratégias alternativas de controle do *Aedes aegypti*, como o uso de fitolarvicidas compostos por óleos essenciais de plantas ou seus compostos (FUJIWARA et al., 2017; GRZYBOWSKI et al., 2013; LIMA et al., 2014; NOUR et al., 2009).

Figura 5 - Estrutura química Temefos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 - Estrutura química do Pyriproxyfen



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como muitos pesticidas são projetados para causar efeitos adversos no sistema nervoso de espécies de pragas, esses produtos químicos são suspeitos de contribuir para efeitos neurocomportamentais em humanos (AUDOUZE; TABOUREAU; GRANDJEAN, 2018; BJØRLING-POULSEN; ANDERSEN; GRANDJEAN, 2008).

Os esforços para controlar o *Aedes aegypti* têm enfrentado muitos desafios que têm prejudicado o progresso nessa área. Entre eles, destaca-se a falta de infraestrutura nos países em desenvolvimento, o que tem dificultado a implementação de medidas efetivas de controle do mosquito (SCHULTE et al., 2021).

Outro obstáculo significativo é o desenvolvimento de resistência múltipla a inseticidas sintéticos amplamente utilizados, como organofosforados, piretróides e carbamatos. Essa resistência tem comprometido a eficácia dos produtos químicos tradicionais no combate ao *Aedes aegypti*, tornando essencial a busca por abordagens alternativas (MOYES et al., 2021).

Um dessas abordagens promissoras é a investigação de compostos alternativos, especialmente metabólitos secundários derivados de plantas. Esses compostos têm se mostrado como candidatos potenciais para o controle do vetor do mosquito, oferecendo uma abordagem mais sustentável e menos prejudicial ao meio ambiente e a outros organismos vivos (DE CARVALHO et al., 2019).

Diante desse cenário desafiador, é imperativo intensificar os estudos de pesquisa para identificar novas estratégias de combate ao *Aedes aegypti*, buscando soluções inovadoras e ecologicamente responsáveis. A colaboração entre instituições de pesquisa, autoridades de saúde e comunidades locais é essencial para enfrentar essa questão de saúde pública de forma efetiva e proteger a população contra doenças transmitidas por mosquitos. Com esforços definidos e investimentos em pesquisa, podemos esperar avanços flutuantes no controle do *Aedes aegypti* e no enfrentamento das doenças associadas a esse vetor (AUDOUZE; TABOUREAU; GRANDJEAN, 2018; SCHULTE et al., 2021).

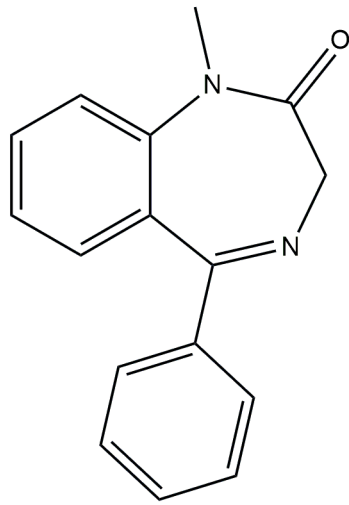
2.5 ATIVIDADE ANSIOLÍTICA

A ansiedade é um transtorno mental recorrente em pessoas com epilepsia, ocorrendo em 25% dos pacientes que apresentam essa comorbidade (FERREIRA et al., 2021). Os casos

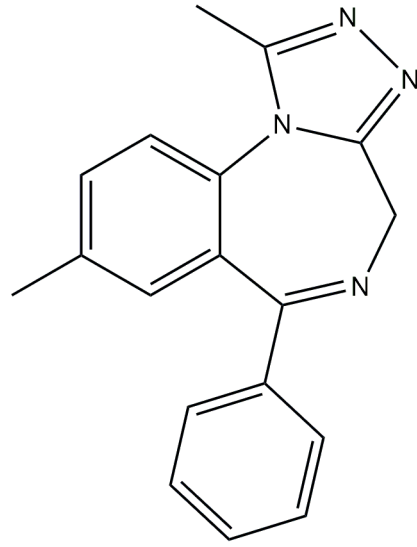
de epilepsia estão fortemente relacionados a transtornos de ansiedade (HE et al., 2015; MAHMOD et al., 2016; PACHER; KECSKEMETI, 2005; SALPEKAR et al., 2020). Para o desenvolvimento de drogas anticonvulsivantes, conhecido como rastreamento de drogas antiepilépticas (DAEs) é mais recentemente usadas O peixe-zebra como modelo de análise, pois oferece a possibilidade de modelar convulsões farmacológicas e genéticas em peixes durante os estágios larval e adulto (GAWEL et al., 2020; JAMES et al., 2018) e possui um repertório comportamental amplamente conservado, incluindo o comportamento ansiolítico (BLASER; ROSEMBERG, 2012). Estudos têm demonstrado que o modelo quimioconvulsivante pentilenotetrazol (PTZ) induz convulsões de forma dependente da concentração (GANDY et al., 2015; KANNER, 2016).

Os tratamentos para ansiedade frequentemente envolvem o uso de medicamentos, sendo os benzodiazepínicos uma classe comumente utilizada. Medicamentos como diazepam, alprazolam, clonazepam e lorazepam (Figura 7) atuam nos receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA) para produzir efeitos terapêuticos. principal neurotransmissor inibitório do cérebro, e se ligam aos receptores GABAA onde potencializam a ação inibitória do GABA (MAGALHÃES et al., 2017). No entanto, é importante ressaltar que os benzodiazepínicos também apresentam efeitos sedativos, hipnóticos e relaxantes musculares (SILVA MENDES et al., 2022).

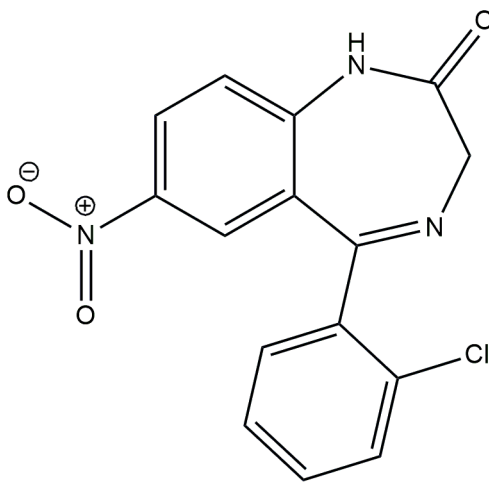
Figura 7 - Estrutura químicas de fármacos ansiolíticos.



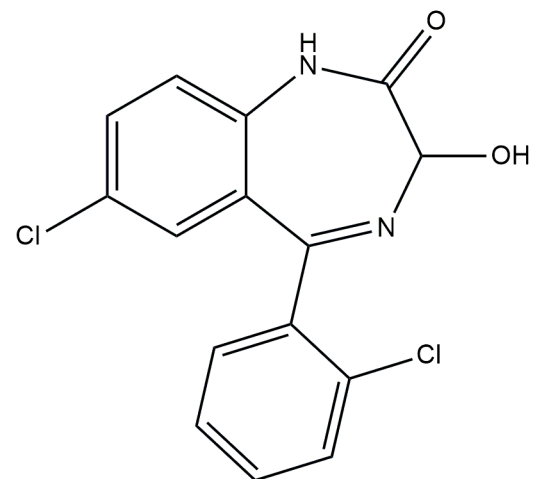
DIAZEPAM



ALPRAZOLAM



CLONAZEPAM



LORAZEPAM

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os benzodiazepínicos são conhecidos por sua capacidade de promover relaxamento, induzir sono e aliviar a tensão muscular. Essas propriedades podem ser benéficas no tratamento da ansiedade e das convulsões, pois ajudam a reduzir a hiperexcitabilidade neuronal associada a essas condições (BUXERAUD, 2019; SILVA MENDES et al., 2022).

No entanto, é necessário considerar os possíveis efeitos colaterais dos benzodiazepínicos, como sonolência excessiva, comprometimento cognitivo e dependência. O uso prolongado desses medicamentos também pode levar à tolerância, exigindo doses mais

altas para obter o mesmo efeito terapêutico (FERREIRA et al., 2020; NOWAKOWSKA, 2007).

Portanto, embora os benzodiazepínicos sejam eficazes no tratamento da ansiedade e das convulsões, é essencial monitorar seu uso cuidadosamente, ajustando as doses conforme necessário e considerando alternativas terapêuticas quando apropriado, a fim de minimizar os potenciais efeitos colaterais e promover uma abordagem de tratamento abrangente e individualizada (DA SILVA et al., 2021; FERREIRA et al., 2020).

Portanto, avanços recentes na descoberta e desenvolvimento de biomoléculas antiepilépticas e ansiolíticas (DA SILVA et al., 2021; SILVA MENDES et al., 2022) foram realizados com uma visão das relações estrutura-atividade por meio do docking molecular (JHA et al., 2020). Assim, novos tipos de drogas com potencial anticonvulsivante, ansiolítico e efeitos colaterais mínimos são de necessidade imediata.

Muitas drogas recentes utilizadas no tratamento da ansiedade apresentam anéis heterocíclicos em suas estruturas, como diazepam, lorazepam e clonazepam. Cerca de 62% das drogas para essa finalidade apresentam essa estrutura (SILVA MENDES et al., 2022). Como o mentol e seus derivados apresentaram muitas atividades farmacológicas relatadas na literatura, buscou-se estudar o efeito dessa droga frente a atividade ansiolítica, utilizando o zebrafish como modelo. Essas descobertas podem contribuir para o desenvolvimento de novas terapias anticonvulsivantes e ajudar a melhorar a qualidade de vida das pessoas que vivem com epilepsia.

Com o objetivo de compreender a relação entre o éster de mentol sintetizado e a modulação da atividade ansiolítica através da neurotransmissão GABAérgica, este estudo teve como foco investigar o impacto do MDODEC como ansiolítico. Para elucidar as possíveis interações diretas dessas moléculas com os receptores GABAA.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Sintetizar e caracterizar novos compostos bioativos através de via química convencional e via quimioenzimática, utilizando como substratos o mentol e a mentona, respectivamente.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Sintetizar ésteres do (-)-mentol;
- ✓ Sintetizar tiossemicarbazonas e hidrazonas derivados da mentona;
- ✓ Realizar testes de atividades biológicas de todos os derivados obtidos no presente trabalho: Larvicida, inibição da enzima acetilcolinesterase e ansiolítica.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 MÉTODO DE SEPARAÇÃO E ANÁLISES

As análises necessárias para obtenção dos espectros e cromatogramas, incluindo técnicas de cromatografia gasosa (CG-EM), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria na região do infravermelho foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

4.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Na cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada cromatoplaças de sílica gel (Kieselgel 60 F₂₅₄, 2-25 µm, Merck) com suporte de papel de alumínio. Os compostos foram detectados por exposição à luz ultravioleta nos comprimentos de onda em 254 e 365 nm em aparelho de marca Vilbert Loumart e por borrifação com solução de vanilina/ácido perclórico (HClO₄) 0,75 M/etanol seguido de aquecimento em soprador térmico por cerca de 1 minuto; As cromatografias em colunas utilizaram gel de sílica 60 Å (Vetec) para coluna *flash* e gel de sílica 60 (Vetec) com granulometria de 70-230 mesh para coluna gravitacional; A determinação dos tempos de retenção dos substratos e seus respectivos produtos foi efetuada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (CG/EM).

4.1.2 Cromatografia de Adsorção em Coluna (CC)

Os produtos reacionais, após extração, foram purificados em coluna cromatográfica utilizando como adsorvente gel de sílica 60 ($\Phi = 0,025-0,020\text{mm}$), código 45 337, de procedência VETEC. O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser purificada e de sílica utilizadas. Como eluente foram usados

hexano e acetato de etila de qualidade PA da marca Synth, puros ou em misturas binárias na proporção 9:1, respectivamente.

4.1.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) foram efetuadas em aparelho Shimadzu GC/MS, modelo QP2010SE Plus (Figura 8) usando coluna capilar Rtx®-5MS (95% dimetilpolisiloxano e 5% difenil) de 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1 µm de espessura do filme da fase fixa; as temperaturas do injetor e do detector foram 240 e 280 °C, respectivamente; condições da coluna: 60 °C para 80 °C a 5 °C min⁻¹, permanecendo por 3 minutos; então de 80 °C min⁻¹ até 280 °C a 30 °C min⁻¹ permanecendo nesta temperatura por 10 minutos, usando He como gás de arraste com vazão de 1,0 mL min⁻¹. A análise com o detector de massa foi no modo *scan* com tempo de análise em 23,67 min.; o registro dos espectros de massa foi na faixa de 35 a 500 Daltons por impacto de elétrons (EMIE) com energia de ionização de 70 eV (voltagem de 1,5 KV), analisador do tipo quadrupolo e fonte de íons a 240 °C.

Figura 8 - Fotografia do CG-EM modelo QP2010 da SHIMADZU.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.4 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H)

Outra técnica utilizada para determinação do teor de conversão das biotransformações realizadas foi a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os espectros de RMN ¹H foram obtidos no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Ceará (CENAUREMN/UFC), utilizando-se Espectrômetros da Bruker, modelo Avance DPX –300 e modelo Avance DRX-500, que operam na frequência de 300 e 500 MHz para hidrogênio, respectivamente. A dissolução das amostras analisadas foi realizada utilizando clorofórmio deuterado (CDCl₃) como solvente.

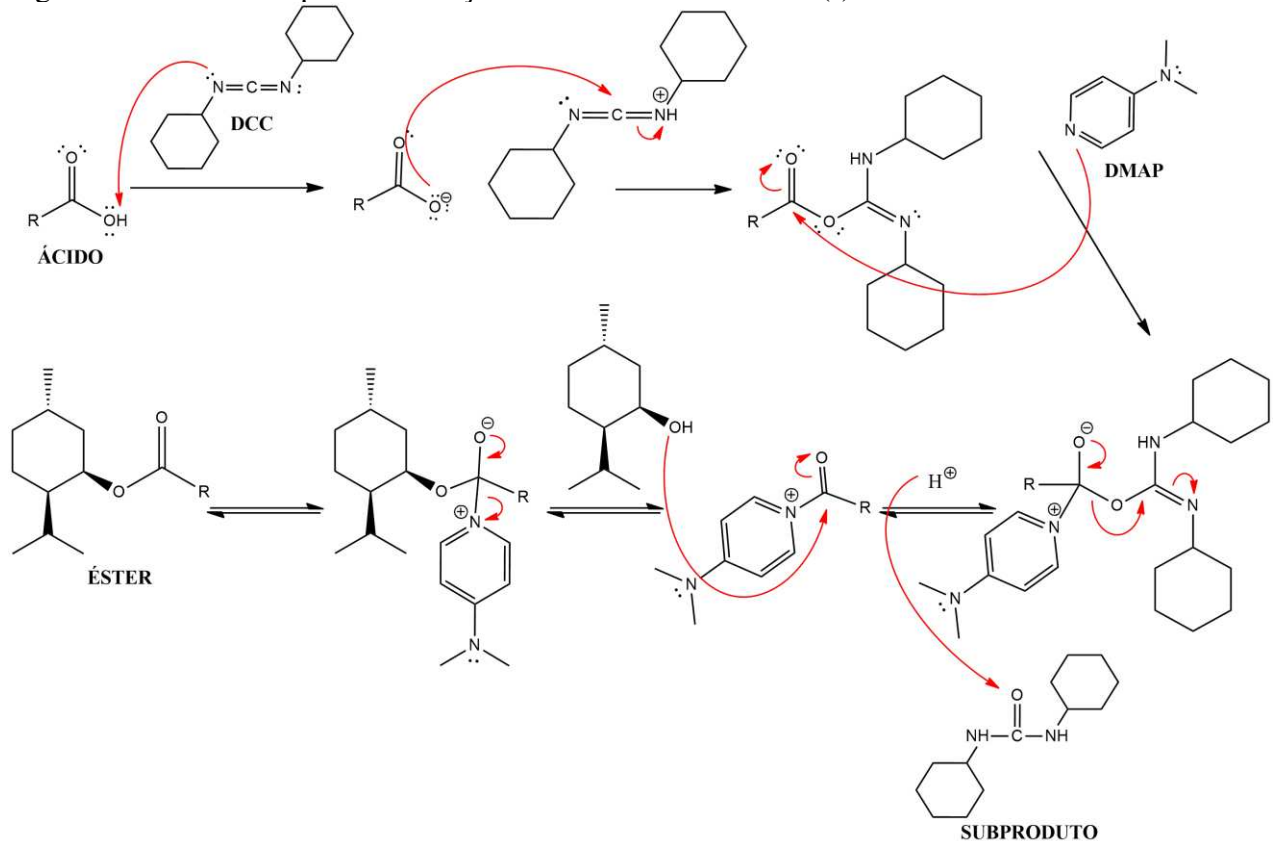
4.1.5 Espectroscopia de Infravermelho (IV)

A espectrometria na região do infravermelho (IV) foi utilizada para caracterização dos alcoóis e acetatos obtidos por via química. Os espectros de IV foram obtidos utilizando espectrômetro Perkin Elmer, modelo (SPECTRUM 100) FT-IR. Nas análises foi utilizado filme de KBr para substâncias líquidas e solúveis em clorofórmio.

4.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS DO MENTOL

A síntese dos derivados ocorre via reação de Steglich, como apresentado:

Figura 9 - Mecanismo para a formação de ésteres derivados do (-)-mentol

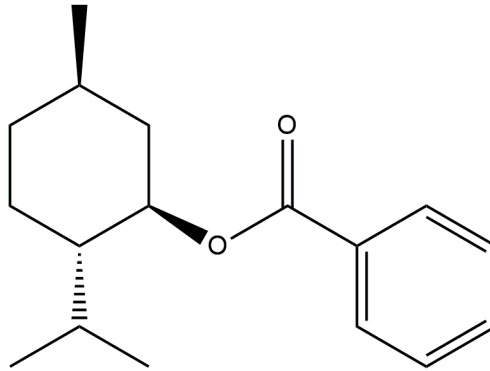


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.1 Benzoato de mentila (MBENZ)

3 mmol (366 mg) de ácido benzóico foi dissolvido em 10 mL de diclorometano, juntamente com 3 mmol de DCC (618 mg) e quantidade catalítica de DMAP, sob agitação e a temperatura ambiente. Após 30 minutos, foi adicionado 1,5 mmol (234 mg) de mentol. A reação ocorreu por 24 horas. Após esse período foi realizada a CCD da reação, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 90:10, onde foi constatado a formação do produto com coloração azulada. Em seguida, a mistura reacional foi filtrada a vácuo e posteriormente realizada uma extração reativa utilizando solução de bicarbonato de sódio 5% (m/v)(3x10mL), seguido por solução de ácido clorídrico 5% (v/v) (3x10mL) e água destilada (3x10mL). Logo após, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

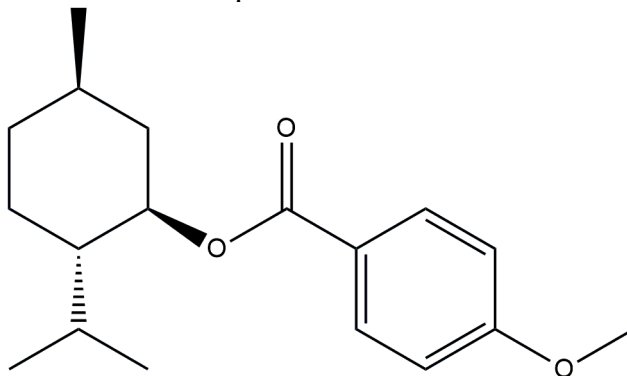
Figura 10 - Estrutura química do MBENZ



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2 4-metóxi-benzoato de mentila (MBENZ 4-OCH₃)

3 mmol (457 mg) de ácido 4-metóxi-benzóico foi dissolvido em 10 mL de diclorometano, juntamente com 3 mmol de DCC (618 mg) e quantidade catalítica de DMAP, sob agitação e a temperatura ambiente. Após 30 minutos, foi adicionado 1,5 mmol (234 mg) de mentol. A reação ocorreu por 24 horas. Após esse período foi realizada a CCD da reação, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 90:10, onde foi constatado a formação do produto com coloração azulada. Em seguida, a mistura reacional foi filtrada a vácuo e posteriormente realizada uma extração reativa utilizando solução de bicarbonato de sódio 5% (m/v)(3x10mL), seguido por solução de ácido clorídrico 5% (v/v) (3x10mL) e água destilada (3x10mL). Logo após, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

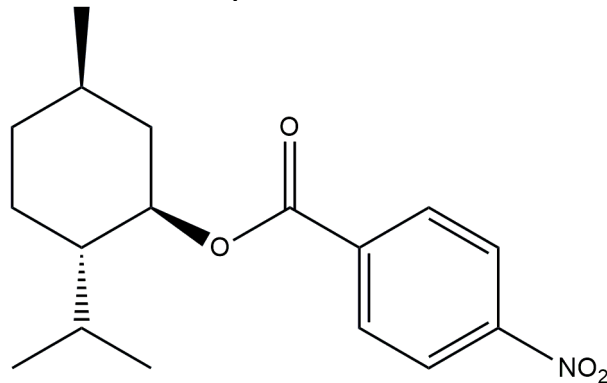
Figura 11 – Estrutura química do MBENZ 4-OCH₃

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.3 4-nitro-benzoato de mentila (MBENZ 4-NO₂)

3 mmol (501 mg) de ácido 4-nitro-benzóico foi dissolvido em 10 mL de diclorometano, juntamente com 3 mmol de DCC (618 mg) e quantidade catalítica de DMAP, sob agitação e a temperatura ambiente. Após 30 minutos, foi adicionado 1,5 mmol (234 mg) de mentol. A reação ocorreu por 24 horas. Após esse período foi realizada a CCD da reação, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 90:10, onde foi constatado a formação do produto com coloração azulada. Em seguida, a mistura reacional foi filtrada a vácuo e posteriormente realizada uma extração reativa utilizando solução de bicarbonato de sódio 5% (m/v)(3x10mL), seguido por solução de ácido clorídrico 5% (v/v) (3x10mL) e água destilada (3x10mL). Logo após, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Figura 12 - Estrutura química do MBENZ 4-NO₂



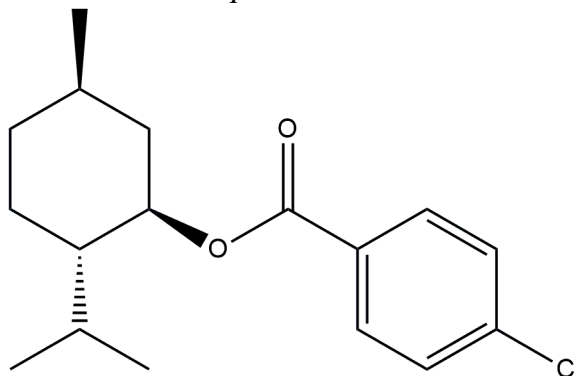
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.4 4-cloro-benzoato de mentila (MBENZ 4-Cl)

3 mmol (470 mg) de ácido 4-cloro-benzóico foi dissolvido em 10 mL de diclorometano, juntamente com 3 mmol de DCC (618 mg) e quantidade catalítica de DMAP, sob agitação e a temperatura ambiente. Após 30 minutos, foi adicionado 1,5 mmol (234 mg) de mentol. A reação ocorreu por 24 horas. Após esse período foi realizada a CCD da reação, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 90:10, onde foi

constatado a formação do produto com coloração azulada. Em seguida, a mistura reacional foi filtrada a vácuo e posteriormente realizada uma extração reativa utilizando solução de bicarbonato de sódio 5% (m/v)(3x10mL), seguido por solução de ácido clorídrico 5% (v/v) (3x10mL) e água destilada (3x10mL). Logo após, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Figura 13 - Estrutura química do MBENZ 4-Cl

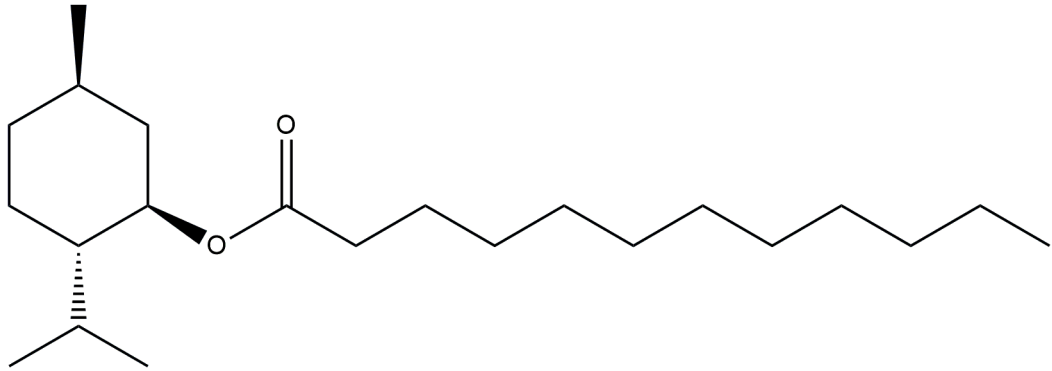


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.5 Dodecanoato de mentila (MDODEC)

3 mmol (601 mg) de ácido dodecanóico foi dissolvido em 10 mL de diclorometano, juntamente com 3 mmol de DCC (618 mg) e quantidade catalítica de DMAP, sob agitação e a temperatura ambiente. Após 30 minutos, foi adicionado 1,5 mmol (234 mg) de mentol. A reação ocorreu por 24 horas. Após esse período foi realizada a CCD da reação, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 90:10, onde foi constatado a formação do produto com coloração azulada. Em seguida, a mistura reacional foi filtrada a vácuo e posteriormente realizada uma extração reativa utilizando solução de bicarbonato de sódio 5% (m/v)(3x10mL), seguido por solução de ácido clorídrico 5% (v/v) (3x10mL) e água destilada (3x10mL). Logo após, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Figura 14 - Estrutura química do MDODEC

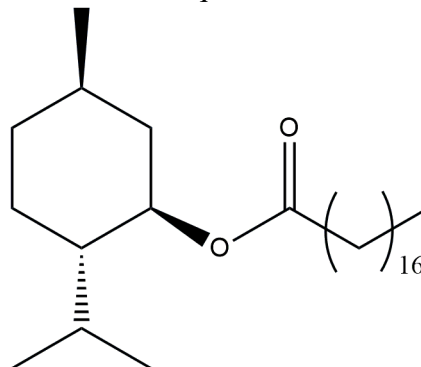


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.6 Octadecanoato de mentila (MEST)

3 mmol (854 mg) de ácido octadecanóico (ácido esteárico) foi dissolvido em 10 mL de diclorometano, juntamente com 3 mmol de DCC (618 mg) e quantidade catalítica de DMAP, sob agitação e a temperatura ambiente. Após 30 minutos, foi adicionado 1,5 mmol (234 mg) de mentol. A reação ocorreu por 24 horas. Após esse período foi realizada a CCD da reação, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 90:10, onde foi constatado a formação do produto com coloração azulada. Em seguida, a mistura reacional foi filtrada a vácuo e posteriormente realizada uma extração reativa utilizando solução de bicarbonato de sódio 5% (m/v)(3x10mL), seguido por solução de ácido clorídrico 5% (v/v) (3x10mL) e água destilada (3x10mL). Logo após, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Figura 15 - Estrutura química do MEST

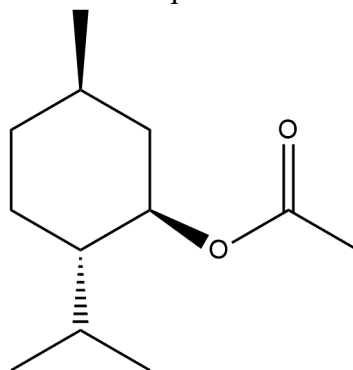


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.7 Acetato de mentila (MAC)

6 mmol (570 μ L) de anidrido acético foi dissolvido em 10 mL de diclorometano, juntamente com 2 mmol de trietilamina (Et_3N) (280 μ L) e quantidade catalítica de DMAP, sob agitação e a temperatura ambiente. Após 30 minutos, foi adicionado 2 mmol (312 mg) de mentol. A reação ocorreu por 24 horas. Após esse período foi realizada a CCD da reação, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 90:10, onde foi constatado a formação do produto com coloração azulada. Foi evaporado o solvente da reação sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Figura 16 - Estrutura química do MAC



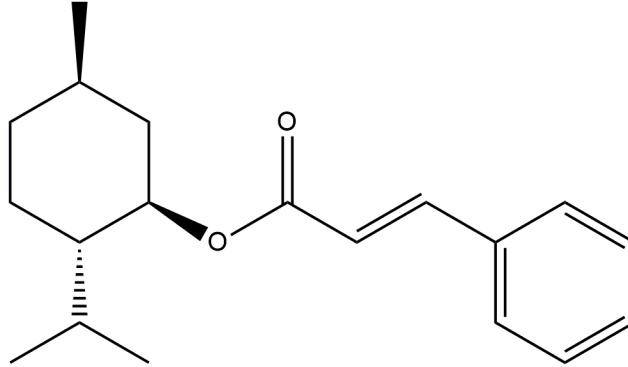
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.8 Cinamato de mentila (MCINAM)

3 mmol (444 mg) de ácido 4-metóxi-trans-cinâmico foi dissolvido em 10 mL de diclorometano, juntamente com 3 mmol de DCC (618 mg) e quantidade catalítica de DMAP, sob agitação e a temperatura ambiente. Após 30 minutos, foi adicionado 1,5 mmol (234 mg) de mentol. A reação ocorreu por 24 horas. Após esse período foi realizada a CCD da reação, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 90:10, onde foi constatado a formação do produto com coloração azulada. Em seguida, a mistura reacional foi filtrada a vácuo e posteriormente realizada uma extração reativa utilizando solução de bicarbonato de sódio 5% (m/v)(3x10mL), seguido por solução de ácido clorídrico 5% (v/v)

(3x10mL) e água destilada (3x10mL). Logo após, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Figura 17 - Estrutura química do MCINAM

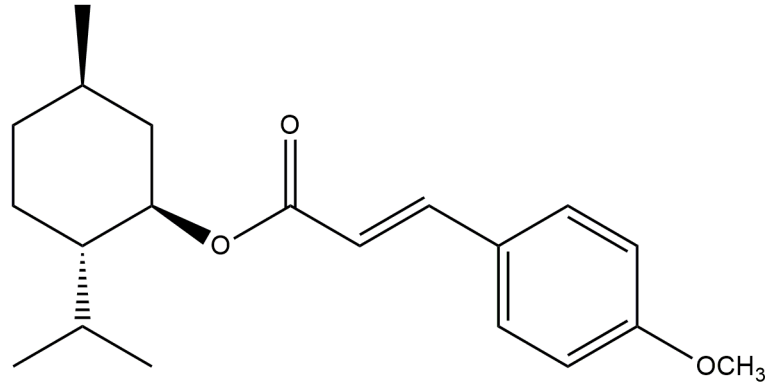


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.9 4-metóxi-cinamato de mentila (MCINAM 4-OCH₃)

3 mmol (534 mg) de ácido 4-metóxi-trans-cinâmico foi dissolvido em 10 mL de diclorometano, juntamente com 3 mmol de DCC (618 mg) e quantidade catalítica de DMAP, sob agitação e a temperatura ambiente. Após 30 minutos, foi adicionado 1,5 mmol (234 mg) de mentol. A reação ocorreu por 24 horas. Após esse período foi realizada a CCD da reação, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 90:10, onde foi constatado a formação do produto com coloração azulada. Em seguida, a mistura reacional foi filtrada a vácuo e posteriormente realizada uma extração reativa utilizando solução de bicarbonato de sódio 5% (m/v)(3x10mL), seguido por solução de ácido clorídrico 5% (v/v) (3x10mL) e água destilada (3x10mL). Logo após, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Figura 18 - Estrutura química do MCINAM 4-OCH₃

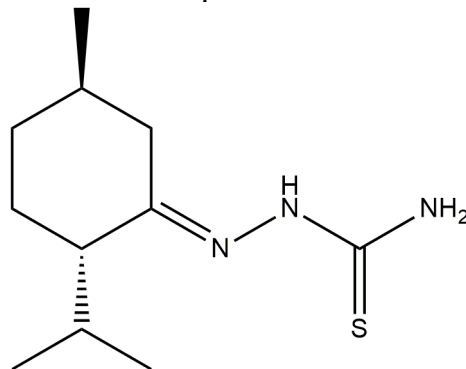


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.10 (E) -2-((2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) hidrazinacarbotoamida (MENTIO)

1 mmol (154 mg/173 μ L) de mentona foi dissolvido em 5 mL de metanol e gotas de ácido acético, sob agitação e a temperatura ambiente. Após 30 minutos, foi adicionado 2 mmol (182 mg) de tiossemicarbazida. A reação ocorreu por 24 horas. Após esse período foi realizada a CCD da reação, utilizando como eluente diclorometano, onde foi constatado a formação do produto com coloração amarela. Em seguida, a mistura reacional foi purificada por coluna cromatográfica com sílica. Logo após, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Figura 19 - Estrutura química do MENTIO

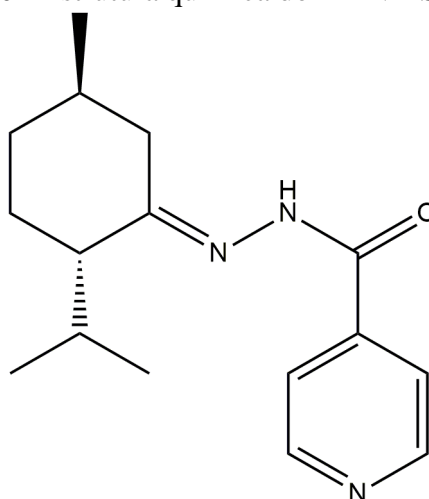


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.11 (E)-N'-((2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) benzo-hidrazida (MENTISO)

1 mmol (154 mg/173 μ L) de mentona foi dissolvido em 5 mL de metanol e gotas de ácido acético, sob agitação e a temperatura ambiente. Após 30 minutos, foi adicionado 2 mmol (274 mg) de isoniazida. A reação ocorreu por 24 horas. Após esse período foi realizada a CCD da reação, utilizando como eluente diclorometano, onde foi constatado a formação do produto com coloração amarela. Em seguida, a mistura reacional foi purificada por coluna cromatográfica com sílica. Logo após, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Figura 20 - Estrutura química do MENTISO



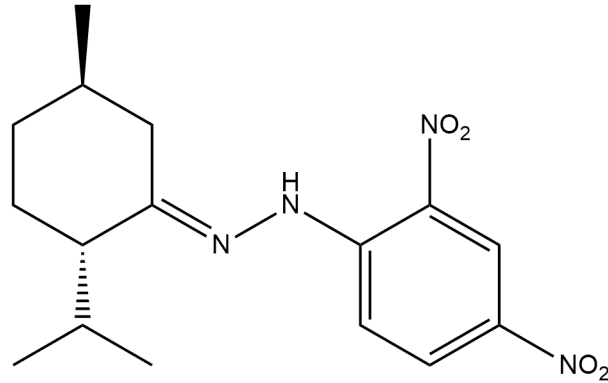
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.12 (E)-1-(2,4-dinitrofenil)-2-((2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) hidrazina (MHID 2,4-DINITRO)

1 mmol (154 mg/173 μ L) de mentona foi dissolvido em 5 mL de metanol e gotas de ácido acético, sob agitação e a temperatura ambiente. Após 30 minutos, foi adicionado 2 mmol (396 mg) de 2,4-dinitrofenil-hidrazina. A reação ocorreu por 24 horas. Após esse

período foi realizada a CCD da reação, utilizando como eluente diclorometano, onde foi constatado a formação do produto com coloração vermelha. Em seguida, a mistura reacional foi particionada com água, filtrada a vácuo e posteriormente realizada coluna cromatográfica com sílica. Logo após, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Figura 21 - Estrutura química do MHID 2,4-DINITRO



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 ENSAIOS DA ATIVIDADE LARVICIDA

Os ensaios de atividade larvicida foram realizados no Núcleo de Controle de Vetores e Endemias (NUVET), Órgão da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Para avaliar a atividade dos derivados do (-)-mentol e (-)-mentona, bioensaios de dose - resposta foram realizados, em triplicata, no intervalo de concentrações (2, 4, 10, 20, 40, 100) ppm a fim de se estabelecer as concentrações letais necessárias para causar mortalidade à metade das larvas expostas aos bioprodutos (CL50).

Inicialmente soluções estoques de cada bioproducto foram preparadas utilizando 20 mg solubilizados em 10 mL de DMSO e a quantidade desejada para cada concentração foi obtida destas soluções com auxílio de uma pipeta analítica e então solubilizadas em DMSO (dimetilsufóxido) até volume final de 0,5 mL. Cada amostra foi transferida para copos descartáveis de 100 mL, completando com 49,5 mL de água destilada totalizando o volume de 50 mL.

Em cada copo adicionou-se 30 larvas do 3º estágio de *Aedes aegypti* (cepa Rockefeller) eclodidas em água potável em temperatura entre 25 – 27 °C e umidade entre 50 - 70%. Trinta larvas de terceiro estágio foram transferidas para um copo de 50 mL contendo 19,7 mL de água. Antes de inserir os larvicidas na água, eles foram diluídos em 0,3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em concentrações de 4, 10, 20, 40 e 100 ppm. Um controle usando 1,5% de DMSO / H₂O foi testado em paralelo. A mortalidade foi registrada após 24 horas e o número de larvas mortas foi utilizado para calcular a concentração letal mediana (CL₅₀). Ambos os compostos organotiofosfatos exibiram atividade larvicida promissora. Foram realizadas triplicatas para compostos com efeito larvicida. O valor de CL₅₀ foi determinado usando o software de análise estatística BioStat 2009.

4.4 ATIVIDADE ANSIOLÍTICA

4.4.1 Materiais

Os reagentes e farmacos utilizados foram acetato de etila e n-hexano (Vetec Quimica®), Diazepam (DZP) (Neo Quimica®), Flumazenil (Sandoz®) e Dimetilsulfoxido (DMSO) (Dynamic®). Zebrafish adulto (*Danio rerio*) (60-90 dias de idade, peso de 0,4 ± 0,1 g e comprimento de 3,5 ± 0,5 cm), selvagens e de ambos os sexos, foram obtidos da Bio Pet Comercio de Produtos Veterinários LTDA (Fortaleza, Brasil).

4.4.2 Ensaios da atividade ansiolítica

Os peixes foram mantidos em um aquario de vidro (10 L, 30 cm x 15 cm x 20 cm) contendo água desclorada ProtecPlusR em pH 7,0, filtros submersos e uma bomba de ar. A temperatura foi mantida em 25 °C e o ciclo circadiano foi fixado em 14:10 horas claro/escuro. A alimentacao foi oferecida, a vontade, 24 horas após o experimento. Após os experimentos,

os peixes foram sacrificados por imersão em água gelada (2-4 °C) por 10 min. até a perda dos movimentos operculares.

Os testes com o zebrafish foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais da UECE - Campus Itaperi, coordenado pela Profa. Dra. Jane Eire Silva Alencar de Menezes. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE número 04983945/2021).

4.4.3 Teste de campo aberto

Os animais (n = 6/grupo) foram tratados intraperitonealmente (*i.p.*) com 20 µL dos derivados sintetizados nas doses de 4, 20 e 40 mg/Kg, veículo DMSO (3%) e DZP (40 mg/Kg). Em seguida, foram submetidos ao teste de campo aberto para avaliar alterações na coordenação motora, seja por sedação e/ou relaxamento muscular (MAGALHAES *et al.*, 2017). Após 30 minutos de tratamento, os peixes foram colocados individualmente em placas de Petri, contendo a mesma água do aquário e divididas em quatro quadrantes. A atividade locomotora foi analisada contando o número de cruzamentos de linha durante 5 minutos. Os animais que não receberam tratamentos (Naive) foram considerados como linha de base (100% de atividade locomotora).

4.4.4 Teste claro/escuro

O teste claro/escuro foi realizado para investigar o comportamento ansiolítico dos compostos (Figura 35). O estudo foi baseado na metodologia proposta por GEBAUER *et al.* (2011). Os animais (n = 6/grupo) foram tratados intraperitonealmente (*i.p.*) com 20 µL dos derivados sintetizados a 4, 20 e 40 mg/Kg, veículo DMSO (3%) e DZP (40 mg/kg). Um aquário de vidro (30x15x20 cm) foi dividido em duas zonas, clara e escura, e preenchido com água da torneira (pré-tratada com anticloro) até atingir 3 cm de altura. Após 30 minutos de tratamento, os peixes foram colocados individualmente na zona clara e o comportamento

ansiolítico foi observado através do tempo de permanência na zona clara durante 5 minutos. Um grupo não tratado (Naive) foi avaliado.

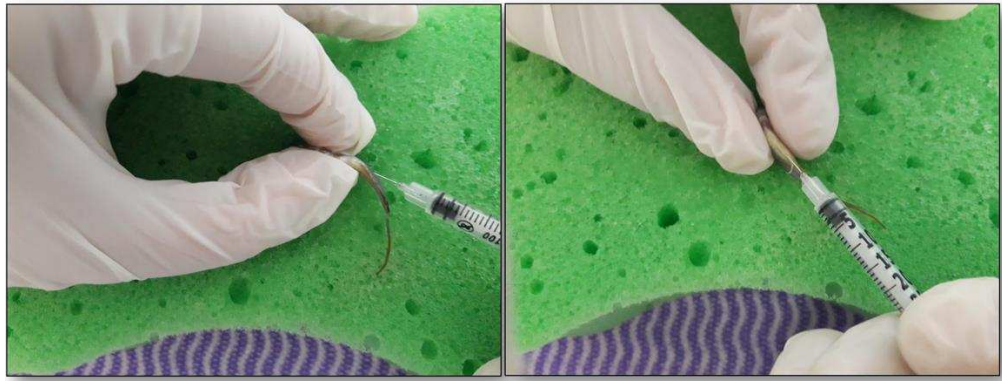
4.4.5 Participação do sistema GABAérgico

A participação do sistema GABAérgico foi avaliada através do teste claro/escuro, conforme metodologia proposta por BENNEH *et al.* (2017). Inicialmente, os animais (n = 6/grupo) foram tratados *i.p.* com flumazenil (4mg/Kg; 20 µL), um antagonista do GABA. Após 15 min, os peixes foram tratados *i.p.* com os derivados sintetizados, na dose efetiva mais baixa (4 mg/Kg, 20 µL) e DZP (4 mg/Kg; 20 µL). Como grupo controle, outros peixes (n = 6/grupo) foram tratados *i.p.* com DMSO (3%; 20 µL), e um grupo não tratado (Naive) foi incluído. Após 30 minutos de tratamento, os animais foram adicionados individualmente a zona clara do aquário. O efeito ansiolítico foi quantificado como a porcentagem de permanência na zona clara (%PZC) durante 5 minutos.

4.5 TOXICIDADE AGUDA (96 HORAS)

O teste de toxicidade aguda (CL₅₀-96h) foi realizado de acordo com as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) (ARELLANO-AGUIAR *et al.*, 2015; AMALI *et al.*, 2019). Os animais (n = 6/grupo) foram tratados intraperitonealmente (*i.p.*) (Figura 22) com os compostos derivados sintetizados (20 µL) nas doses 4, 20 e 40 mg/Kg. DMSO 3% foi usado como controle negativo (20 µL; *i.p.*). A mortalidade, em cada concentração, foi registrada após 24, 48, 72 e 96 horas. O número de peixes mortos foi submetido a análise estatística, estimando-se a dose letal para matar 50% (CL₅₀) pelo método Trimmed Spearman-Kärber com intervalos de confiança de 95%. Os tratamentos via intraperitoneal (*i.p.*) foram realizados com seringas de insulina (0,5 mL; UltraFine® BD) com agulha de calibre 30G.

Figura 22 - Injeção, via intraperitoneal (i.p.), das amostras no zebrafish.



Fonte: Proprio autor.

4.6 ENSAIO PARA INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

Este ensaio é baseado no procedimento descrito por Ellman *et al.* (1961), adaptado para CCD por Rhee *et al.* (2001). É considerado um método colorimétrico e que pode ser utilizado de forma qualitativa e quantitativa, mas nesse trabalho foi utilizada somente a forma qualitativa. É um método rápido e sensível para a seleção de amostras com ação anticolinesterásica. A metodologia consiste em retirar uma alíquota de 5 μ l do óleo essencial na concentração 10 mg/mL e 1mg/mL para compostos puro e aplicar em uma cromatoplaça (DC-Alufolien, Silicagel 60 F254, 0,2 mm Merck). Após a completa evaporação do solvente, foi borrifado uma mistura (1:1) de iodeto de acetilcolina (ATCI) 1mmol.L-1 com o reagente de Ellman (ácido 5,5' – Ditiobis- (2 –nitrobenzóico, DTNB, 1 mmol.L-1), deixando em repouso por 3 minutos para a secagem da placa. Em seguida foi borrifado a enzima acetilcolinesterase (3 U/ml). Após 10 minutos, ocorre o surgimento de uma coloração amarela, porém, onde há inibição da enzima, observa-se a formação de um halo branco em torno dos “spots” onde foram aplicadas as amostras. Em 20-30 minutos a coloração desaparece. Como controle positivo, foi utilizada a solução do padrão de sal Eserina 1mg/mL. Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia da UFC - Campus do Pici, coordenado pela Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

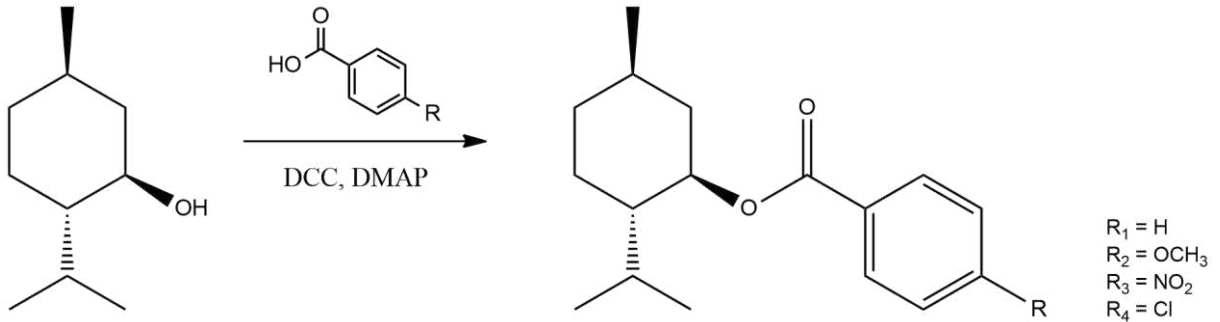
5.1 PARTE 1: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS

Inicialmente o trabalho foi direcionado para a obtenção dos derivados do (-)-mentol (ésteres) efetuando transformações químicas em reações com ácidos carboxílicos aromáticos e graxos, em presença de dicitloexilcarboimida (DCC) e dimetilaminopiridina (DMAP). Depois, foi obtido o éster do mentol por reação com o anidrido acético, porém, sob ação de trietilamina (Et_3N) e dimetilaminopiridina (DMAP). A seguir, prosseguiu com a obtenção de tiosemicarbonas e de hidrazonas em reações com tiosemicarbazidas e com hidrazinas, respectivamente, também, em presença de DCC e de DMAP. Finalmente, foi obtido o álcool [(-)-mentol] a partir da mentona em reação enzimática, utilizando as sementes de mostarda (*Sinapis alba* L.) como catalisador vegetal na forma integral. Todos os derivados foram avaliados com relação ao potencial larvicida frente ao mosquito da dengue (*A. aegypti*).

5.1.1 Síntese dos derivados do (-)-mentol

A obtenção dos ésteres derivados do mentol, em primeira mão, foi realizada por reações com ácidos carboxílicos aromáticos (benzóico, 4-metóxi-benzóico, 4-cloro-benzóico e 4-nitro-benzóico) em presença de DCC/DMAP, utilizando o CH_2Cl_2 como solvente (Esquema 2).

Esquema 2 - Esquema reacional dos ésteres derivados do (-)-mentol através de esterificação com ácidos carboxílicos aromáticos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

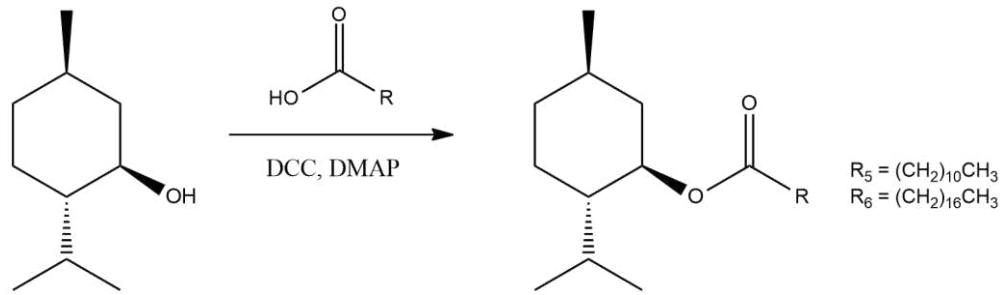
Observando os resultados da Tabela 1 e tendo como base o ác. benzóico, pode-se dizer que, os rendimentos são consistentes com os grupos substituintes na posição *para*, pois, foi menor (65%) com o grupo 4-OMe (doador de elétrons) e maior (79%) com o grupo 4-NO₂ (retirador de elétrons), ou seja, desativando e ativando, respectivamente, o respectivo ácido para reações de substituição nucleofílica.

Tabela 1 - Rendimento das reações de esterificação do mentol com ácidos carboxílicos aromáticos.

Ácidos	Rendimento	SIGLA
1. Ácido benzóico	68	MBENZ
2. Ácido 4-metóxi-benzóico	65	MBENZ 4-OCH₃
3. Ácido 4-nitro-benzóico	79	MBENZ 4-NO₂
4. Ácido 4-cloro-benzóico	70	MBENZ 4-Cl

A seguir, foram obtidos dois derivados com ácidos graxos (ácidos dodecanóico e esteárico) também, em presença de DC e DMAP (Esquema 3), com rendimentos (Tabela 2) um pouco menor que com os ácidos aromáticos. O rendimento em cada caso, considerando apenas estes dois, foi menor com o ácido de maior cadeia (DA SILVA et al., 2017).

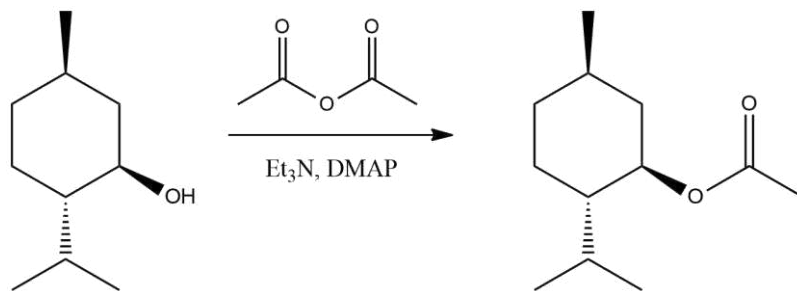
Esquema 3 - Esquema reacional dos ésteres derivados do (-)-mentol através de esterificação com ácidos carboxílicos de cadeia aberta.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Um outro éster foi conseguido pela reação do mentol com o anidrido acético usando como reagentes catalisadores Et_3N (triethylamina) e DMAP (Esquema 4). Neste caso, devido a maior reatividade do anidrido, como também, sua menor cadeia alifática, o rendimento de reação (82%) foi, relativamente, bem maior (Tabela 2).

Esquema 4 - Esquema reacional do éster derivado do (-)-mentol através de esterificação com anidrido acético.



Fonte: Elaborado pelo autor.

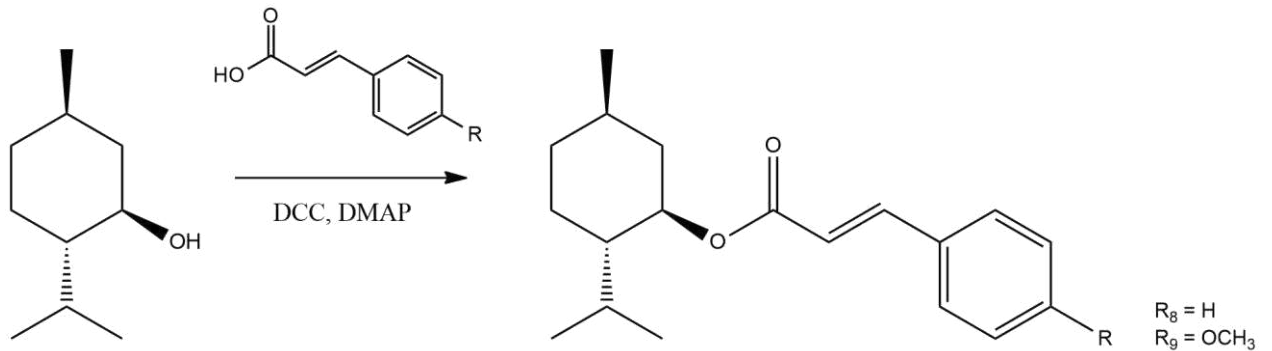
Tabela 2 - Rendimento das reações de esterificação do mentol com ácidos carboxílicos de cadeia aberta.

Ácidos/Anidrido	Rendimento	SIGLA
5. Ácido dodecanóico	60	MDODEC
6. Ácido esteárico	54	MEST
7. Anidrido acético	82	MAC

Empregando a mesma estratégia utilizada para as esterificações com os ácidos carboxílicos citados acima, mais dois ésteres foram preparados por reação com os ácidos cinâmico e *para*-metoxicinâmico (Esquema 5), uma metodologia diferente daquela usada por

Singh (SINGH et al., 2012) na elaboração de ésteres do ácido cinâmico. O rendimento nas reações foi baixo (Tabela 3), o que seria justificado pela forte conjugação nas estruturas dos ácidos, sobretudo no *para* substituído pelo grupo metoxila (doador de elétrons). A determinação da atividade antimicrobiana revelou a importância da insaturação no sistema conjugado.

Esquema 5 - Esquema reacional dos ésteres derivados do (-)-mentol através de esterificação com ácidos carboxílicos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 - Rendimento das reações de esterificação do mentol com ácido cinâmico e 4-metóxi-cinâmico.

Ácidos	Rendimento	SIGLA
8. Ácido cinâmico	53	MCINAM
9. Ácido 4-metóxi-cinâmico	45	MCINAM 4-OCH ₃

Fonte: o próprio autor.

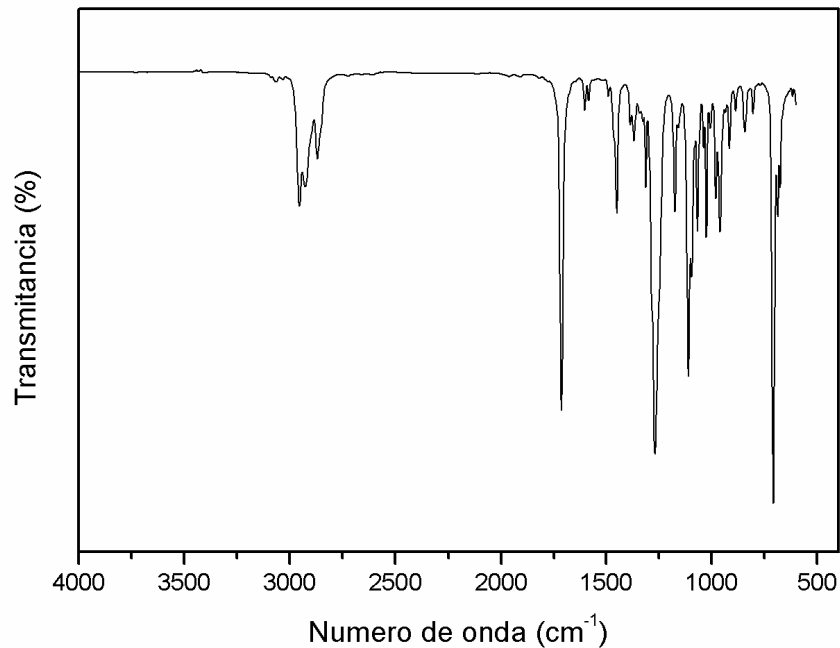
5.1.2 Caracterização dos derivados do (-)-mentol

A caracterização e pureza dos compostos produzidos foram verificadas através de espectroscopia no infravermelho (IR), cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG-EM) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H).

5.1.2.1 Caracterização do benzoato de mentila (MBENZ).

O espectro na região do infravermelho (Figura 23) da substância 1 (benzoato de mentila) mostrou como destaques, as bandas intensas em 1742 e 1250 cm^{-1} , características de éster (estiramentos C=O e C-O, respectivamente).

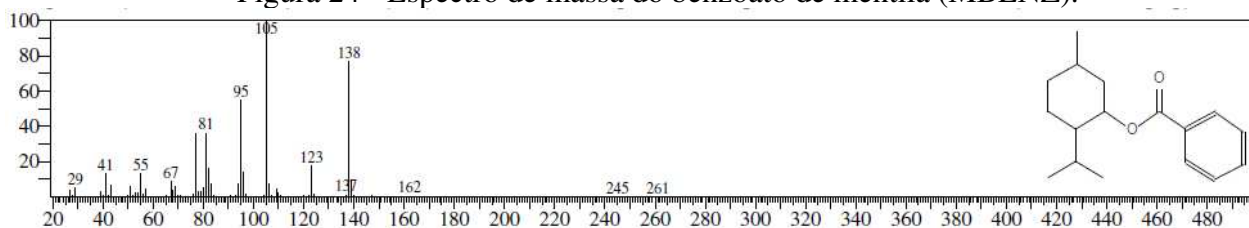
Figura 23 - Espectro de infravermelho do benzoato de mentila (MBENZ).



Fonte: o próprio autor.

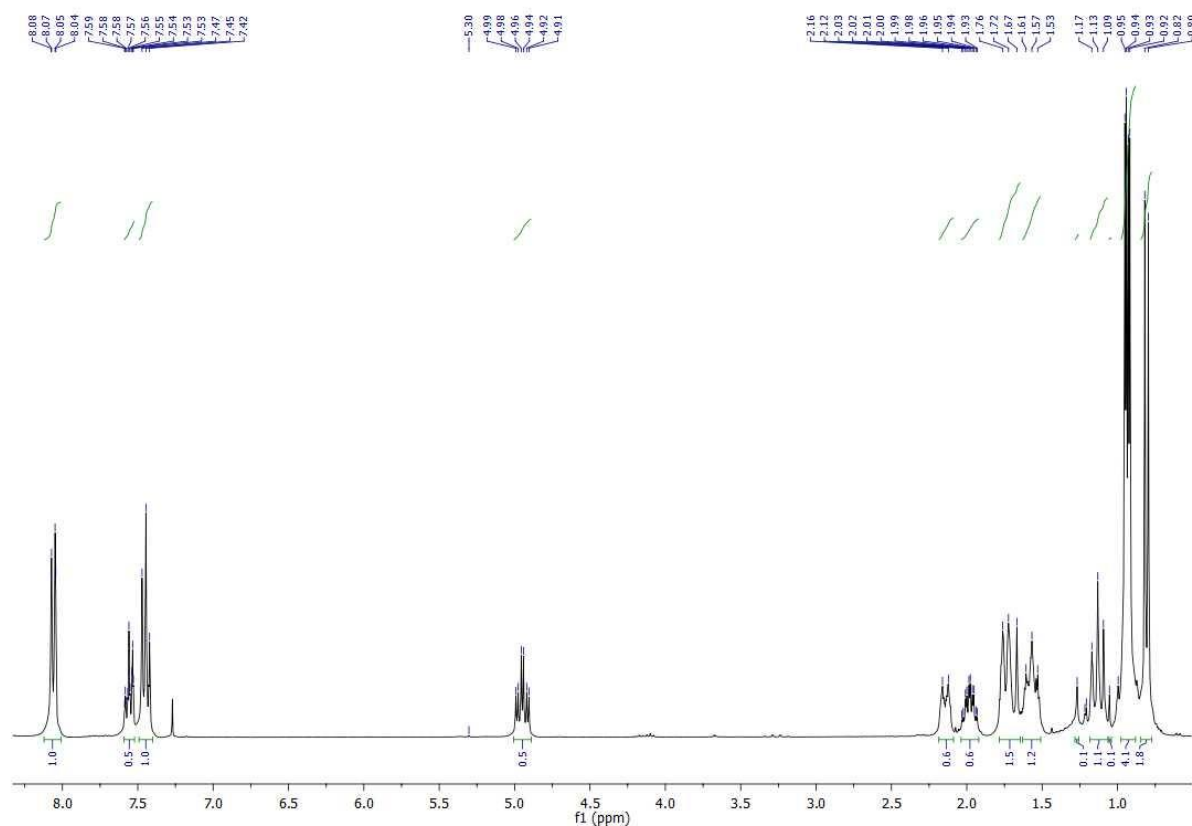
No espectro de massa (Figura 24) do derivado não foi registrado o pico do íon molecular ($[M^+ 260]$), porém, são observados picos importantes que identificam íons resultando de fragmentações clássicas. Assim, o pico em m/z 138 (85%) pode ser explicado por um rearranjo de McLafferty vindo do íon molecular (m/z 260 – $C_7H_6O_2$) e o pico em m/z 105 (100%) resultando de uma fragmentação alfa a partir do íon molecular.

Figura 24 - Espectro de massa do benzoato de mentila (MBENZ).



Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ^1H (Figura 25) exibiu os sinais esperados, com destaque para: dupletos em δ_{H} 0,81 (6,0 Hz, 3H, CH_3), dupletos em δ_{H} 0,94 [6,0 Hz, 6H, $(\text{CH}_3)_2$], triplos de dupletos em δ_{H} 4,95 (9,0 e 3,0 Hz, 1H, HC-O), todos devidos a parte alifática do composto (os demais hidrogênios do anel mentila, originaram os multipletos compreendidos entre 1,00 e 2,35 ppm); dupletos em δ_{H} 8,06 (9,0 Hz, 2H *orto* a C=O), triplos em δ_{H} 7,58 (9,0 Hz, 1H *para* C=O) e triplos em δ_{H} 7,53 (9,0 Hz, 2H *meta* a C=O), devidos hidrogênios do anel aromático conjugado à carbonila.

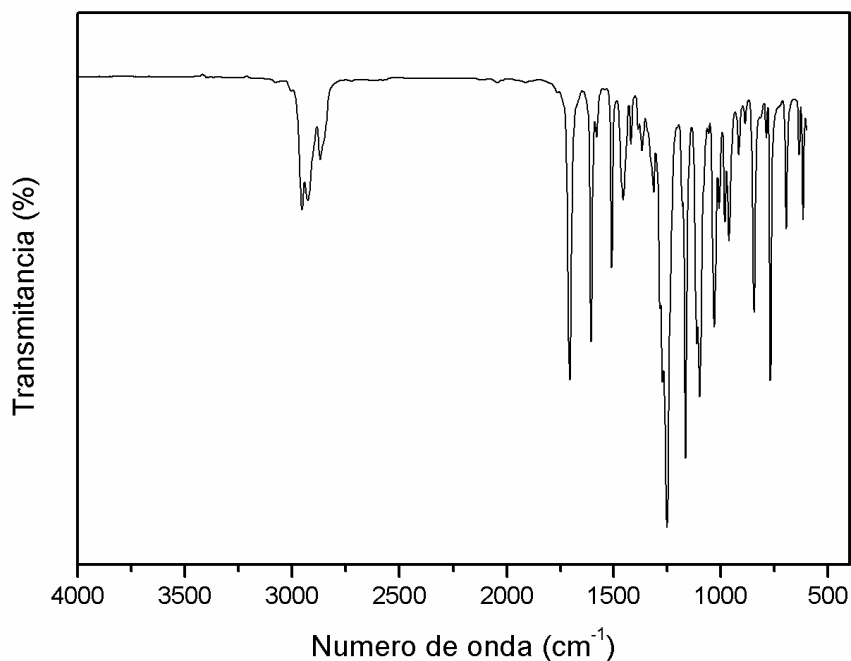
Figura 25 - Espectro de RMN ^1H do Benzoato de mentila (MBENZ).

Fonte: o próprio autor.

5.1.2.2 Caracterização do 4-metóxi benzoato de mentila (MBENZ 4-OCH₃)

O espectro no infravermelho (Figura 26) do 4-metóxi benzoato de mentila, além das bandas em 1742 e 1250 cm⁻¹, características de éster (estiramentos C=O e C-O, respectivamente), registrou as absorções em 1600, 1500 e 1450 cm⁻¹ próprias do sistema aromático (estiramentos das ligações C=C do anel).

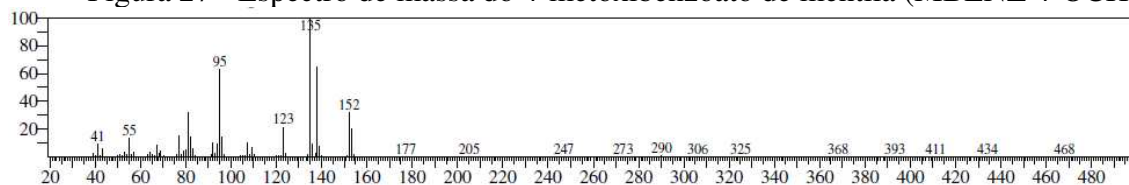
Figura 26 - Espectro de infravermelho do 4-metóxi benzoato de mentila (MBENZ 4-OCH₃).



Fonte: o próprio autor.

O espectro de massa (Figura 27) do derivado mostrou o pico do íon molecular ([M⁺ 290]) e picos importantes em m/z 152 (M-138), m/z 135 [C₈H₇O₂]⁺ e m/z 95 [C₇H₁₁]⁺.

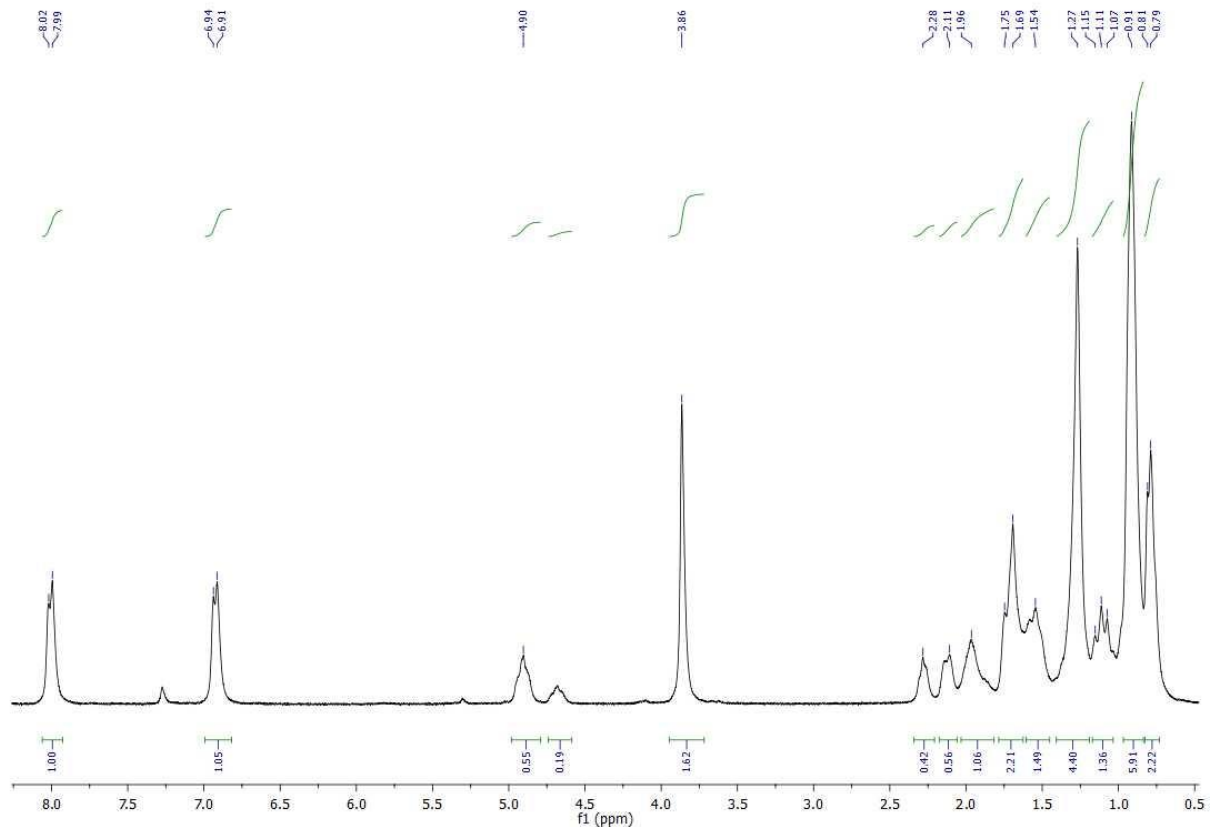
Figura 27 - Espectro de massa do 4-metóxi benzoato de mentila (MBENZ 4-OCH₃).



Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ^1H (Figura 28), por sua vez, em adição ao sinal do grupo metoxila (s, 3H, δ_{H} 3,86), mostrou os mesmos sinais observados para MBENZ, com relação a parte alifática: δ_{H} 0,80 (d, 6,0 Hz, 3H, CH_3), 0,91 (sl, 6H, $(\text{CH}_3)_2$), 3,86 (s, 3H, OCH_3), 4,91 (m, 1H, HC-O) (os demais hidrogênios do anel mentila, originaram os multipletos compreendidos entre 1,00 e 2,35 ppm); no tocante ao sistema aromático *p*-substituído, os dois sinais em δ_{H} 6,92 (d, 9,0 Hz, 2H *orto* a H_3CO) e 7,80 (d, 9,0 Hz, 2H *orto* a C=O).

Figura 28 - Espectro de RMN ^1H do 4-metóxi benzoato de mentila (MBENZ 4- OCH_3).

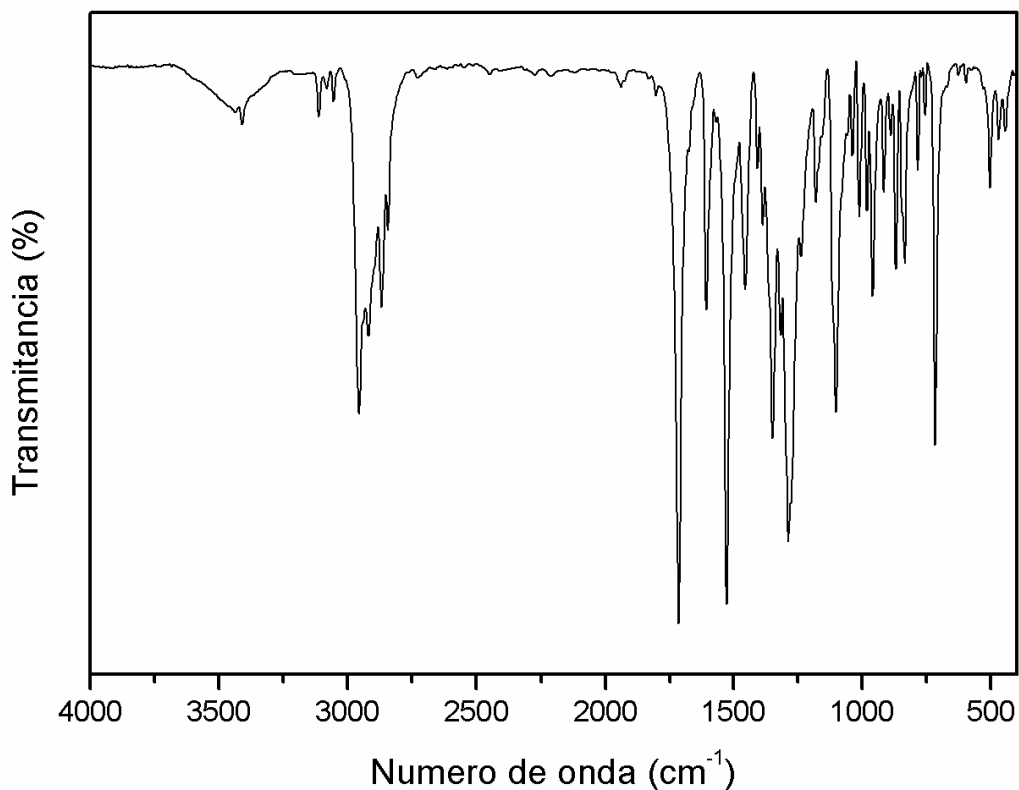


Fonte: o próprio autor.

5.1.2.3 Caracterização do 4-nitrobenzoato de mentila (MBENZ 4- NO_2)

O espectro no IV (Figura 29) do 4-nitrobenzoato de mentila (MBENZ 4- NO_2) exibiu, praticamente, o mesmo padrão que os espectros dos derivados anteriores. Assim, foram registradas como destaques as bandas em 1740 cm^{-1} (estiramento C=O), 1600 e 1500 cm^{-1} (estiramento C=C do anel aromático) e 1250 cm^{-1} (estiramento da ligação C-O).

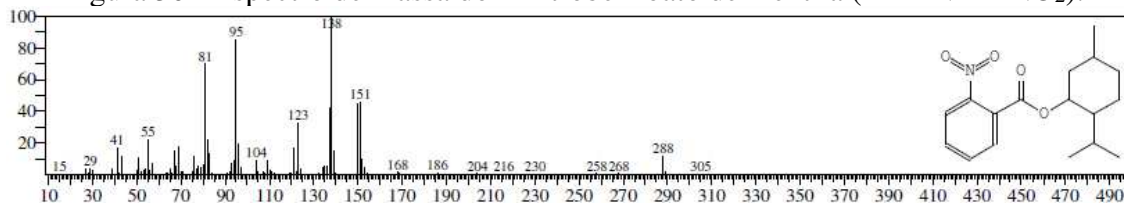
Figura 29 - Espectro de infravermelho do 4-nitrobenzoato de mentila (MBENZ 4-NO₂).



Fonte: o próprio autor.

No espectro de massa (Figura 30) do derivado não foi registrado o pico do íon molecular ($[M^+ 304]$), porém, são observados picos importantes que identificam íons resultando de fragmentações esperadas, tais como, picos em m/z 138 (100%) $[C_{10}H_{18}]^+$ e 95 $[C_7H_{11}]^+$, entre outros.

Figura 30 - Espectro de massa do 4-nitrobenzoato de mentila (MBENZ 4-NO₂).

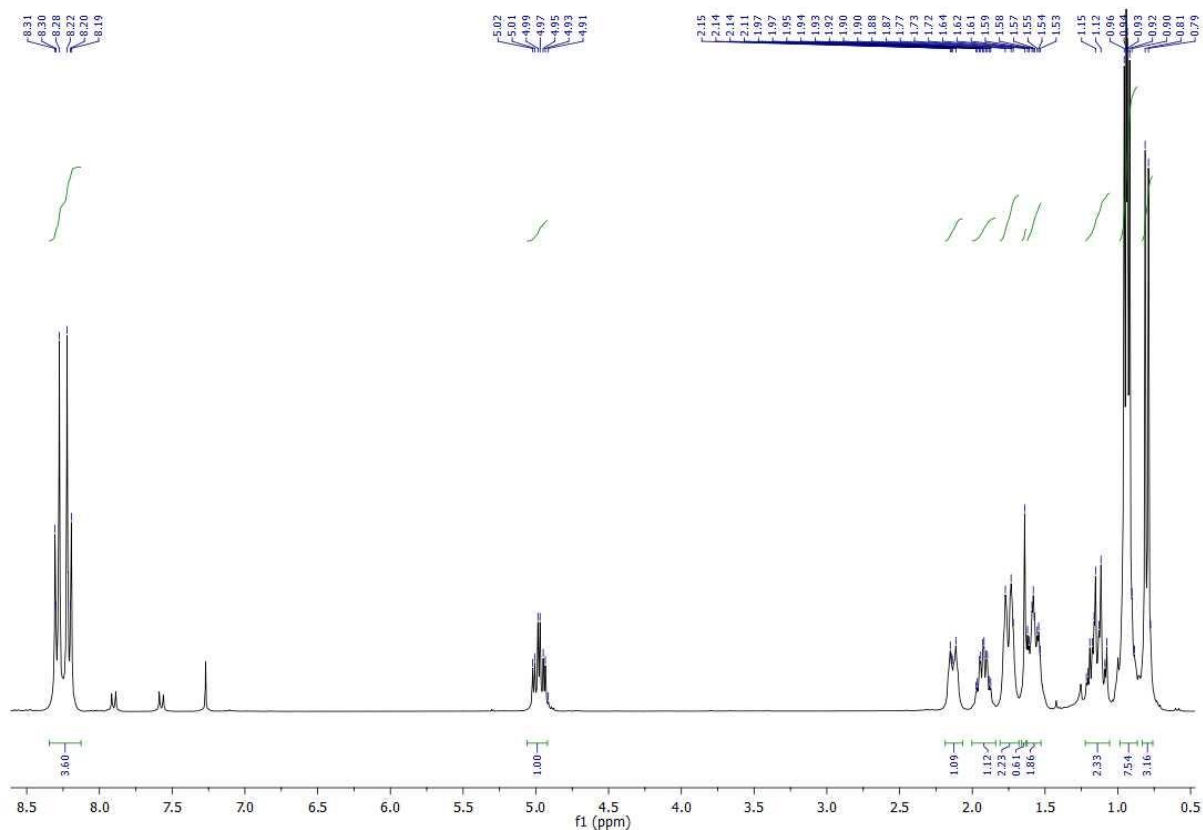


Fonte: o próprio autor.

No espectro de RMN ¹H (Figura 31) de MBENZ 4-NO₂, as absorções na parte alifática do produto foram, praticamente, as mesmas verificadas no correspondente espectro

de MBENZ 4-OCH₃, ou sejam: δ_H 0,80 (6,0 Hz, 3H, CH₃), dupletto em δ_H 0,94 [6,0 Hz, 6H, (CH₃)₂], tripletto de dupletto em δ_H 4,97 (9,0 e 3,0 Hz, 1H, HC-O), todos devidos a parte alifática do composto (os demais hidrogênios do anel mentila, originaram os multipletos compreendidos entre 1,00 e 2,35 ppm). Com respeito a parte aromática, os dois dupletos típicos de anel *p*-substituído, como no MBENZ 4-OCH₃, porém, com deslocamentos químicos em campo mais baixo relativamente aos dupletos do derivado acima, justificado pela presença do grupo nitro, que desblinda fortemente por anisotropia e mesomeria: δ_H 8,20 (d, 9,0 Hz, 2H *orto* a C=O) e 8,30 (d, 9,0 Hz, 2H *orto* ao NO₂).

Figura 31 - Espectro de RMN ¹H do 4-nitrobenzoato de mentila (MBENZ 4-NO₂).

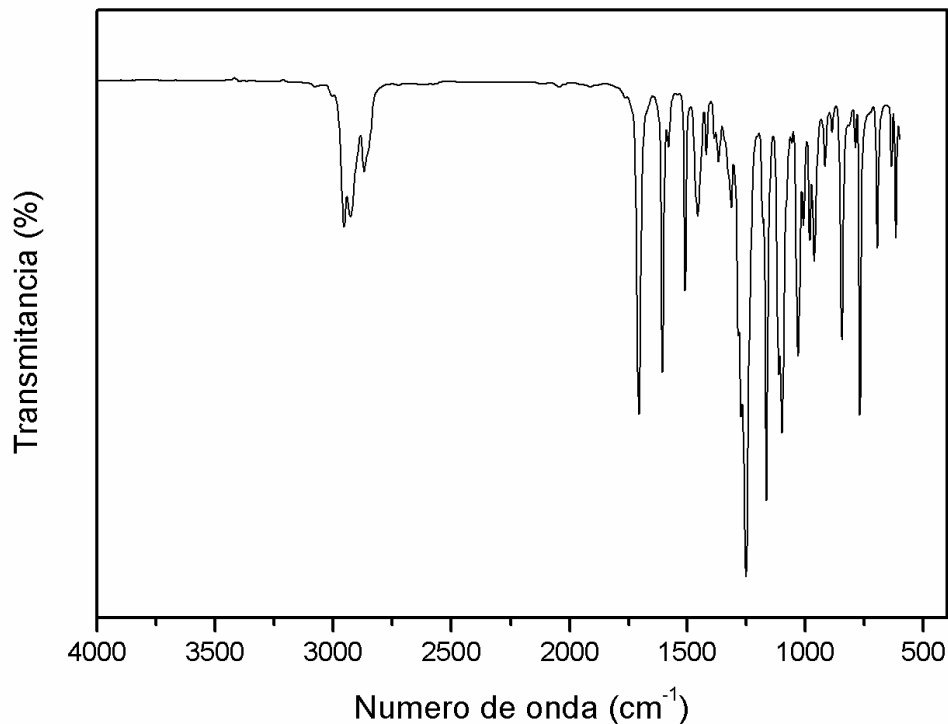


Fonte: o próprio autor.

5.1.2.4 Caracterização do 4-clorobenzoato de mentila (MBENZ 4-Cl)

O espectro no IV (Figura 32) de MBENZ 4-Cl, apresentou como bandas principais, praticamente, as mesmas que nos casos anteriores, quais sejam: 1740 cm^{-1} (estiramento C=O), 1600 , 1500 e 1450 cm^{-1} (estiramento C=C do anel aromático) e 1250 cm^{-1} (estiramento C-O).

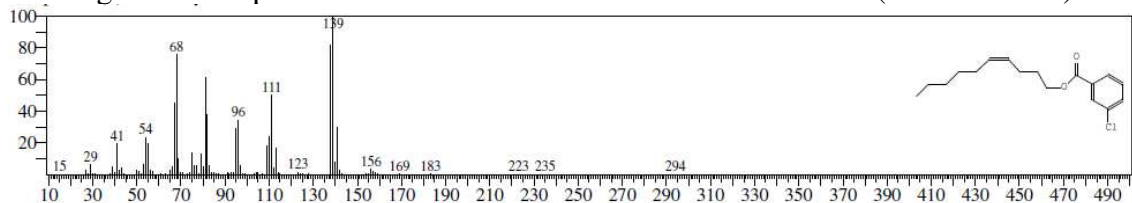
Figura 32 - Espectro de infravermelho do 4-clorobenzoato de mentila (MBENZ 4-Cl).



Fonte: o próprio autor.

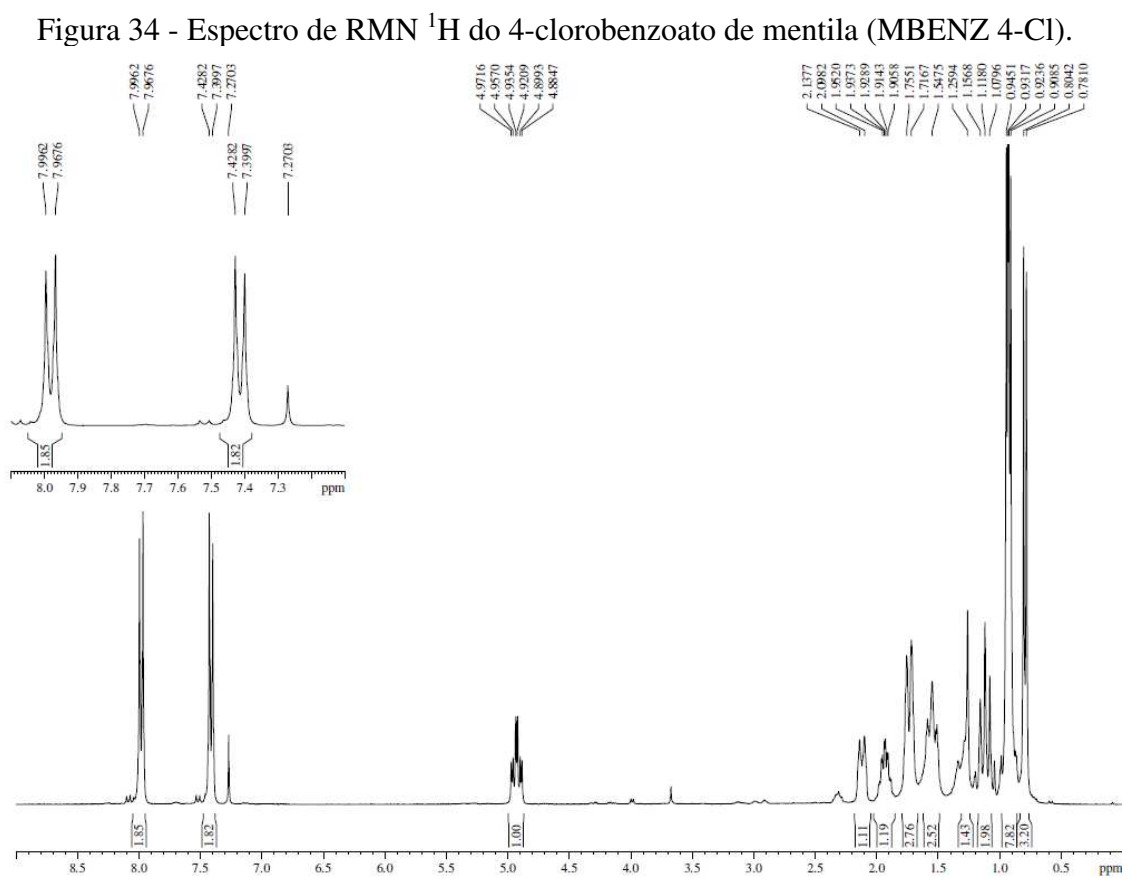
No espectro de massa (Figura 33), embora com baixa intensidade, foi registrado o pico do íon molecular ($[M^+ 294]$). Em adição, picos em $m/z 139$ [$C_7H_4O^{35}Cl/C_7H_4O^{37}Cl$, 3:1]⁺ e $m/z 111$ [$C_6H_4^{35}Cl/C_6H_4^{37}Cl$, 3:1]⁺.

Figura 33 - Espectro de massas do 4-clorobenzoato de mentila (MBENZ 4-Cl).



Fonte: o próprio autor.

No espectro de RMN ^1H (Figura 34), como esperado, o mesmo padrão em relação aos derivados anteriores no tocante ao sistema mentila: duplete em δ_{H} 0,79 (6,9 Hz, 3H, CH_3), duplete em δ_{H} 0,93 [6,5 Hz, 6H, $(\text{CH}_3)_2$], triplo de duplete em δ_{H} 4,93 (11,0 e 4,5 Hz, 1H, HC-O), todos devidos a parte alifática do composto (os demais hidrogênios do anel mentila, originaram os multipletos compreendidos entre 1,00 e 2,25 ppm); duplete em δ_{H} 7,41 (8,6 Hz, 2H *orto* ao Cl) e duplete em δ_{H} 7,97 (8,6 Hz, 2H *orto* a C=O), originados pelo anel aromático *para* substituído.



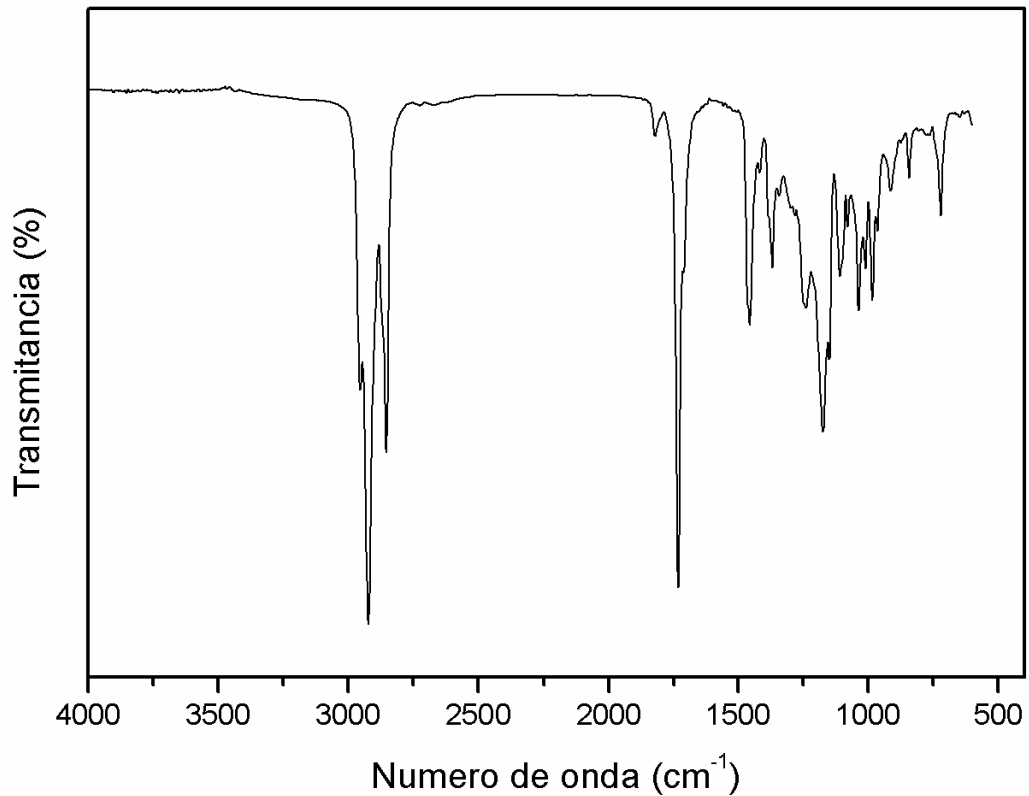
Fonte: o próprio autor.

5.1.2.5 Caracterização do dodecanoato de mentila (MODEC)

O espectro no IV (Figura 35) do MODEC registra absorções que caracterizam um composto de natureza genuinamente alifática. Assim, destaca bandas fortes em 2925 e 2850

cm^{-1} que identificam estiramentos simétrico e assimétrico de várias ligações C-H (cadeia $\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ + anel mentila), juntamente com as bandas em 1460 e 1385 cm^{-1} devidas as deformações angulares de grupos metileno e metila, respectivamente. Em destaque, a absorção intensa em 1740 cm^{-1} de estiramento do grupo C=O de éster.

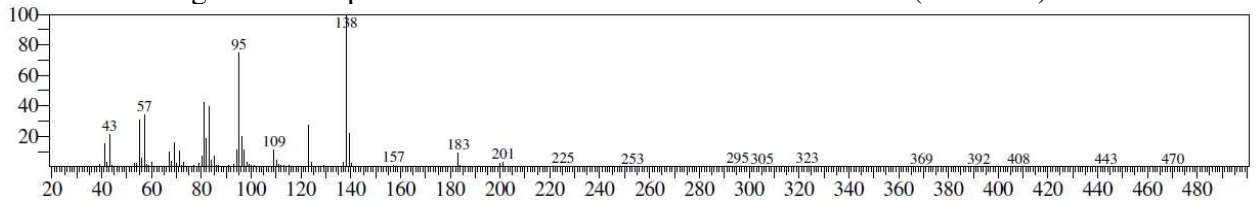
Figura 35 - Espectro de infravermelho do dodecanoato de mentila (MODEC).



Fonte: o próprio autor.

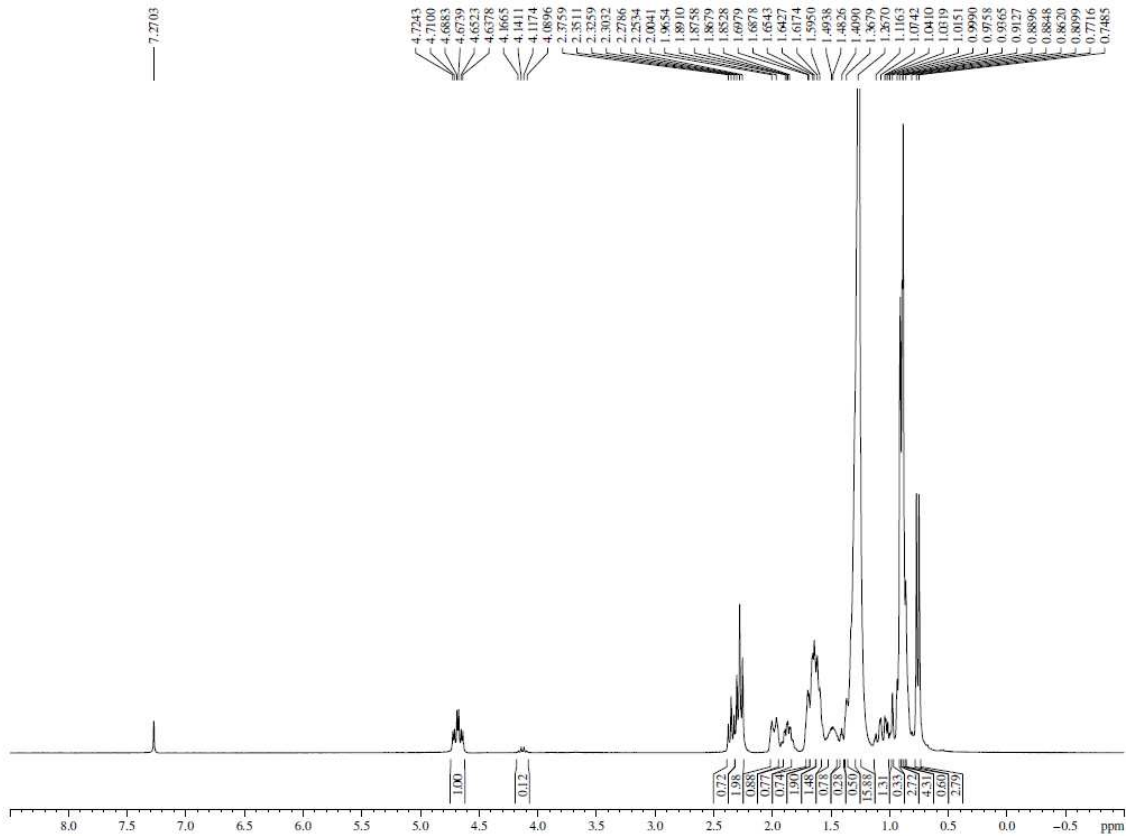
No espectro de massa (Figura 36) do derivado não foi registrado o pico do íon molecular ($[\text{M}^+ 338]$), porém, são observados picos importantes que identificam íons resultando de fragmentações clássicas. Assim, o pico em m/z 138 (100%) pode ser explicado por um rearranjo de McLafferty vindo do íon molecular (m/z 338 – $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$) e o pico em m/z 95 (90%) resultando de uma fragmentação alílica a partir do m/z 138 ($138 - \text{C}_3\text{H}_7$).

Figura 36 - Espectro de massa do dodecanoato de mentila (MODEC).



Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ^1H (Figura 37), de modo geral, exibiu um padrão característico de substância de natureza alifática, com destaque para as absorções em: δ_{H} 0,76 (d, 7,0 Hz, 3H, H_3C), 0,92 [m, 9H, $(\text{H}_3\text{C})_2 + \text{H}_3\text{C}$], 1,36 [m, 18H, $(\text{H}_2\text{C})_9$], 2,26 (t, 7,4 Hz, 2H, H_2C alfa á $\text{C}=\text{O}$) e 4,68 (td, 10,8 e 4,3 Hz, 1H, $\text{HC}-\text{O}$).

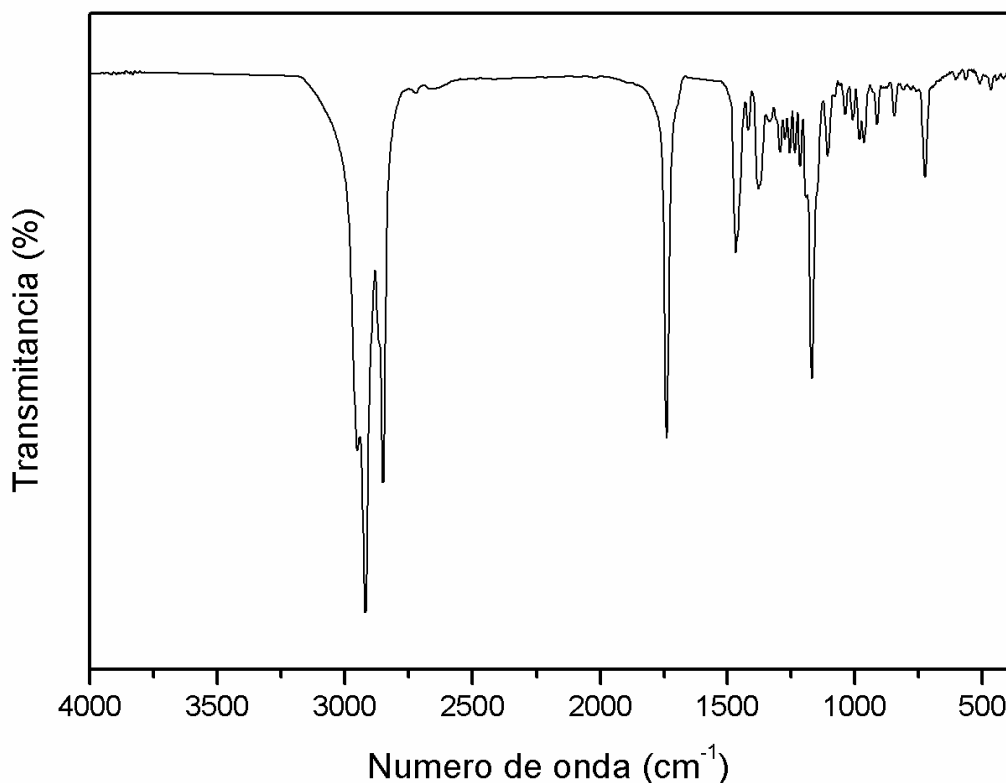
Figura 37 - Espectro de RMN ^1H do dodecanoato de mentila (MODEC).

Fonte: o próprio autor.

5.1.2.6 Caracterização do octadecanoato de mentila (MEST)

O espectro no IV (Figura 38) do octadecanoato de mentila (MEST) registra absorções que caracterizam um composto de natureza genuinamente alifática. Assim, destaca bandas fortes em 2925 e 2850 cm^{-1} que identificam estiramentos simétrico e assimétrico de várias ligações C-H (cadeia $\text{C}_{17}\text{H}_{35}$ + anel mentila), juntamente com as bandas em 1460 e 1385 cm^{-1} devidas as deformações angulares de grupos metileno e metila, respectivamente. Em destaque, a absorção intensa em 1740 cm^{-1} de estiramento do grupo C=O de éster.

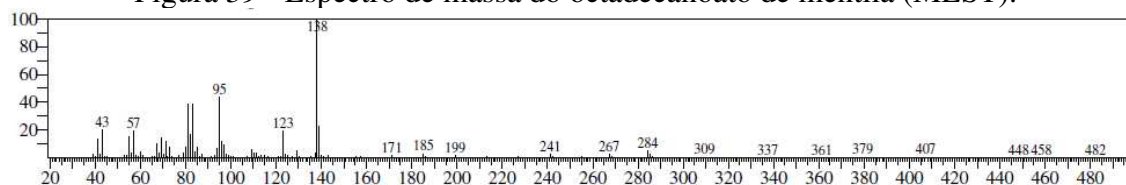
Figura 38 - Espectro de infravermelho do octadecanoato de mentila (MEST).



Fonte: o próprio autor.

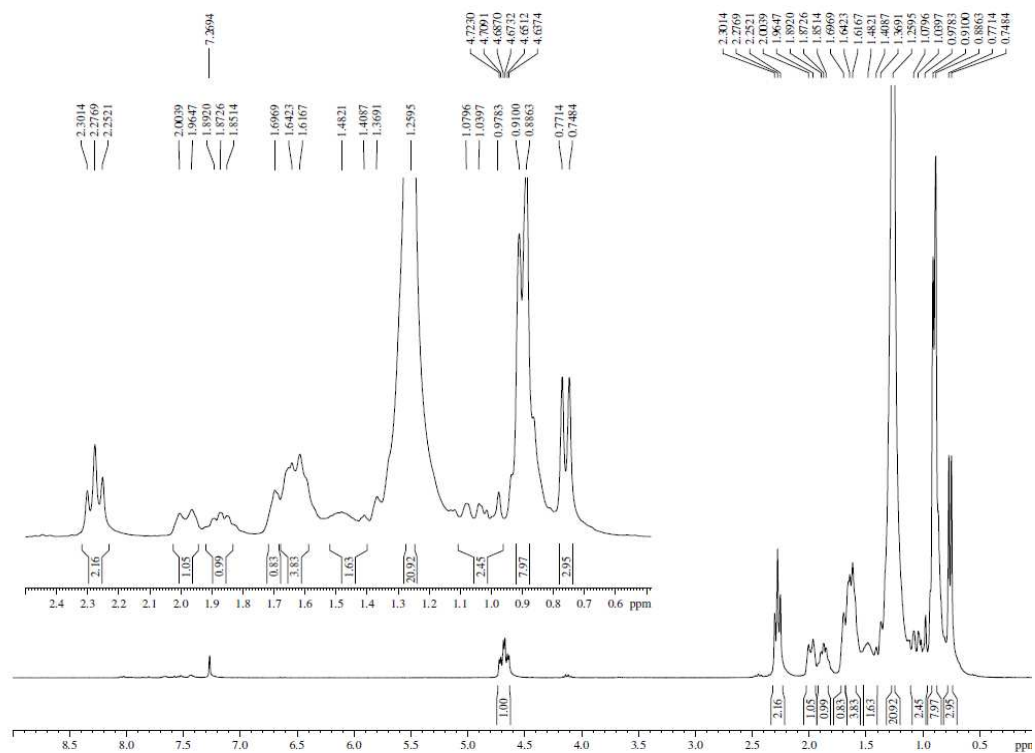
No espectro de massa (Figura 39) do derivado não foi registrado o pico do íon molecular ($[\text{M}^+ 422]$), porém, foram observados picos esperados, tais como, o pico em m/z 284 $[\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2]^+$ e m/z 138 (100%) que podem ser explicados por fragmentação tipo McLafferty a partir do pico do íon molecular.

Figura 39 - Espectro de massa do octadecanoato de mentila (MEST).



Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ^1H (Figura 40), de modo geral, exibiu um padrão característico de substância de natureza alifática, com destaque para as absorções em: δ_{H} 0,76 (d, 7,0 Hz, 3H, H_3C), 0,95 [m, 9H, $(\text{H}_3\text{C})_2 + \text{H}_3\text{C}$], 1,26 [m, 30H, $(\text{H}_2\text{C})_{15}$], 2,28 (t, 7,4 Hz, 2H, H_2C alfa á $\text{C}=\text{O}$) e 4,68 (td, 10,8 e 4,0 Hz, 1H, $\text{HC}-\text{O}$).

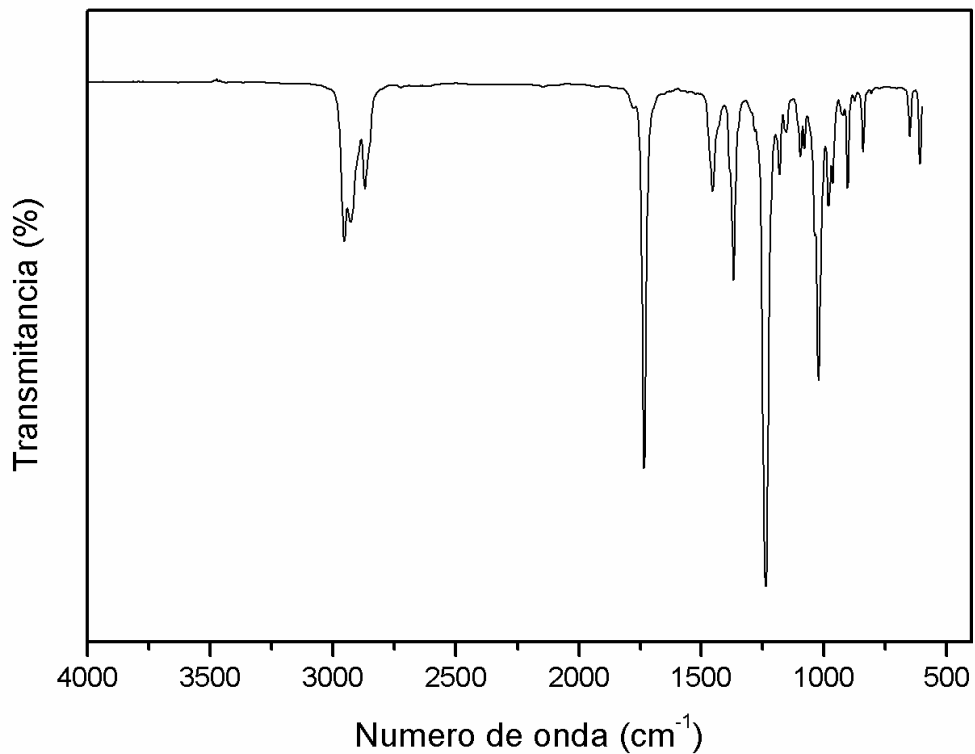
Figura 40 - Espectro de RMN ^1H do octadecanoato de mentila (MEST).

Fonte: o próprio autor.

5.1.2.7 Caracterização do acetato de mentila (MAC)

O espectro de infravermelho (Figura 41) do derivado acetato de mentila (MAC), apresentou como destaque, duas bandas intensas em 1745 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} características dos estiramentos C=O e C-O em acetatos, respectivamente.

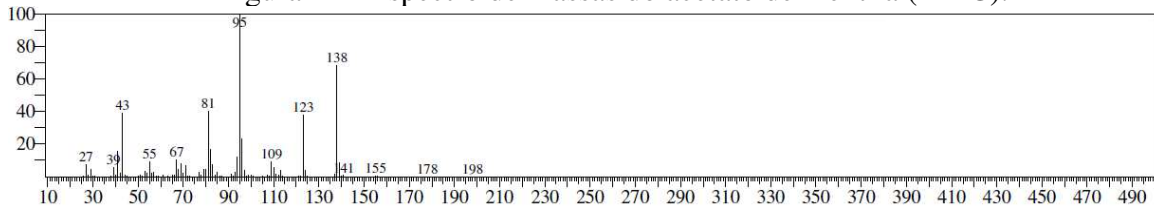
Figura 41 - Espectro de infravermelho do acetato de mentila (MAC).



Fonte: o próprio autor.

O espectro de massa (Figura 42), embora com pico do íon molecular ($[M]^+198$), muito pequeno, exibiu picos coerentes com fragmentações esperadas. Assim o pico em m/z 138 (69%) seria resultante da perda de ácido acético ($M - 60$) via mecanismo Mc Lafferty a partir do íon molecular. Este fragmento, por sua vez, permite explicar o íon responsável pelo pico base m/z 95 (100%) (m/z 138 - C_3H_7) e ainda o pico em m/z 123 (40%) (m/z 138 - CH_3).

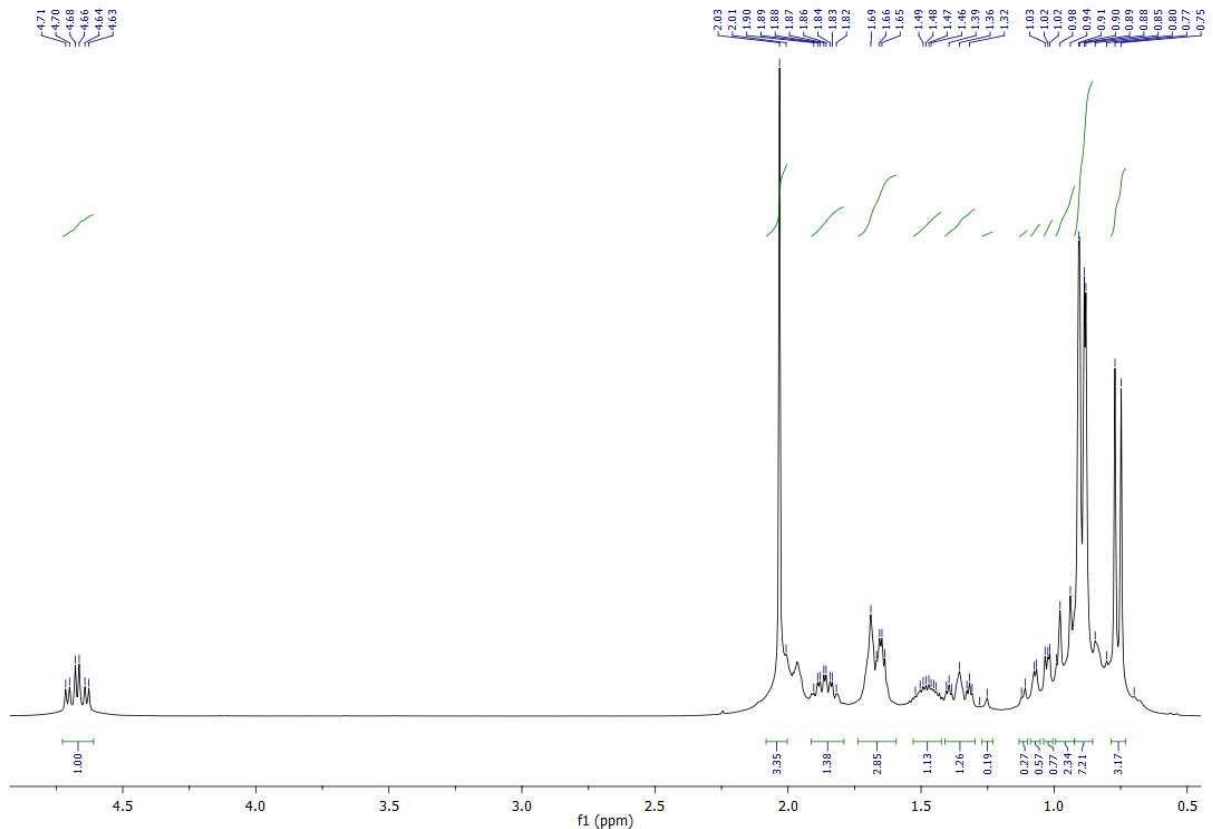
Figura 42 - Espectro de massas do acetato de mentila (MAC).



Fonte: o próprio autor.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 43), à parte os sinais multipletos e o sinal bem resolvido em δ_{H} 4,67 (td 9,0 e 3,0 Hz, 1H, CH-O) relacionados aos hidrogênios do anel mentila, destacam-se os sinais em: δ_{H} 0,76 (d, 6,0 Hz, 3H, CH_3), 0,90 (d, 6,0 Hz, 6H, $(\text{CH}_3)_2$), 2,03 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}=\text{O}$) e 4,67 (td, 9,0 e 3,0 Hz, 1H, CH-O), todos em acordo com a estrutura do acetato de mentila.

Figura 43 - Espectro de RMN ^1H do acetato de mentila (MAC).

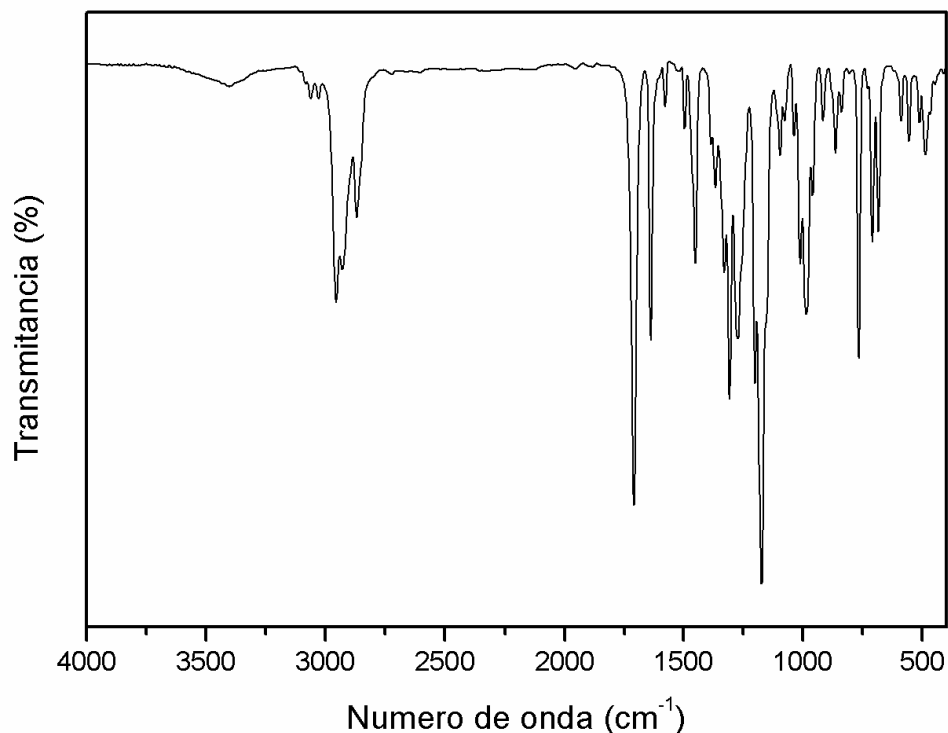


Fonte: o próprio autor.

5.1.2.8 Caracterização do cinamato de mentila (MCINAM)

O espectro IV (Figura 44) mostrou absorções em 1724 cm^{-1} (C=O de éster conjugado), 1634 cm^{-1} (– C = C – de olefina conjugada) e 1260 cm^{-1} (C– O de éster), entre outras.

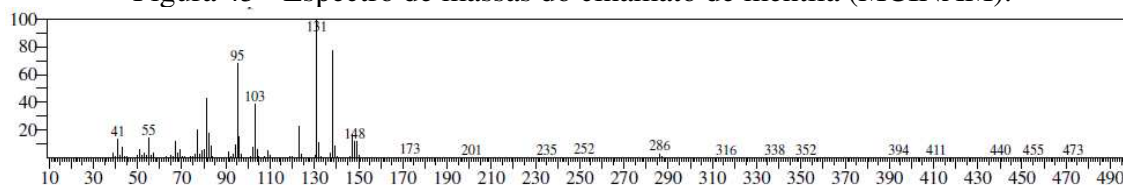
Figura 44 - Espectro de infravermelho do cinamato de mentila (MCINAM).



Fonte: o próprio autor.

No espectro de massa (Figura 45) do derivado foi registrado o pico do íon molecular ($[M^+ 286]$), além de picos importantes, tais como m/z 138 (85%) $[\text{C}_{10}\text{H}_{18}]^+$, 131 (100%) $[\text{C}_9\text{H}_7\text{O}]^+$ e 95 $[\text{C}_7\text{H}_{11}]^+$.

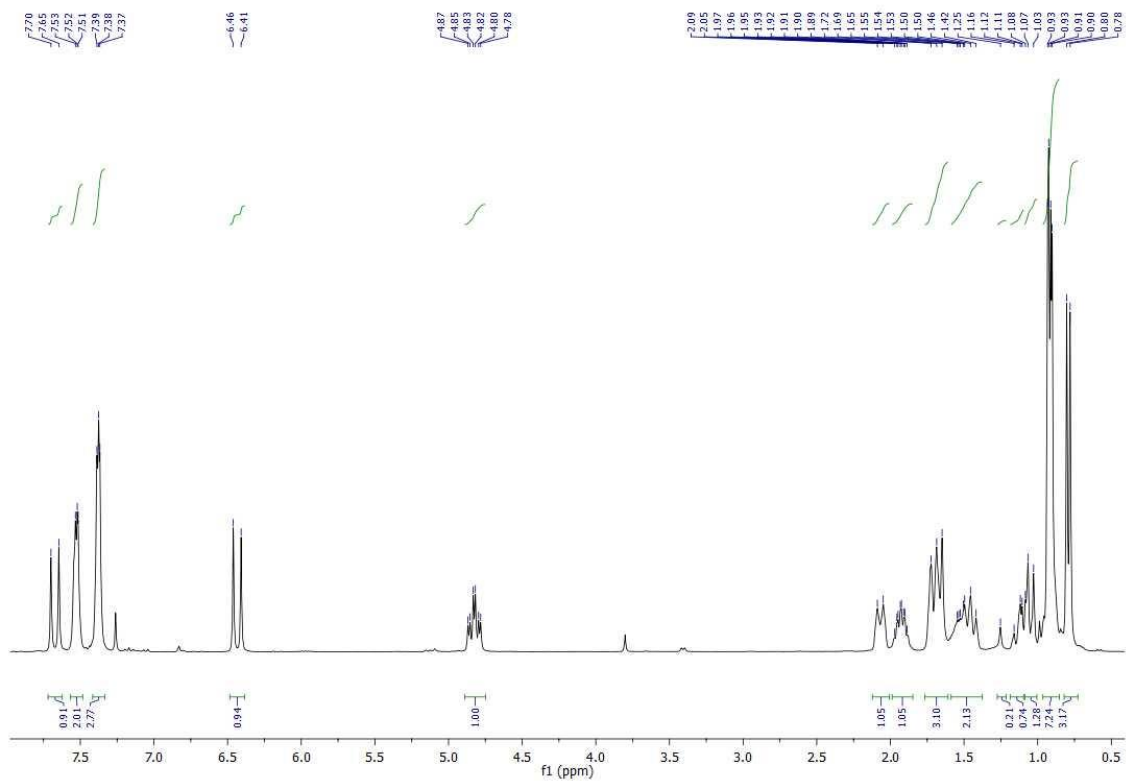
Figura 45 - Espectro de massas do cinamato de mentila (MCINAM).



Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ^1H (Figura 46) registrou sinais em δ_{H} 0,77 (d, 6,0 Hz, 3H, CH_3), 0,91 (m, 6H, $(\text{CH}_3)_2$), 1,03 a 2,09 (multipletos) e 4,83 (td, 9,0 e 4,0 Hz, 1H, CH-O), todos devidos aos hidrogênios da parte alifática (sistema mentila). Por outro lado, o grupo cinamoil foi indicado pelos sinais em campo baixo de δ_{H} 6,41 a 7,70 para 7 hidrogênios. Os sinais de 5 hidrogênios em δ_{H} 7,38 (m, 3H *para e meta* a $\text{C}=\text{C}$ da olefina) e 7,52 (m, 2H, *orto* a $\text{C}=\text{C}$) foram correlacionados ao anel aromático do sistema cinamoil. Uma configuração *trans* para a parte cinamoil foi concordante com os sinais dos hidrogênios olefinicos em δ_{H} 6,43 (d, 15 Hz, H- α) e 7,67 (d, 15 Hz, H- β).

Figura 46 - Espectro de RMN ^1H do cinamato de mentila (MCINAM).

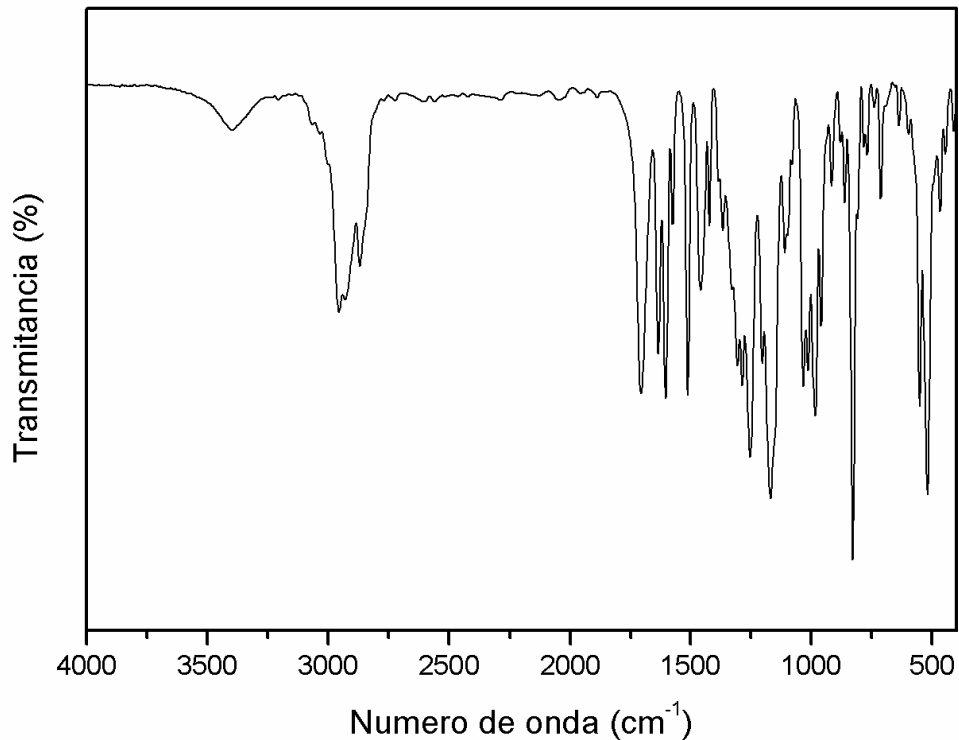


Fonte: o próprio autor.

5.1.2.9 Caracterização do 4-metóxicinamato de mentila (MCINAM 4- OCH_3)

O espectro IV (Figura 47) mostrou absorções em 1712 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ de éster conjugado), 1631 cm^{-1} ($-\text{C}=\text{C}-$ de olefina conjugada), 1590, 1500 ($-\text{C}=\text{C}-$ de anel aromático), 1250 ($\text{C}-\text{O}$ de éster) e 830 cm^{-1} (deformação angular $\text{H}-\text{C}=\text{C}$ de anel aromático).

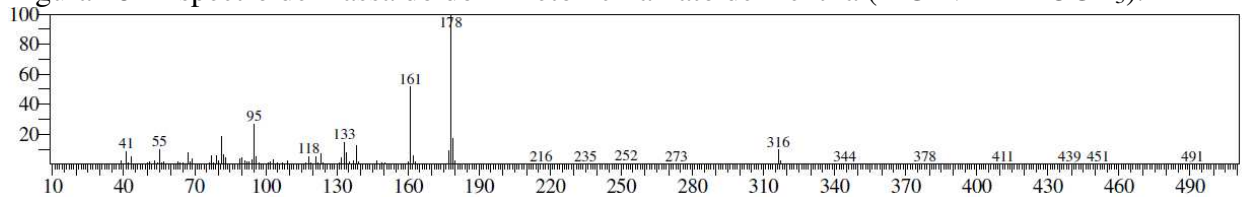
Figura 47 - Espectro de infravermelho do 4-metóxicinamato de mentila (MCINAM 4-OCH₃).



Fonte: o próprio autor.

No espectro de massa (Figura 48) além do pico do íon molecular ($[M^+ 316]$), são observados picos importantes que identificam íons resultando de fragmentações clássicas. Assim, o pico em m/z 178 (100%) pode ser explicado por um rearranjo de McLafferty ($M - C_{10}H_{18}$); m/z 161 ($M - C_{10}H_{19}O$) por fragmentação α a carbonila e o pico em m/z 95 (90%) resultando de uma fragmentação alílica a partir do m/z 138 [$138 (C_{10}H_{18}) - C_3H_7$].

Figura 48 - Espectro de massa do do 4-metóxicinamato de mentila (MCINAM 4-OCH₃).

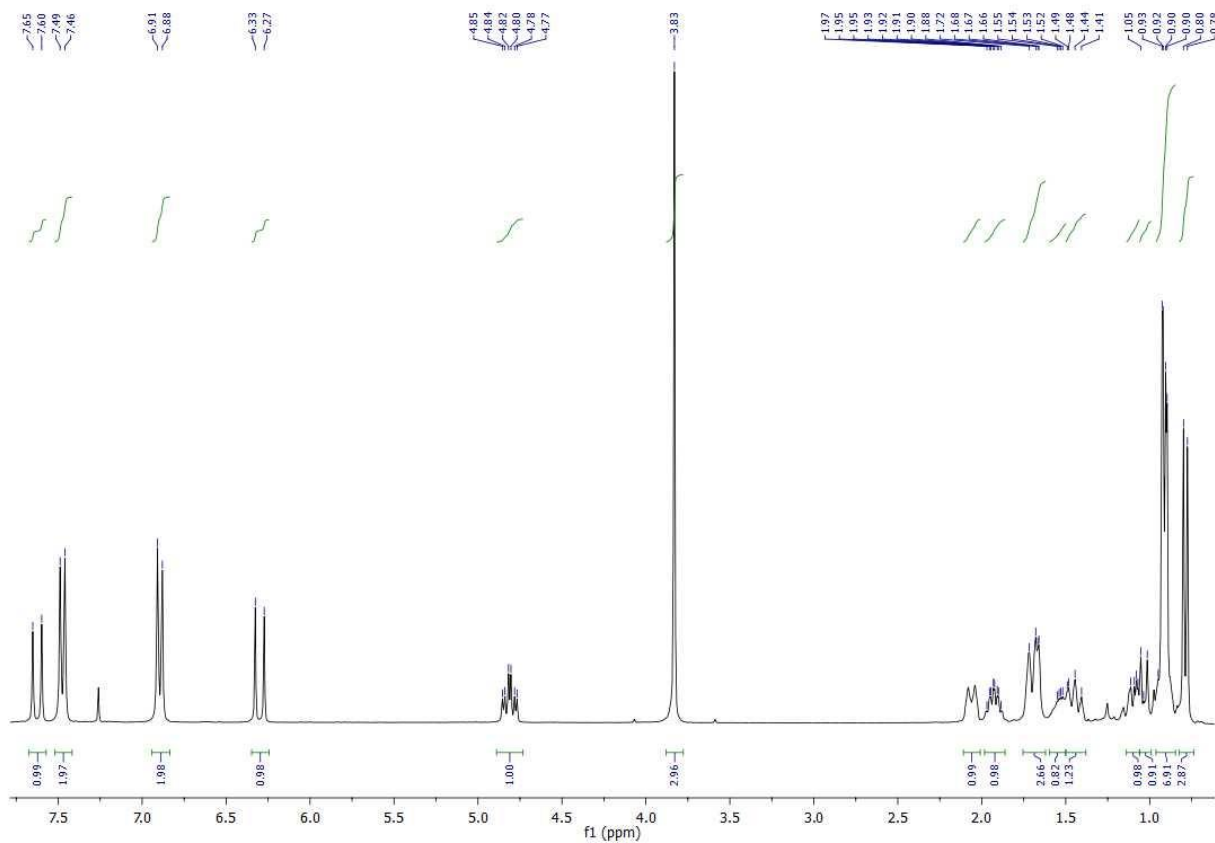


Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ¹H (Figura 49) de MCINAM 4-OCH₃ registrou sinais em δ H 0,79 (d, 6,0 Hz, 3H, CH₃), 0,92 [m, 6H, (CH₃)₂], 1,40 a 2,10 (multipletos) e 4,81 (td, 9,0 e 3,0 Hz, 1H, HC-O), todos referentes aos hidrogênios do sistema mentila. Os 4 hidrogênios do anel aromático p-substituído exibiram sinais com o padrão característico: dois dubletos, sendo um

em δ H 6.89 (9,0 Hz, 2H *orto* a C=C olefínica) e outro em δ H 7,47 (9,0 Hz, 2H *meta* ao grupo OCH₃). Uma configuração *trans* para a parte cinamoil foi concordante com os sinais dos hidrogênios olefínicos em δ _H 6,29 (d, 15 Hz, H- α) e 7,62 (d, 15 Hz, H- β).

Figura 49 - Espectro de RMN ¹H do do 4-metóxicinamato de mentila (MCINAM 4-OCH₃).

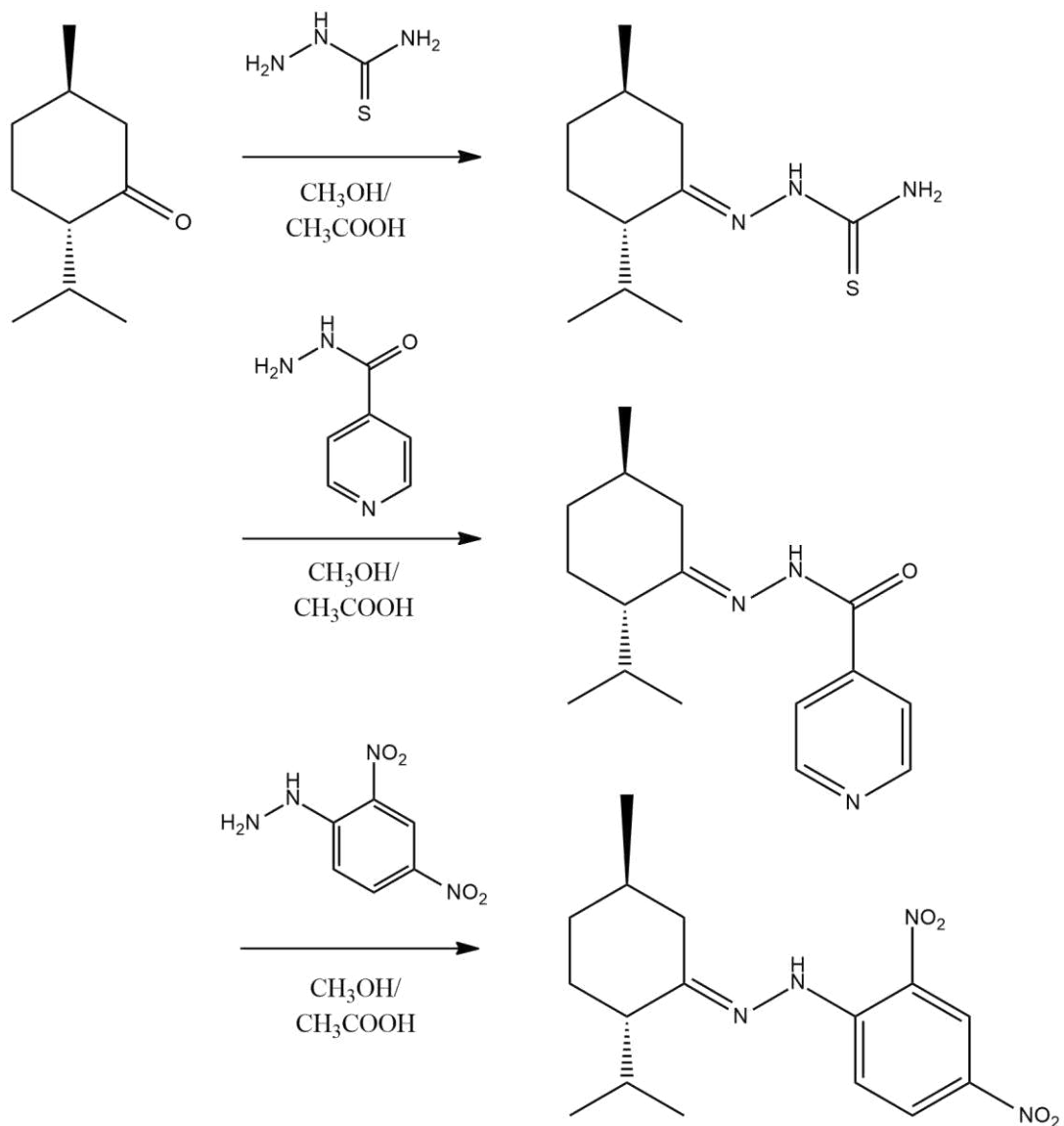


Fonte: o próprio autor.

5.1.3 Síntese dos derivados da (-)-mentona

A obtenção da tiossemicarbazona derivada da mentona foi realizada utilizando a metodologia proposta por Mol et al (2016) (Esquema 6), enquanto as hidrazonas, seguiram a metodologia de Souza (SOUZA et al., 2016), com modificações.

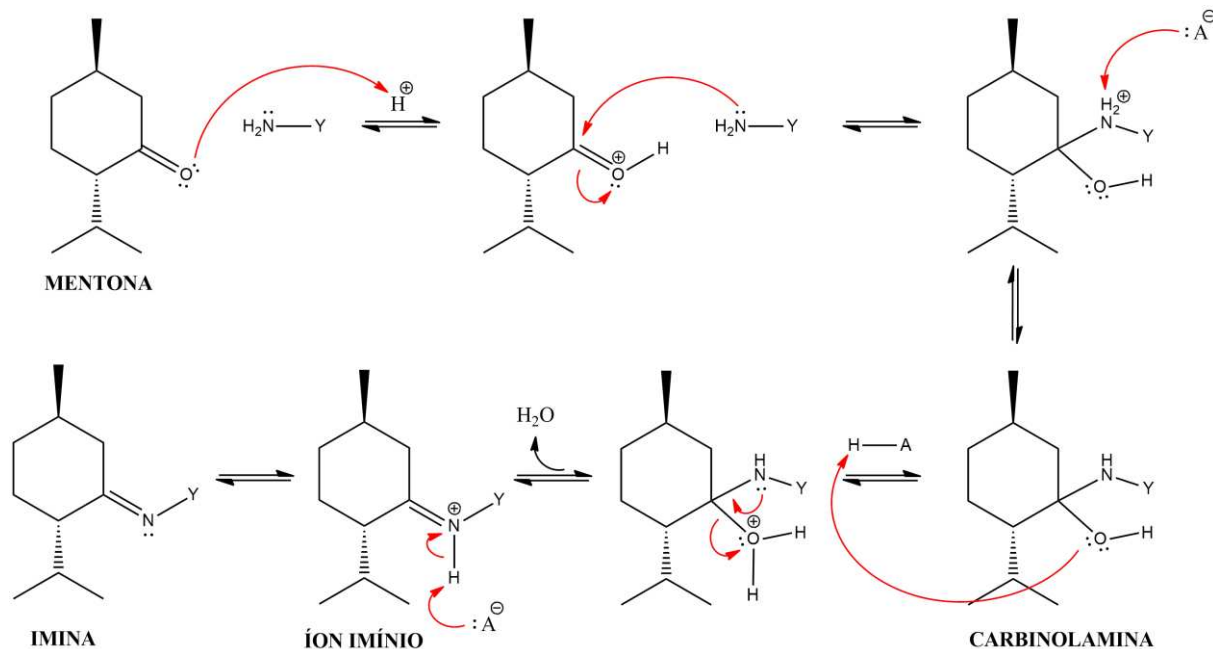
Esquema 6 - Esquema reacional dos derivados da (-)-mentona através de reação com tiossemicarbazida e hidrazinas.



Fonte: o próprio autor.

O mecanismo reacional previsto para essas reações está proposto abaixo:

Esquema 7 - Mecanismo para a formação de ésteres derivados do (-)-mentol



Os rendimentos das reações foram bons e podem ser justificados, em parte, pela boa reatividade dos reagentes (tiosemicarbazidas e hidrazinas). Os resultados são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Rendimento das reações de esterificação do mentol com ácidos carboxílicos.

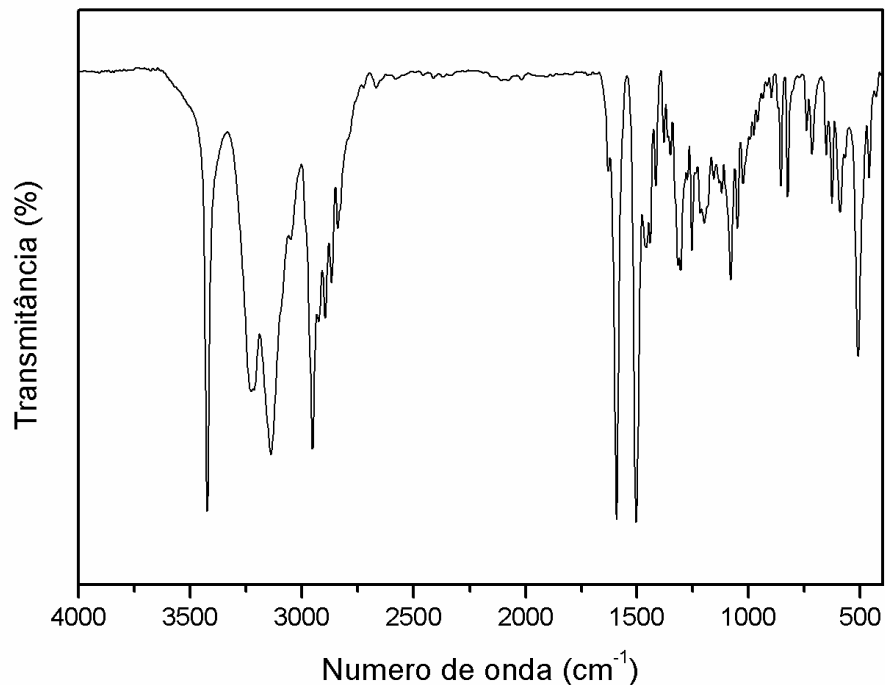
Hidrazinas	Rendimento	SIGLA
10. Tiosemicarbazida	78	MENTIO
11. Isoniazida	75	MENTISO
12. 2,4-dinitrofenilhidrazina	80	MHID 2,4-DINITRO

Fonte: o próprio autor.

5.1.3.1 *Caracterização do (E) -2- ((2S, 5R) -2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) hidrazinacarbotioamida (MENTIO).*

O espectro infravermelho (Figura 50) exibiu bandas compatíveis com a presença de NH (3350 cm^{-1}) e NH_2 (3240 e 3230 cm^{-1}). Em adição, fortes absorções em 1580 e 1500 cm^{-1} , que foram atribuídas as ligações C=N e C=S, respectivamente. Todas essas absorções são coadunáveis com os grupos funcionais presentes no derivado.

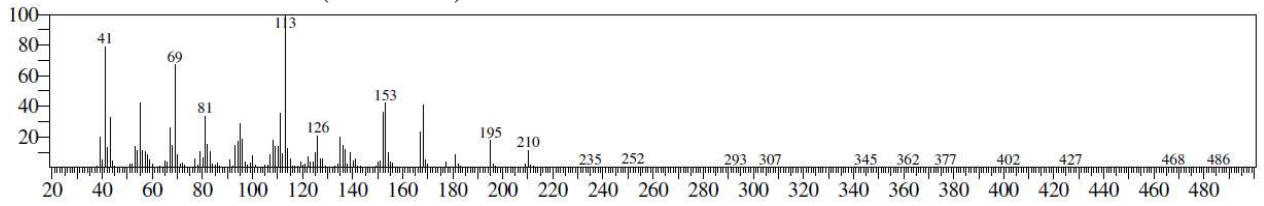
Figura 50 - Espectro de infravermelho do (E) -2 - ((2S, 5R) -2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) hidrazinacarbotioamida (MENTIO).



Fonte: o próprio autor.

O espectro de massa (Figura 51), por sua vez, embora não tenha exibido o pico do íon molecular (M^+ 227), permitiu visualizar alguns picos originados por fragmentos concordantes com a estrutura, tais como: m/z 210 [$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{S}$] $^+$, 168 [$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2$] $^+$, 167 [$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_2$] $^+$, 153 [$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}$] $^+$, 69 [C_5H_9] $^+$ e 41 [C_3H_5] $^+$.

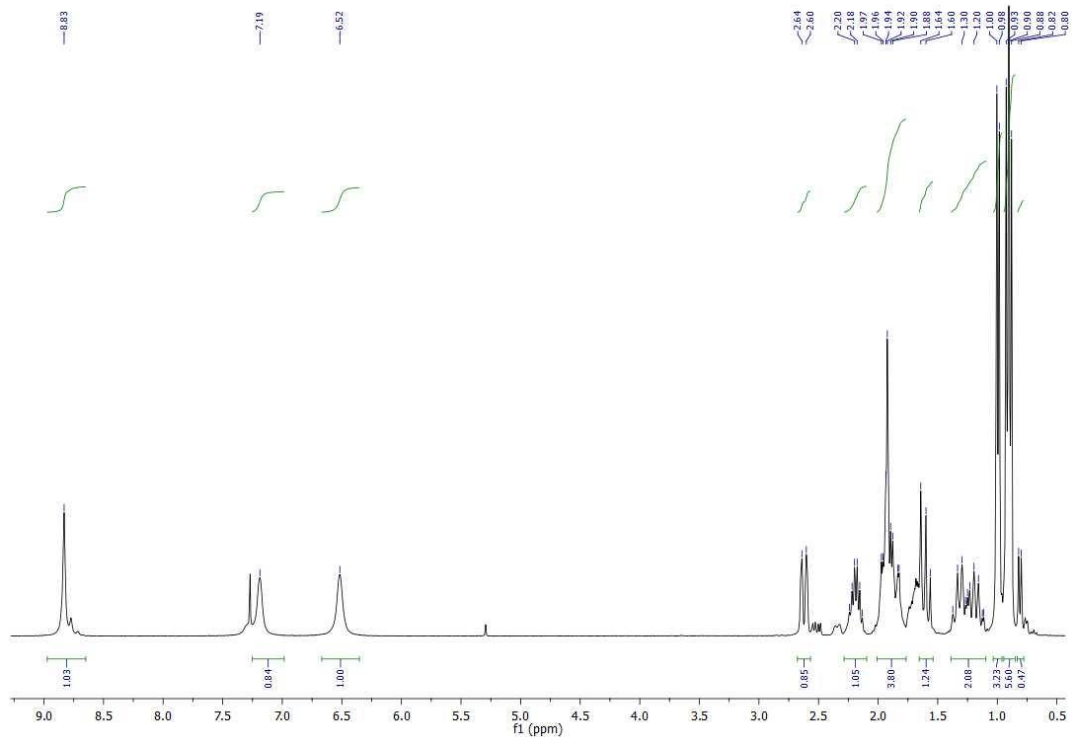
Figura 51 - Espectro de massa do (E) -2 - ((2S, 5R) -2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) hidrazinacarbotoamida (MENTIO).



Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ^1H (Figura 52) registrou sinais que foram correlacionados conforme se segue: δ_{H} 0,91 [m, 6H, $(\text{CH}_3)_2$], 0,99 (d, 6,0 Hz, 3H, CH_3), 1,20 a 2,30 (multipletos, 7H do anel mentila + 1H, H-C do grupo isopropil), 2,62 (dl, 12 Hz, 1H, H-C-C=N no anel mentila), 6,52 [sl e 7,19 (sl), H_2N] e 8,83 (sl, H-N).

Figura 52 - Espectro de RMN ^1H do (E) -2 - ((2S, 5R) -2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) hidrazinacarbotoamida (MENTIO).

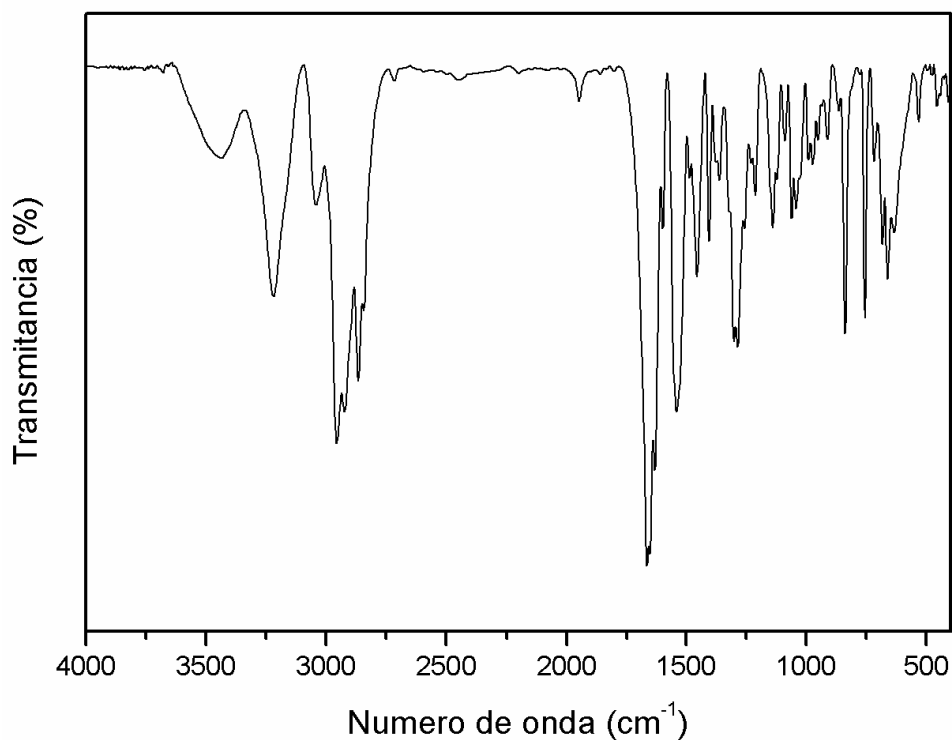


Fonte: o próprio autor.

5.1.3.2 Caracterização do (*E*)-*N'*-((2*S*, 5*R*)-2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) benzo-hidrazida (MENTISO).

O espectro infravermelho (Figura 53) exibiu bandas compatíveis com a presença de NH (3350 cm^{-1}), C=O (1650 cm^{-1}), C=N (1600 cm^{-1}), C=C-Ar (1500 cm^{-1}) e H-Ar (690 e 750 cm^{-1}).

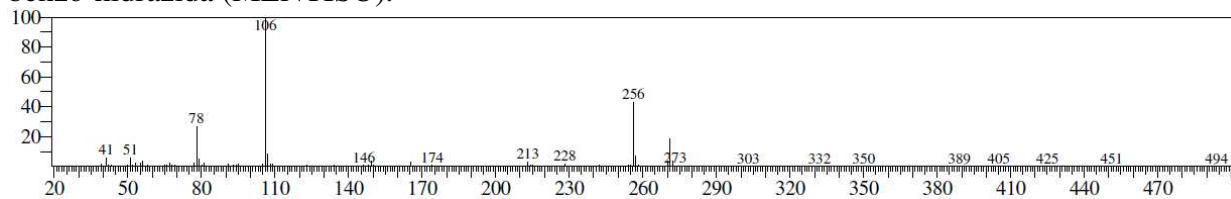
Figura 53 - Espectro de infravermelho do (*E*)-*N'*-((2*S*, 5*R*)-2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) benzo-hidrazida (MENTISO).



Fonte: o próprio autor.

O espectro de massa (Figura 54) mostrou o pico do íon molecular em m/z 273 e, como destaques, picos em m/z 106 $[\text{C}_5\text{H}_4\text{CO}]^+$ e m/z 78 $[\text{C}_5\text{H}_4\text{N}]^+$.

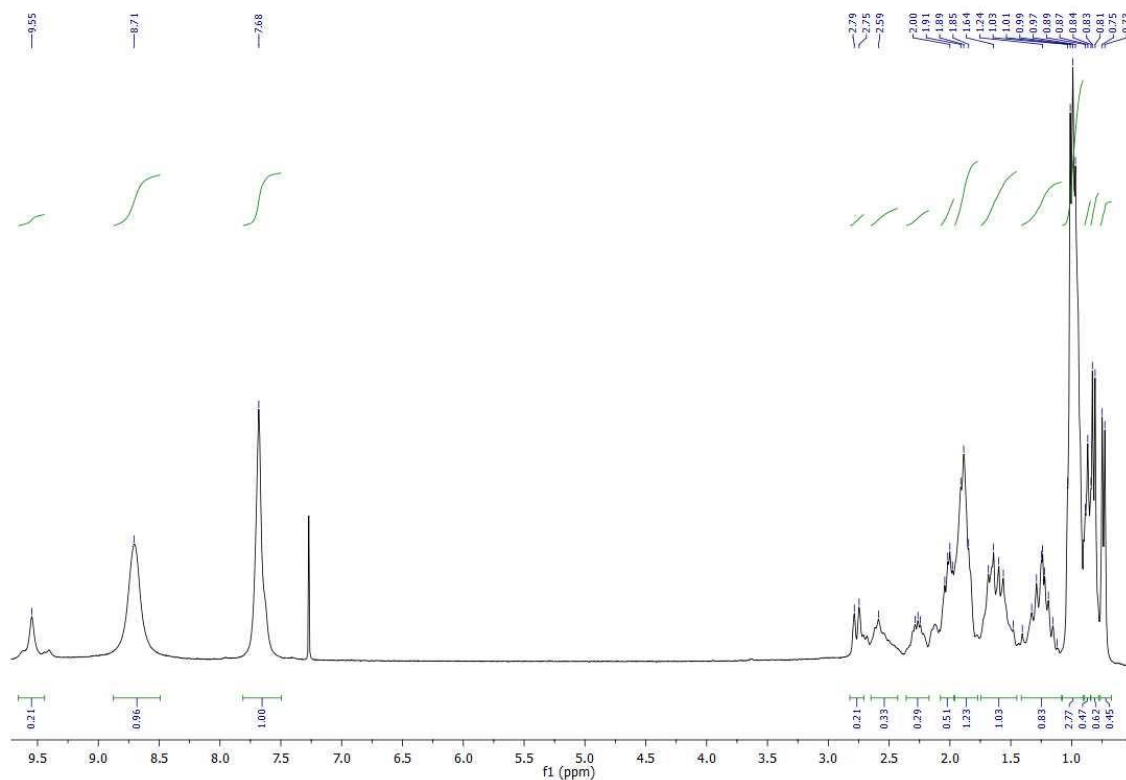
Figura 54 - Espectro de massa do (E)-N'-((2S, 5R)-2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) benzo-hidrazida (MENTISO).



Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ^1H (Figura 55), à parte os sinais devidos aos hidrogênios dos sistema mentila (0,75 a 2,85 ppm), mostrou sinais em δ_{H} 7,80 (sl, 2H, 2H-2), 8,70 (sl, 2H, 2H-3) e 9,50 (s, 1H, H-N).

Figura 55 - Espectro de RMN ^1H do (E)-N'-((2S, 5R)-2 isopropil-5-metilciclo-hexilideno) benzo-hidrazida (MENTISO).



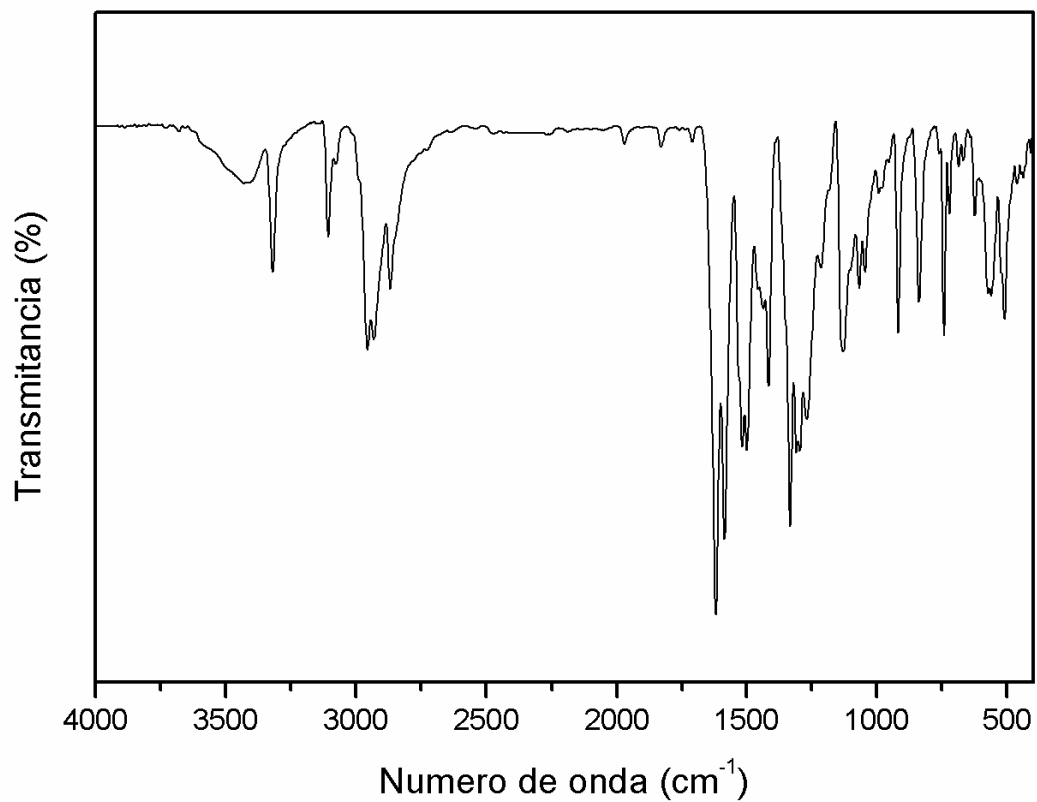
Fonte: o próprio autor.

5.1.3.3 Caracterização do (E)-1-(2,4-dinitrofenil)-2-((2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclohexilideno) hidrazina (MHID 2,4-DINITRO).

O espectro infravermelho (

Figura 56) exibiu bandas compatíveis com a presença de NH (3350 cm^{-1}), H-Ar (estiramento em 3015 cm^{-1}), C=C do anel aromático ($1600, 1580$ e 1500 cm^{-1}), entre outras.

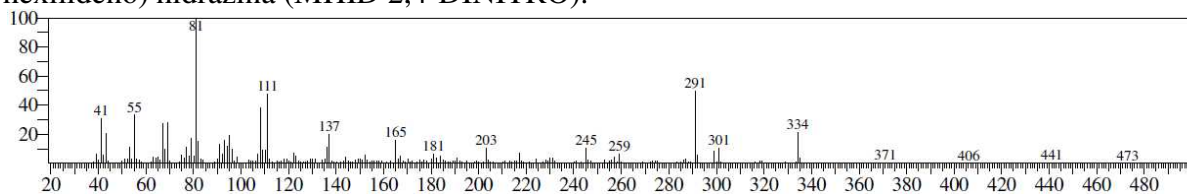
Figura 56 - Espectro de infravermelho do (E)-1-(2,4-dinitrofenil)-2-((2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclohexilideno) hidrazina (MHID 2,4-DINITRO).



Fonte: o próprio autor.

O espectro de massa (Figura 57) mostrou o pico do íon molecular em m/z 334 e picos em m/z 291 $[M-43]^+$ e m/z 83 $[C_5H_9N]^+$, entre outros menos intensos.

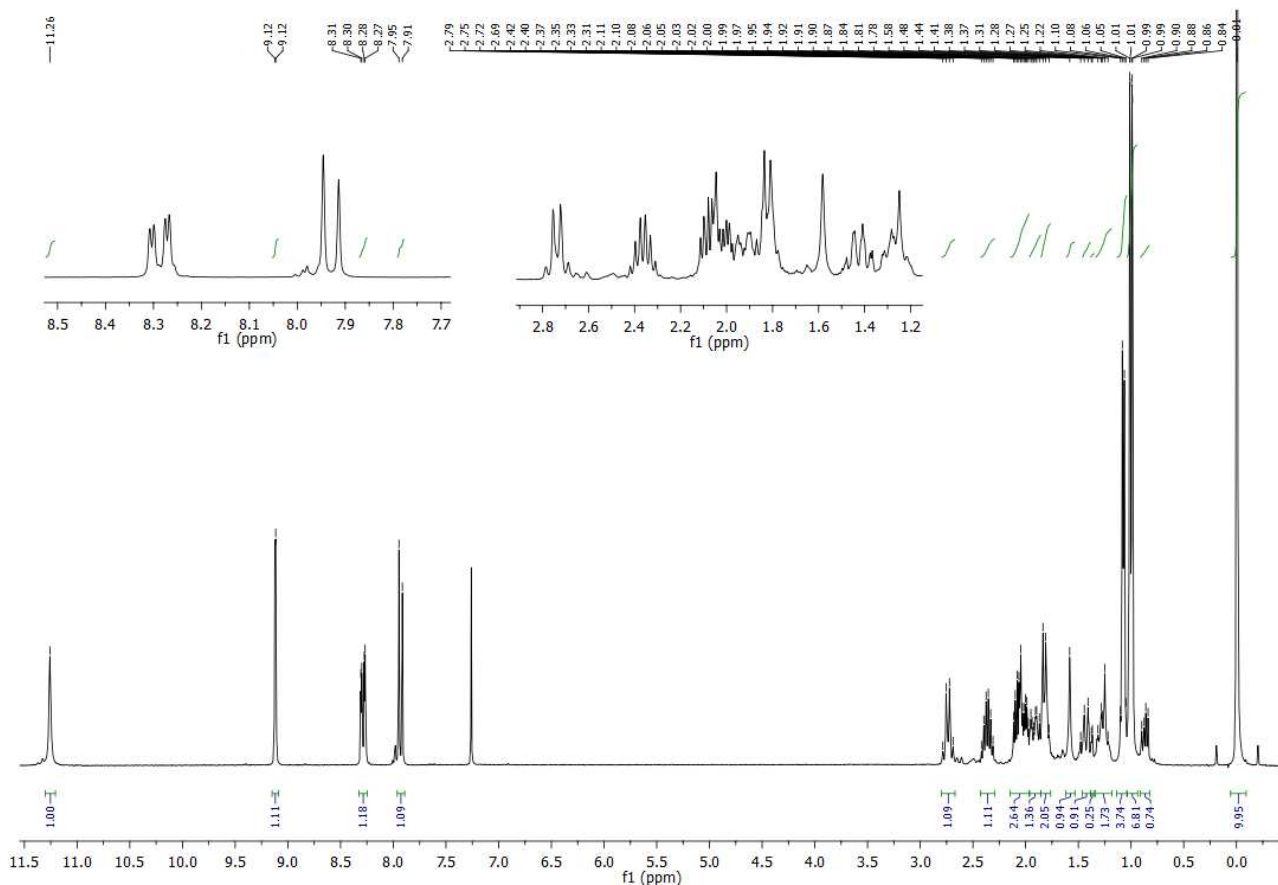
Figura 57 - Espectro de massa do (E)-1-(2,4-dinitrofenil)-2-((2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) hidrazina (MHID 2,4-DINITRO).



Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ^1H (Figura 58) registrou sinais que foram correlacionados ao sistema metila: δ_{H} 0,91 a 2,35 (17 hidrogênios) e 2,75 (dl 12Hz, 1H, H-C-C=N). O espectro no tocante a parte aromática, mostrou sinais coerentes com o esperado, ou seja: 7,93 (d, 9Hz, H-6), 8,30 (dd, 3 e 9Hz, H-5) e 9,12 (sl, H-3).

Figura 58 - Espectro de RMN ^1H do (E)-1-(2,4-dinitrofenil)-2-((2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclo-hexilideno) hidrazina (MHID 2,4-DINITRO).



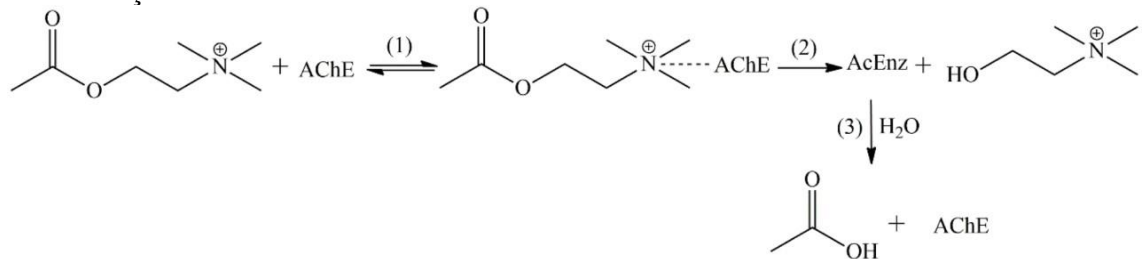
Fonte: o próprio autor.

5.2 PARTE 2: ATIVIDADES DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE, LARVICIDA E ANSIOLÍTICA

5.2.1 Avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase dos derivados do mentol e da mentona.

O desenvolvimento de novos biolarvicidas concentra-se em maior eficiência e menos toxicidade, reduzindo assim a dependência de pesticidas caros e tóxicos. Alguns larvicidas inibem a ação da Acetilcolinesterase (AChE), uma enzima localizada principalmente no sistema nervoso central de todo o reino animal, incluindo insetos, e amplamente distribuída nas membranas excitáveis dos nervos e músculos. A AChE trabalha na sinapse neural e, uma vez inibida, não será mais capaz de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em ácido acético e colina (Esquema 7), levando a uma série de efeitos neurotóxicos, colapso do sistema nervoso central e conseqüentemente morte do inseto.

Esquema 7 - Reação da acetilcolina com a enzima acetilcolinesterase.



Fonte: Oliveira, 2019.

O teste de inibição da AChE usou a eserina, um medicamento com atividade anticolinesterase, como controle positivo. A inativação da enzima, que pode ocorrer com os derivados do mentol e da mentona, leva ao acúmulo de acetilcolina, causando uma série de efeitos neurológicos. A formação de um halo branco (método Ellman) ao redor das manchas nas placas de TLC é uma indicação de inibição da AChE. O diâmetro dos halos (cm) foi comparado com o padrão positivo de Eserina (Tabela 5).

Tabela 5 - Tamanho dos halos para o teste acetilcolinesterase dos derivados do (-)-mentol e da (-)-mentona.

Amostras	Resultado	Tamanho do halo
		(mm)
MENTOL	positivo	8
MBENZ	positivo	5
MBENZ 4-OCH₃	positivo	8
MBENZ 4-NO₂	positivo	4
MBENZ 4-Cl	positivo	10
MAC	negativo	**
MDODEC	positivo	8
MEST	positivo	6
MCINAM	positivo	10
MCINAN 4-OCH₃	negativo	**
MENTIO	positivo	10
MENTISO	positivo	7
MHID 2,4-DINITRO	negativo	**
Padrão Eserina	positivo	9

** Não apresentou formação da “halo” de inibição

Conforme mostrado na Tabela 7, muitos derivados apresentaram resultados de inibição da enzima similar ou superar ao padrão utilizado. Destaca-se os derivados MBENZ 4-Cl, MCINAM e MENTIO que resultaram em valores maiores ao padrão, que poderão ser estudados posteriormente quanto a sua interação com a membrana celular. A inibição da enzima AChE é um indicativo da atividade larvicida, conforme afirma Oliveira (2019).

5.2.2 Avaliação atividade larvicida dos derivados do (-)-mentol e da (-)-mentona.

O *Aedes aegypti* se reproduz em água parada, depositando seus ovos, que ao entrarem em contato com o meio aquoso eclodem, reiniciando o ciclo. O estágio larval é um alvo atraente devido à fácil absorção de compostos dissolvidos no meio aquoso (GUZMAN et al., 2016). Os inseticidas comerciais ao serem colocados na água, podem colocar em risco a saúde humana e animal, devido a sua toxicidade. Assim, faz-se necessário o uso de inseticidas derivados de fontes naturais, uma vez que apresentam baixa toxicidade.

A busca por novas substâncias que possam ser usadas no controle químico alternativo contra o *Aedes aegypti*, estimula o uso de produtos oriundos de fontes naturais com potencial larvicida. Estes compostos possuem vantagens para a aplicação contra vetores de muitas doenças, dentre as quais podemos destacar a diminuição de resistência por parte dos insetos, serem biodegradáveis, menos tóxicos, sem efeitos colaterais contra outras espécies e complexidade de sua composição (ESMERALDO, 2016).

Muitas plantas do gênero *Menta* possuem uma diversidade de compostos presentes em seus óleos essenciais ou extratos metabólicos estudados quanto a sua atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*. Os compostos majoritários da maioria dessas plantas, apresentam mentol e mentona. A partir desta análise, foi realizada a síntese de derivados destes compostos para avaliação de sua possível atividade biológica. Os resultados obtidos nos ensaios larvicidas estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6 - CL50 da atividade larvicida dos derivados do (-)-mentol e da (-)-mentona.

COMPOSTOS	CL ₅₀ (ppm)
1. MENTOL	78,4
2. TEMEFOS	3,8
3. PIRIPROXYFEN	0,01
4. MBENZ	37 ± 0,62
5. MBENZ 4-OCH ₃	78 ± 0,43
6. MBENZ 4-NO ₂	98 ± 0,15
7. MBENZ 4-Cl	43 ± 0,37
8. MAC	75 ± 0,30
9. MDODEC	8 ± 0,45
10. MEST	> 100
11. MCINAM	47 ± 0,62
12. MCINAM 4-OCH ₃	63 ± 0,12
13. MENTIO	22 ± 0,35
14. MENTISO	65 ± 0,35
15. MHID 2,4-DINITRO	> 100

Fonte: o próprio autor.

A Tabela 6 apresenta os valores de CL₅₀ ideais para causar efeito tóxico sobre as larvas do *Aedes aegypti*. A avaliação da atividade larvicida exercida pelos produtos estudados mostrou bons resultados em que a maioria dos compostos revelou concentração abaixo de 100 ppm. Podendo-se destacar o MDODEC, que apresentou valor de CL₅₀ igual a 8 ppm.

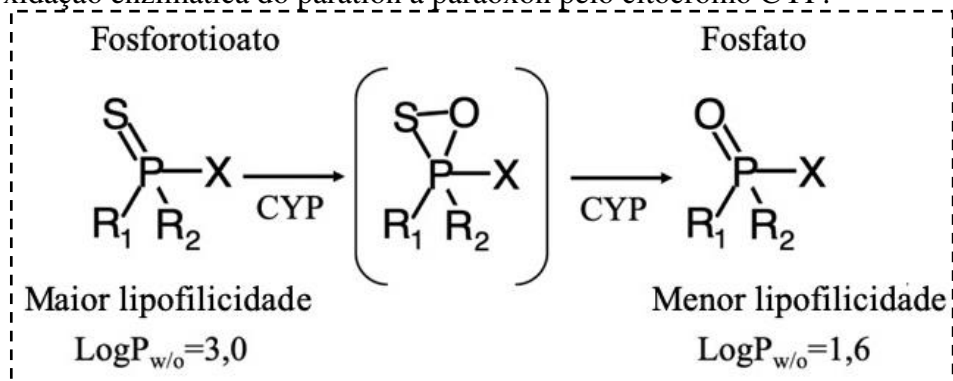
A atividade tóxica para as larvas revelada para os bioprodutos MDODEC, MBENZ, MBENZ 4-Cl E MCINAM, MCINAM 4-OCH₃ derivados do mentol, tiveram valores melhores que do mentol puro analisado no trabalho de Liu (2015), 77,97 ppm. Assim como os derivados obtidos da mentona, MENTIO e MENTISO, também apontaram resultados satisfatórios de CL₅₀, 22,08 e 65,00, respectivamente.

Compostos de fontes naturais apresentam uma ampla gama de propriedades biológicas, incluindo a larvicida (DEVI; BORA, 2017) e amostras apresentando valores de CL₅₀ < 100 ppm são consideradas ativas e constituem-se em fortes candidatas ao combate do mosquito.

Esses resultados podem ser compreendidos a partir de estudos encontrados na literatura (BHARATE et al., 2010) que compararam as lipofilicidades de compostos tioato (-P=S) e seu metabólico ativo, oxon (-P=O), e relacionaram-nas com a atividade larvicida apresentada por ambos. Foi observado que os compostos parathion (fosforotioato) e paraoxon (fosfato) apresentaram distintos valores de coeficiente de partição (Log P_{w/o}), 3,0 e 1,6, respectivamente.

Apesar de não apresentar atividade na forma de tioato, a maior lipofilicidade do paration facilita sua penetração na célula em comparação com o paraoxon. Uma vez dentro da célula, o fosforotioato é facilmente oxidado pelo citocromo P450 (CYP) em fosfato, composto de alta atividade inibidora da AChE, provocando os efeitos neurotóxicos observados pelo acúmulo do neurotransmissor acetilcolina (Figura 59) (VERHEYEN; STOKS, 2019). Isso explica à excelente atividade larvicida do composto MDODEC e a diminuição da atividade do MENTIO, uma vez que apresenta menor lipofilicidade (Figura 59).

Figura 59 - Oxidação enzimática do paration a paraoxon pelo citocromo CYP.



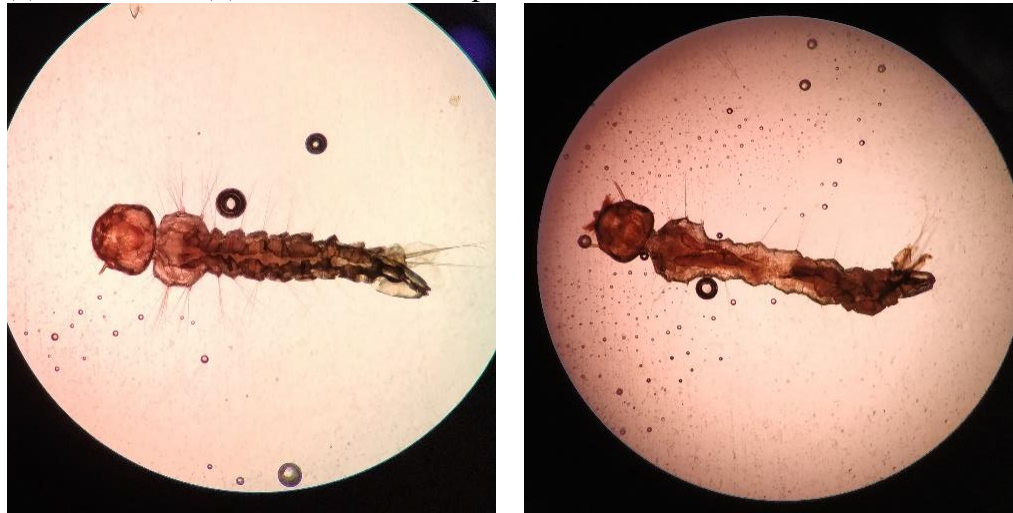
Fonte: VERHEYEN; STOKS, 2019.

Outra classe de compostos utilizados atualmente no combate ao *Aedes aegypti*, são os piridínicos, como o piriproxifen, disponíveis comercialmente. Em vista disso, na busca de compostos com atividade larvicida de potencial promissor, sintetizou-se derivados da mentona que apresentassem cadeias aromáticas. De forma geral, o MENTISO E MHID 2,4-DINITRO não apresentaram atividade satisfatória, ou seja, tiveram resultado de sua concentração letal (CL50) pior do que o MENTIO (Tabela 1). Esperava-se que esse composto apresentasse o mesmo comportamento similar aos larvicidas comerciais, parathion e piriproxifen, inibindo o desenvolvimento do mosquito mantendo-o na fase larval.

5.2.2.1 Alterações morfológicas

A análise da morfologia externa das larvas resultantes dos ensaios larvicidas foi realizada com o objetivo de verificar a ação ativa dos bioprodutos sobre estas. Após serem retiradas dos recipientes de origem, as larvas mortas foram cuidadosamente dispostas em lâminas de vidro, identificadas e levadas para leitura em um microscópio (Microscope micrometer 300X). As fotos obtidas estão representadas na Figura 60.

Figura 60 - Fotos de larvas do 3º estágio do *Aedes aegypti* após a ação dos bioprodutos: MDODEC (a) e MENTIO (b), usando microscópio.



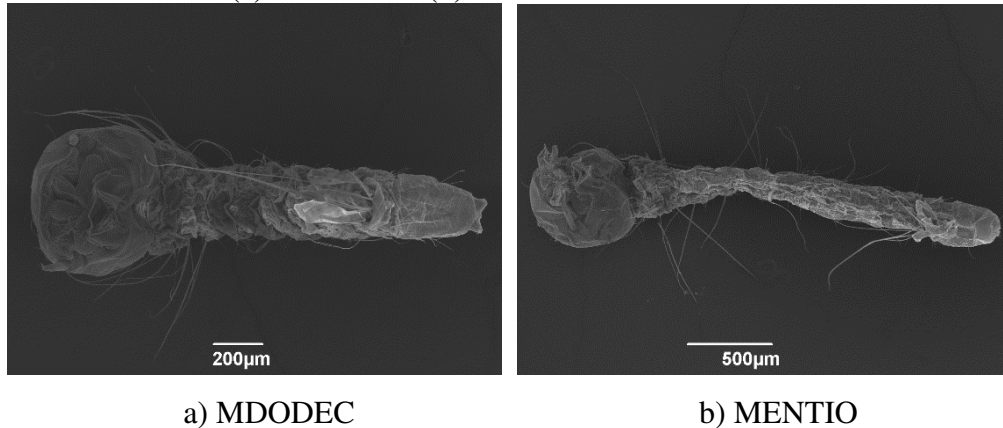
a) MDODEC

b) MENTIO

Fonte: o próprio autor.

Foram realizadas micrografias (MEV) em equipamento JEOL JSM-6390LV Scanning Electron Microscope, pertencente ao laboratório LIVEDIH, coordenado pela professora Jacenir Mallett, localizado no Pavilhão Carlos Chagas, Fio Cruz, Rio de Janeiro, Figura 61.

Figura 61 - Micrografias de larvas do 3º estágio do *Aedes aegypti* após a ação dos bioprodutos: MDODEC (a) e MENTIO (b).

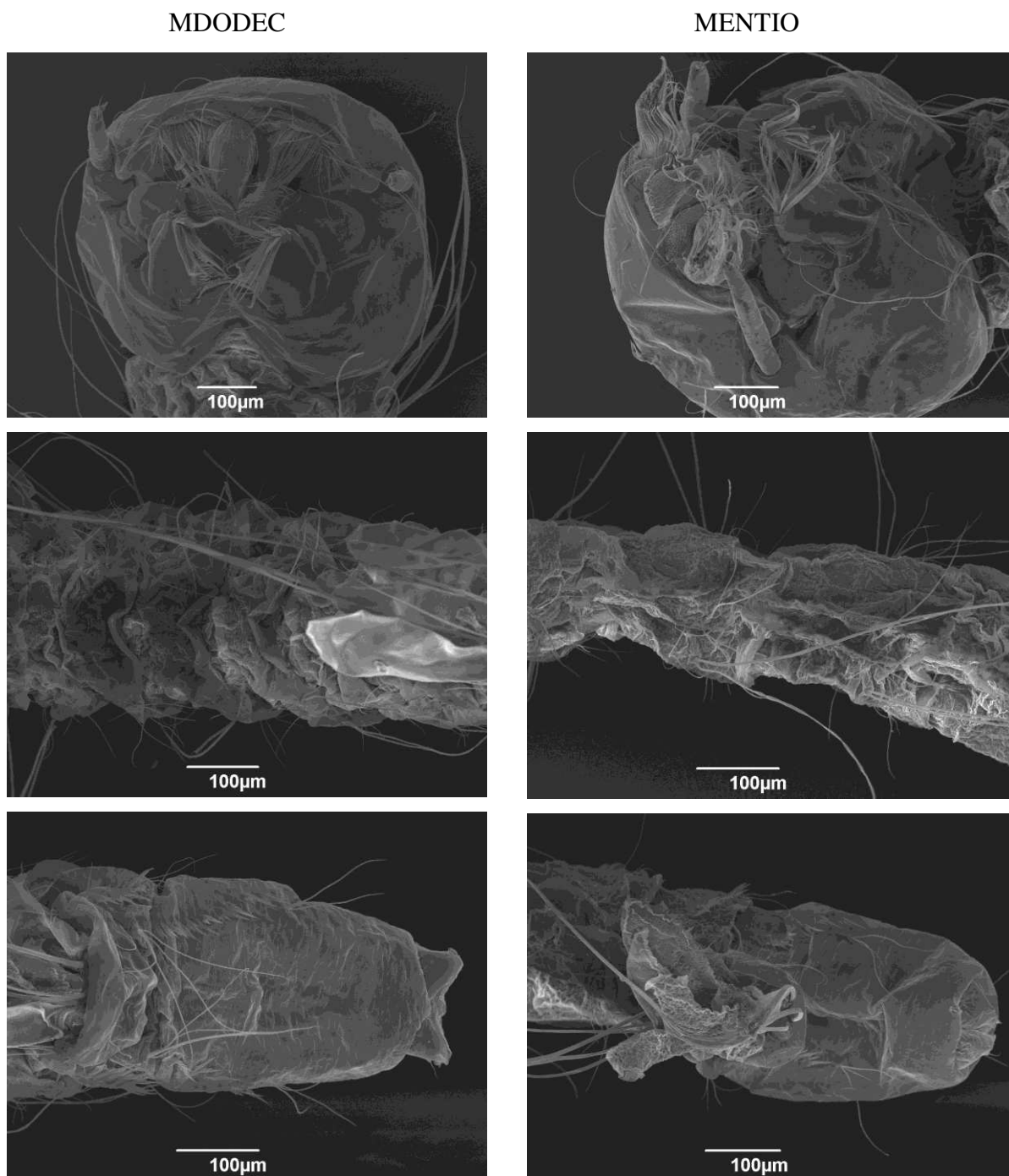


Fonte: o próprio autor.

A Figura 61a e Figura 61b apresentam a morfologia externa das larvas expostas aos derivados MDODEC e MENTIO. Através das figuras, é possível perceber que as estruturas das larvas foram preservadas: cabeça, torácio e abdômen. Mas foram observadas alterações em algumas partes, como na Figura 61a em que se percebe o abdômen comprimido, enquanto na Figura 61b um corpo afinado.

As principais alterações foram: perda de cerdas, redução na espessura do exoesqueleto, observado principalmente para as larvas expostas ao MENTIO (Figura 62b), e compressão do abdômen para as larvas expostas ao MDODEC (Figura 62a). Vale ressaltar que o derivado MENTIO paralisou as larvas após 1 h de contato, levando ao endurecimento e contração do exoesqueleto em 24 h. Os resultados obtidos a partir da análise morfológica externa mostram que a exposição aos compostos influenciou diretamente na modificação da estrutura das larvas (como a perda de cerdas importantes na captação de oxigênio para a sobrevivência) e deformação corporal são algumas das modificações que conseqüentemente culminaram para a morte das larvas.

Figura 62 - Micrografias ampliadas de larvas do 3º estágio do *Aedes aegypti* após a ação dos bioprodutos: MDODEC (a) e MENTIO (b).



Fonte: o próprio autor.

5.2.3 Análise de ansiedade em zebrafish

A ansiedade é um transtorno mental caracterizado por preocupação ou medo excessivo, resultando em inquietação, fadiga, falta de concentração, irritabilidade e insônia (SANTOMAURO et al., 2021; SILVA et al., 2021). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2017, cerca de 3,6% da população mundial sofreu desse transtorno, e o Brasil representou 32,33% de todos os problemas relacionados à ansiedade no continente americano. Em 2020, o mundo enfrentou o surgimento da pandemia do COVID-19, que levou a muitas perguntas sobre seus efeitos a longo prazo nos problemas de saúde mental. Estima-se agora que 76,2 milhões de casos em todo o mundo tenham uma prevalência de 4.800 casos por 100.000 habitantes (SANTOMAURO et al., 2021). As estratégias impostas para reduzir a disseminação do Sars-Cov-2 interferiram diretamente no acesso ao tratamento e medicamentos adequados para os transtornos mentais.

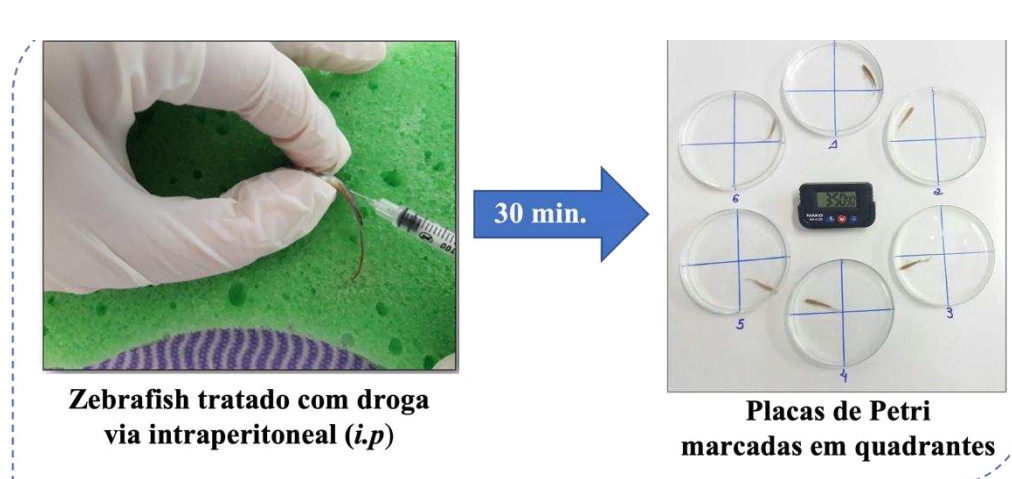
O tratamento da ansiedade atualmente é baseado na ingestão diária de benzodiazepínicos (BZD), um agonista do ácido gama-aminobutírico (g-GABA) (FERREIRA et al., 2019). O complexo proteico GABAA é um ligante endógeno de g-GABA, o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central. O BZD se liga às subunidades alfa (a) e gama (g) do receptor GABAA, bloqueando uma conformação que tem maior afinidade ao GABA, levando a efeitos sedativos e ansiolíticos mais rápidos e fortes (JÚNIOR et al., 2018; BUXERAUD; FAURE, 2019).

Os BZDs, ansiolíticos sintéticos ou não, como alprazolam, bromazepam, clonazepam e diazepam (DZP), são usados para sedação e anestesia geral, no entanto, essa classe de medicamentos está relacionada à alta variabilidade na resposta individual e efeitos colaterais duradouros, o que aumenta as preocupações com o uso diário (CORNETT et al., 2018). Assim, a descoberta de novas drogas sintéticas ou naturais com propriedades BZD e, menor toxicidade, é primordial para futuros tratamentos de ansiedade (SILVA et al., 2021).

Uma análise amplamente utilizada em roedores e atualmente adaptada para peixes, com o objetivo de avaliar ansiedade, é o teste claro/escuro (Figura 63). Este teste baseia-se no paradigma da aversão inata do zebrafish a áreas iluminadas, similar aos roedores e camundongos (MAXIMINO et al., 2010). Dessa forma, os animais são

tratados com a droga e adicionados na zona clara do aquário. O efeito ansiolítico é quantificado com base na porcentagem de permanência na zona clara (%PZC), durante 5 minutos.

Figura 63 - Ilustração do aquário onde é realizado o teste claro/escuro.



Fonte: o próprio autor.

O efeito ansiolítico dos derivados do (-)-mentol foram avaliados quanto sua eficiência ansiolítica, e que esses compostos têm efeito sedativo mediado pelo receptor GABAA. Está cientificamente comprovado que medicamentos à base de extratos vegetais são eficazes no tratamento de transtornos de ansiedade (BEZERRA et al., 2020; SILVA et al., 2020; SILVA et al., 2021). Desta forma, o mentol e seus derivados surgem como uma alternativa visto sua grande variedade de aplicações. (KAWASAKI et al., 2013; STRINGARO; COLONE; ANGIOLELLA, 2018).

Na literatura há diversos trabalhos relacionados com óleos essenciais como principal constituinte sendo o (-)-mentol, como o que o óleo essencial mentha piperita foi testado para combater o crescimento dos fungos *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani* presentes nas sementes do feijão, utilizando cerca de 2000 ppm de concentração do óleo essencial resultando em um efeito inibitório de 100% no crescimento dos fungos (KHALEDI; TAHERI; TARIGHI, 2015).

A obtenção de novos compostos, oriundos de uma fonte natural, poderão ser testados e avaliada sua eficácia ansiolítica. Foi obtido derivado do (-)-mentol com ácido dodecanóico (MDODEC). Para avaliação citotóxica e ansiolítica foi utilizado o Zebrafish (*Danio rerio*), esta espécie ganhou destaque em neurociência comportamental

e pesquisa em psicofarmacologia, pois são peixes que preferem o escuro e a incidência do fármaco com propriedades ansiolíticas alteram seu comportamento, fazendo-os habitar em regiões mais claras (SHAMS et al., 2018). Esses peixes surgiram como uma alternativa viável para análises comportamentais, pois apresentam 70% de similaridade genética com os humanos, enquanto 84% dos genes conhecidos para doenças humanas são amplamente expressos no peixe-zebra (BALLY-CUIF; NORTON, 2010; KUNDAP et al., 2017; MUSSULINI et al., 2013).

O mecanismo de ação do MDODEC modula os receptores GABA alostéricos por ligação ao local do receptor BZD (HANRAHAN; CHEBIB; JOHNSTON, 2011; JOHNSTON, 2015). Por esse motivo, estudos têm sido realizados para investigar o potencial ansiolítico e anticonvulsivante desses compostos (COPMANS et al., 2018; FERREIRA et al., 2021; ZHANG et al., 2020; ZHU et al., 2017).

Suas atividades neuroprotetoras se devem às propriedades antioxidantes, que estimulam a regeneração neuronal induzindo a neurogênese e prevenindo a apoptose dessas células devido ao estresse oxidativo (AMANZADEH et al., 2019; FERREIRA et al., 2021). Para elucidar as possíveis interações diretas dessas moléculas com os receptores GABAA, foi realizado um estudo de docking molecular.

Devido à semelhança genética e fisiológica entre o peixe-zebra e os humanos, esse pequeno vertebrado aquático passou a ser amplamente utilizado como modelo para pesquisas toxicológicas, dada sua relevância na toxicologia translacional (Cassar et al., 2020; Horzmann; Freeman, 2018). No teste de toxicidade, as três amostras avaliadas não demonstraram ser tóxicas para o peixe-zebra até 96 horas de análise, conforme ilustrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados dos testes de toxicidade aguda (96h).

<i>AMOSTRA</i>	<i>Mortalidade</i>				<i>96h</i>
	CN	D1	D2	D3	<i>DL₅₀ (mg/kg) / IV</i>
MDEDOC	0	0	0	0	> 40

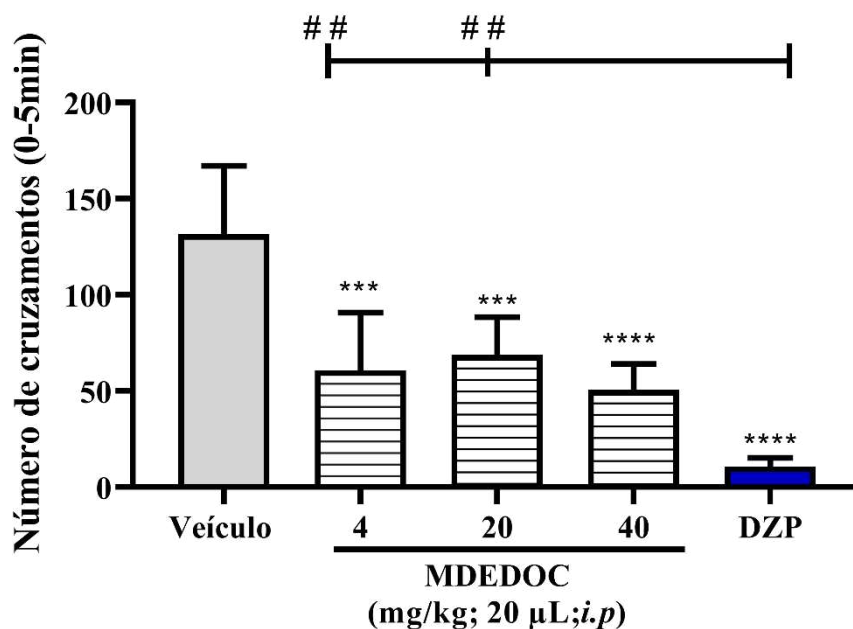
Fonte: Autor; CN- Grupo controle negativo: DMSO 3%. D1 – Dose 1 (4 mg/kg). D2 – Dose 2 (20 mg/kg). D3 – Dose 3 (40 mg/kg). DL50-Dose Letal para matar 50% dos Zebrafish adulto; IV – intervalo de confiança;

O peixe-zebra possui muitas habilidades sensoriais similares às dos seres humanos, como visão, olfato, paladar, tato, equilíbrio e audição. Além disso, apresenta

uma grande variedade de comportamentos que vão desde respostas simples a estímulos até comportamentos complexos como sono, dor, afetividade, locomoção, interação social e cognição (ORGER; DE POLAVIEJA, 2017).

Para avaliar se produtos químicos ou extratos afetam o sistema nervoso central (SNC) em peixes-zebra, à análise comportamental é essencial. Um dos parâmetros estudados é a atividade locomotora, no qual é usado para avaliar sua hiperatividade que é um indicador de ansiedade (FERREIRA et al., 2021). Por exemplo, a MDEDOC modificou significativamente a locomoção dos animais avaliados através do teste de campo aberto (** $p < 0,01$ vs. Controle; **** $p < 0,0001$ vs. DZP) (GUPTA et al., 2014) (Figura 64). O tratamento do zebrafish com drogas ansiolíticas pode aumentar sua atividade exploratória em campo aberto, induzir um efeito sedativo e diminuir sua atividade locomotora ((FERREIRA et al., 2021)). Portanto, a atividade ansiolítica do MDODEC foi avaliada pelo teste claro e escuro.

Figura 64 - Avaliação da locomoção dos animais avaliados através do teste de campo aberto.



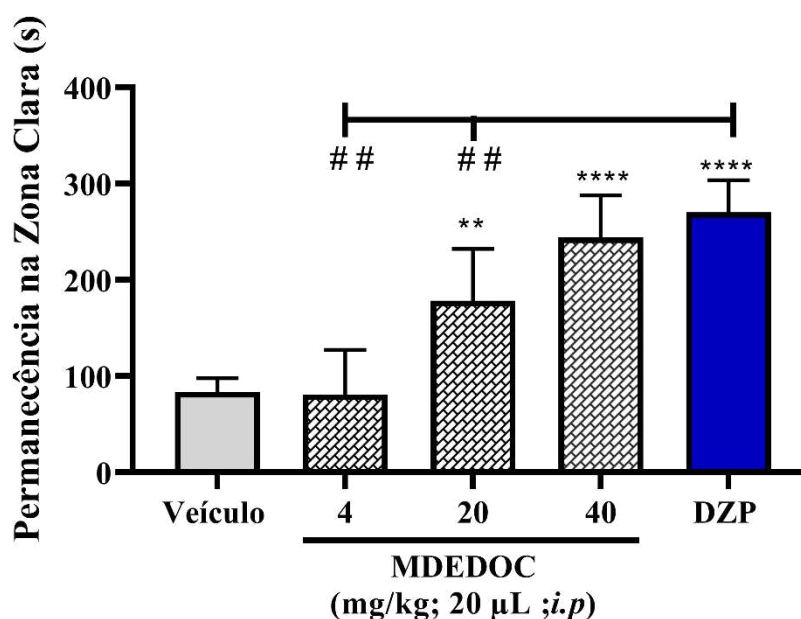
Fonte: o próprio autor.

Foi realizado um estudo para observar o comportamento de ansiedade em animais utilizando um teste claro/escuro. Os pesquisadores utilizaram o zebrafish adulto

para o experimento, já que essa espécie tende a evitar áreas iluminadas de forma natural. Um aquário de vidro foi utilizado para o experimento, sendo dividido em áreas claras e escuras para simular um novo ambiente raso que pudesse induzir comportamentos de ansiedade nos animais (GONÇALVES et al., 2020). Para testar o efeito ansiolítico da MDEDOC, 20 μ L foram administrados intraperitonealmente nos animais, com doses de 4, 20 e 40 mg/kg. Grupos de controle negativo e positivo foram utilizados, tendo sido administrados 3% de DMSO e 40 mg/kg de solução de DZP, respectivamente, nos animais selecionados para esses grupos. Após 30 minutos, cada animal foi colocado individualmente na área clara do aquário e o tempo de permanência foi medido durante 5 minutos de observação. Como resultado, o estudo indicou que a MDEDOC pode ter um efeito ansiolítico em zebrafish adultos (GEBAUER et al., 2011).

Na avaliação do efeito ansiolítico, observamos que a **MDEDOC** aumentou o tempo de permanência dos animais na área clara do aquário, semelhante ao grupo tratado com DZP (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs. Controle) (Figura 65).

Figura 65 - Avaliação do efeito ansiolítico do MDODEC.



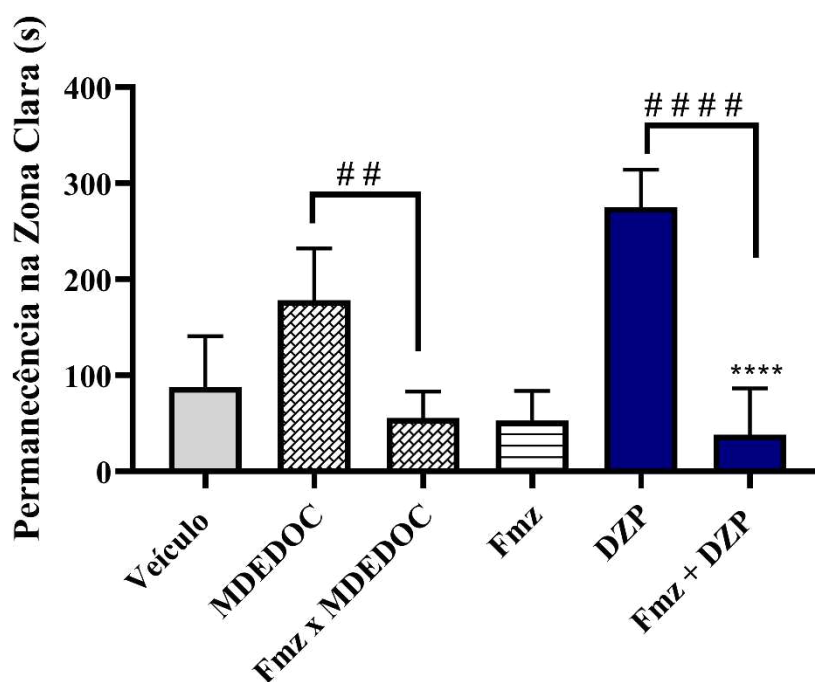
Fonte: o próprio autor.

Os mecanismos de ação das amostras que possuíram efeito ansiolítico foram identificados através do pré-tratamento com flumazenil (modulador neutralizante de moduladores positivos) (BENNEH et al., 2017). Zebrafish (n = 6/grupo) foram pré-

tratados com flumazenil (4 mg/kg; 20 μ L; *i.p.*). Após 15 min, foi administrada a menor dose efetiva das amostras com efeito ansiolítico encontrada no teste de avaliação do efeito ansiolítico (ver seção anterior). Um grupo tratado com DMSO a 3 % (veículo; 20 μ L; *i.p.*) foi usado como controle negativo. O DZP (40 mg/kg, 20 μ L; *i.p.*) foi usado como agonista do canal de ligação dos Benzodiazepínicos no GABA_A. Após 30 min de tratamentos, os animais foram submetidos ao teste claro/escuro conforme descrito na seção anterior.

O mecanismo de ação ansiolítica via GABA foi determinado pelo pré-tratamento com flumazenil. As menores doses com efeito ansiolítico e o DZP (40 mg/kg) tiveram o efeito ansiolítico bloqueado significativamente pelo flumazenil ([#] [#] $p < 0,01$; vs. MDEDOC e DZP), voltando a apresentar comportamento de ansiedade ao permanecerem maior parte do tempo na área escuro do aquário (Figura 66).

Figura 66 - Mecanismo de ação ansiolítica via GABA.



Fonte: o próprio autor.

Assim, o estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade, o potencial larvicida e o potencial ansiolítico dos derivados sintetizados. Com base nessas considerações e sabendo que os compostos sintetizados no trabalho foram avaliados quanto a atividade

larvicida e não apresentou toxicidade em relação as peixes zebra, modulando ambientes onde podem estar presentes outros organismos aquáticos, além das larvas do *Aedes aegypti*, tem-se compostos promissores que poderão atuar como larvicida. Além de apresentarem potencial ansiolítico promissor.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os biolarvicidas foram testados quanto a inibição da enzima acetilcolinesterase, utilizando como padrão a Eserina. Os resultados foram avaliados quanto o tamanho do halo de inibição, sendo o halo do padrão Eserina de 9 mm. Três derivados, MDODEC, MBENZ 4-Cl, MCINAM e MENTIO, obtiveram halo de inibição de 10 mm. Em trabalhos anteriores, a atividade relacionada a ação larvicida, está ligada a inibição da enzima acetilcolinesterase.

O trabalho relata a síntese e caracterização de ésteres derivados do (-)-mentol utilizando uma metodologia simples com DCC/DMAP. Os derivados sintetizados foram testados frente as larvas do *Aedes aegypti* com destaque para o MDODEC com CL₅₀ de 8ppm, onde fármacos com CL₅₀ abaixo de 100 ppm pode ser uma boa opção para substituir os compostos existentes.

O processo de síntese de tiossemicarbazonas derivadas da (-)-mentona tiveram síntese limpa, uma vez que não se utilizou reagentes tóxicos e foram obtidos com elevado rendimento reacional. Para a atividade larvicida, destaca-se o e MENTIO com CL₅₀ de 22ppm. Nenhum produto obtido desta síntese teve sua atividade larvicida avaliada anteriormente.

Alguns compostos sintetizados apresentaram resultados promissores quanto a atividade ansiolítica. Os derivados foram testados e avaliados em comparação ao fármaco diazepam que já é empregado no mercado com aplicação ansiolítica.

Os resultados são significativos, pois apresentam alternativas interessantes na obtenção de novos compostos mais seguros e menos tóxicos, em substituição aos larvicidas comerciais e compostos ansiolíticos.

REFERÊNCIAS

- ABUALHASAN, M. N. et al. GC Method Validation for the Analysis of Menthol in Suppository Pharmaceutical Dosage Form. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2017, 2017.
- ALMEIDA, M. O. DE. BIOMASSA NORDESTINA: COMBATE AO AEDES AEGYPTI E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANSIOLÍTICO EM ZEBRAFISH ADULTO (DANIO RERIO). **TESE**, v. 2023, p. 122, 2023.
- ALMEIDA, M. et al. Cardol-Derived Organophosphorothioates as Inhibitors of Acetylcholinesterase for Dengue Vector Control. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 12, p. 2634–2641, 2019.
- AMANZADEH, E. et al. Quercetin conjugated with superparamagnetic iron oxide nanoparticles improves learning and memory better than free quercetin via interacting with proteins involved in LTP. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2019.
- AUDOUZE, K.; TABOUREAU, O.; GRANDJEAN, P. A systems biology approach to predictive developmental neurotoxicity of a larvicide used in the prevention of Zika virus transmission. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 354, n. November 2017, p. 56–63, 2018.
- AWASTHI, M. et al. Terpenoids as promising therapeutic molecules against Alzheimer's disease: amyloid beta- and acetylcholinesterase-directed pharmacokinetic and molecular docking analyses. **Molecular Simulation**, v. 44, n. 1, p. 1–11, 2018.
- BALLY-CUIF, L.; NORTON, W. Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. **BMC Neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 11–90, 2010.
- BENELLI, G. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. **Parasitology Research**, v. 114, n. 8, p. 2801–2805, 2015.
- BENNEH, C. K. et al. Maerua angolensis stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT systems. **J. Ethnopharmacol.**, v. 207, p. 129–145, jul. 2017.
- BENNETT, S. N. et al. Epidemic dynamics revealed in dengue evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 4, p. 811–818, 2010.
- BJØRLING-POULSEN, M.; ANDERSEN, H. R.; GRANDJEAN, P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 7, 2008.
- BLASER, R. E.; ROSEMBERG, D. B. Measures of anxiety in zebrafish (Danio rerio): Dissociation of black/white preference and novel tank test. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2012.

BOSCO SIQUEIRA, J. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 48–53, 2005.

BRADY, O. J. et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, 2012.

BRADY, O. J.; HAY, S. I. The Global Expansion of Dengue: How *Aedes aegypti* Mosquitoes Enabled the First Pandemic Arbovirus. **Annual Review of Entomology**, v. 65, n. 1, p. 1–18, 2020.

BUXERAUD, J. Les benzodiazépines. p. 24–26, 2019.

CHAN, M. Treatment, prevention and control global strategy for dengue prevention and control. 2012.

CHARAN, S. S. et al. Comparative analysis of midgut bacterial communities of *Aedes aegypti* mosquito strains varying in vector competence to dengue virus. **Parasitology Research**, v. 112, n. 7, p. 2627–2637, 2013.

CHOUIN-CARNEIRO, T. et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–11, 2016.

COPMANS, D. et al. Methylated flavonoids as anti-seizure agents: Naringenin 4',7'-dimethyl ether attenuates epileptic seizures in zebrafish and mouse models. **Neurochemistry International**, v. 112, p. 124–133, 2018.

CURRIN, A. et al. Engineering the “missing Link” in Biosynthetic (-)-Menthol Production: Bacterial Isopulegone Isomerase. **ACS Catalysis**, v. 8, n. 3, p. 2012–2020, 2018.

DA SILVA, A. W. et al. Anxiolytic-like effect of natural product 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone isolated from *Croton anisodontus* in adult zebrafish via serotonergic neuromodulation involvement of the 5-HT system. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 394, n. 10, p. 2023–2032, 2021.

DA SILVA, F. F. M. et al. Synthesis of chiral esters and alcohols via enantioselective esterification with *Citrus aurantium* peels as biocatalyst. **Industrial Crops and Products**, v. 96, p. 23–29, 2017.

DE CARVALHO, G. H. F. et al. Larvicidal and pupicidal activities of eco-friendly phenolic lipid products from *Anacardium occidentale* nutshell against arbovirus vectors. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 6, p. 5514–5523, 2019.

DIAGNOSIS, G. F. O. R. DENGUE. **Psychiatric News**, v. 41, n. 1, p. 29–29, 2009.

DÓRIA, G. A. A. et al. A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 6, p. 615–620, 2017.

- DUANE J. GUBLER; EONG OOI; SUBHASH VASUDEVAN; JEREMY FARRAR. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. 2nd Editio ed. [s.l: s.n.].
- DUARTE, J. L. et al. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of rosmarinus officinalis essential oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 2, p. 189–192, 2015.
- DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Chikungunya virus and the mosquito vector aedes aegypti in new Caledonia (south pacific region). **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1036–1041, 2012.
- EMA, T. et al. Highly active lipase immobilized on biogenous iron oxide via an organic bridging group: the dramatic effect of the immobilization support on enzymatic function. **Green Chemistry**, v. 13, n. 11, p. 3187, 2011.
- ESMERALDO, M. A. BIOPRODUTOS DERIVADOS DE BIOMASSA VEGETAL NO COMBATE AO MOSQUITO TRANSMISSOR DA DENGUE - Aedes aegypti. **Journal of Environmental Sciences**, p. 2772, 2016.
- FERREIRA, M. K. A. et al. Anxiolytic-like effect of chalcone N-{4'[(2E)-3-(3-nitrophenyl)-1-(phenyl)prop-2-en-1-one]} acetamide on adult zebrafish (Danio rerio): Involvement of the 5-HT system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 526, n. 2, p. 505–511, 2020.
- FERREIRA, M. K. A. et al. Chalcones reverse the anxiety and convulsive behavior of adult zebrafish. **Epilepsy and Behavior**, v. 117, 2021.
- FUJIWARA, G. M. et al. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against Aedes aegypti. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, n. January, p. 238–244, 2017.
- GANDY, M. et al. Anxiety in epilepsy: A neglected disorder. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 78, n. 2, p. 149–155, 2015.
- GAWEL, K. et al. Seizing the moment: Zebrafish epilepsy models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 116, p. 1–20, 2020.
- GEBAUER, D. L. et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 3, p. 480–486, 2011.
- GONÇALVES, N. G. G. et al. Protein fraction from Artocarpus altilis pulp exhibits antioxidant properties and reverses anxiety behavior in adult zebrafish via the serotonergic system. **Journal of Functional Foods**, v. 66, n. December 2019, p. 103772, 2020.
- GOULD, E. A.; SOLOMON, T. Pathogenic fl aviviruses. v. 371, 2008.
- GRUBAUGH, N. D. et al. Genomic epidemiology reveals multiple introductions of Zika virus into the United States. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 401–405, 2017.
- GRZYBOWSKI, A. et al. Synergistic larvicidal effect and morphological alterations

induced by ethanolic extracts of *Annona muricata* and *Piper nigrum* against the dengue fever vector *Aedes aegypti*. **Pest Management Science**, v. 69, n. 5, p. 589–601, 2013.

GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and globalization: The unholy trinity of the 21 st century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4 SUPPL., p. 3–11, 2011.

GUPTA, B.; REDDY, B. P. N. Fight against dengue in India: Progresses and challenges. **Parasitology Research**, v. 112, n. 4, p. 1367–1378, 2013.

GUPTA, P. et al. Assessment of locomotion behavior in adult Zebrafish after acute exposure to different pharmacological reference compounds. **Drug Development and Therapeutics**, v. 5, n. 2, p. 127, 2014.

HANRAHAN, J. R.; CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. R. Flavonoid modulation of GABA A receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 2, p. 234–245, 2011.

HARBACH, R. E.; HOWARD, T. M. Index of currently recognized mosquito species (Diptera: Culicidae). **European Mosquito Bulletin**, v. 23, n. August, p. 1–66, 2007.

HE, D. et al. Evaluation of the Anxiolytic and Antidepressant Activities of the Aqueous Extract from *Camellia euphlebia* Merr. ex Sealy in Mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

HUMPHREY, J. M. et al. Dengue and chikungunya seroprevalence among Qatari nationals and immigrants residing in Qatar. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2019.

JACCARD, G. et al. Investigation of menthol content and transfer rates in cigarettes and Tobacco Heating System 2.2. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 101, n. November 2018, p. 48–52, 2019.

JAMES, S. L. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, p. 1789–1858, 2018.

JANKOWSKA, M. et al. The unusual action of essential oil component, menthol, in potentiating the effect of the carbamate insecticide, bendiocarb. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 158, n. September 2018, p. 101–111, 2019.

JHA, M. et al. Recent advancement in the discovery and development of anti-epileptic biomolecules: An insight into structure activity relationship and Docking. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 153, n. June, p. 105494, 2020.

JOHNSTON, G. A. R. Flavonoid nutraceuticals and ionotropic receptors for the inhibitory neurotransmitter GABA. **Neurochemistry International**, v. 89, p. 120–125, 2015.

KABIR, K. E. et al. Growth-disrupting, larvicidal and neurobehavioral toxicity effects of seed extract of *Seseli diffusum* against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 90, p. 52–60, 2013.

KANNER, A. M. Most antidepressant drugs are safe for patients with epilepsy at therapeutic doses: A review of the evidence. **Epilepsy and Behavior**, v. 61, p. 282–286, 2016.

KAWASAKI, H. et al. Inhibition by menthol and its related chemicals of compound action potentials in frog sciatic nerves. **Life Sciences**, v. 92, n. 6–7, p. 359–367, 2013.

KHALEDI, N.; TAHERI, P.; TARIGHI, S. Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 3, p. 704–717, 2015.

KHODAVERDILOO, K. R. et al. Synergistic effects of nonylphenol ethoxylates and polyethylene glycols on performance of gas hydrate kinetic inhibitor. **Journal of Molecular Liquids**, v. 216, n. January, p. 268–274, 2016.

KNECHT, H. et al. Impact of mosquito age and insecticide exposure on susceptibility of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to infection with Zika virus. **Pathogens**, v. 7, n. 3, p. 1–9, 2018.

KONISHI, E. Issues related to recent dengue vaccine development. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4 SUPPL., p. 63–71, 2011.

KOT, B. et al. Antimicrobial activity of five essential oils from lamiaceae against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Natural Product Research**, v. 6419, p. 1–5, 2018.

KUMAR, A.; SINGH, S. P.; CHHOKAR, S. S. Antimicrobial Activity of the Major Isolates of Mentha Oil and Derivatives of Menthol. **Analytical Chemistry Letters**, v. 1, n. 1, p. 70–85, 2011.

KUMAR, P. et al. Biocontrol potential of essential oil monoterpenes against housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, n. 1, p. 1–6, 2014.

KUNDAP, U. P. et al. Zebrafish as a model for epilepsy-induced cognitive dysfunction: A pharmacological, biochemical and behavioral approach. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. AUG, p. 1–13, 2017.

LEE, C. Sublethal Effects of Insecticides on Longevity , Fecundity and Behaviour of Insect Pests : a Review. v. 11, n. 1, 2000.

LIMA, E. P. et al. *Aedes aegypti* resistance to temefos in counties of Ceará State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 259–263, 2006.

LIMA, T. C. et al. Larvicidal activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and derivatives. **Chemosphere**, v. 104, p. 37–43, 2014.

LOW, S. L. et al. Dengue seroprevalence of healthy adults in Singapore: Serosurvey among blood donors, 2009. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 1, p. 40–45, 2015.

LUO, Y. et al. (-)-menthol increases excitatory transmission by activating both TRPM8 and TRPA1 channels in mouse spinal lamina II layer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 8, n. xxxx, p. 6–11, 2019.

MAGALHÃES, F. E. A. et al. Adult Zebrafish (*Danio rerio*): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. **Zebrafish**, v. 14, n. 5, p. 422–429, 2017.

MAHMUD, S. S. et al. Optimizing the preparation conditions and characterization of a stable and recyclable cross-linked enzyme aggregate (CLEA)-protease. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 3, n. 1, p. 3, 2016.

MARCHAND, E. et al. Autochthonous case of dengue in France, October 2013. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 50, p. 1–6, 2013.

MOYES, C. L. et al. Correction to: Contemporary status of insecticide resistance in the major aedes vectors of arboviruses infecting humans (PLoS Negl Trop Dis). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–2, 2021.

MULDERIJ-JANSEN, V. et al. Effectiveness of Aedes-borne infectious disease control in Latin America and the Caribbean region: A scoping review. **PLoS ONE**, v. 17, n. 11 November, p. 1–28, 2022.

MUSSULINI, B. H. M. et al. Seizures Induced by Pentylentetrazole in the Adult Zebrafish: A Detailed Behavioral Characterization. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013.

NOUR, A. H. et al. A study of the essential oils of four sudanese accessions of basil (*Ocimum basilicum* L.) against *Anopheles* mosquito larvae. **American Journal of Applied Sciences**, v. 6, n. 7, p. 1359–1363, 2009.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 125–137, 2007.

OLIVEIRA, M. S. C. et al. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. **Acta Tropica**, v. 117, n. 3, p. 165–170, 2011.

OOI, E. E.; GOH, K. T.; GUBLER, D. J. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 887–893, 2006.

ORGER, M. B.; DE POLAVIEJA, G. G. Zebrafish Behavior: Opportunities and Challenges. **Annual Review of Neuroscience**, v. 40, n. March, p. 125–147, 2017.

ORHAN, I. et al. Activity of Essential Oils and Individual Components against Acetyl- and Butyrylcholinesterase. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 63, n. 7–8, p. 547–553, 2008.

PACHER, P.; KECSKEMETI, V. Cardiovascular Side Effects of New Antidepressants and Antipsychotics: New Drugs, old Concerns? **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 20, p. 2463–2475, 2005.

PAHO. **Tool for the Diagnosis and Care.** [s.l: s.n.].

PANDEY, S. K. et al. Structure-activity relationships of monoterpenes and acetyl derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Management Science**, v. 69, n. 11, p. 1235–1238, 2013.

PANDIYAN, G. N.; MATHEW, N.; MUNUSAMY, S. Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, n. March, p. 549–556, 2019.

POWELL, J. R. Perspective piece mosquito-borne human viral diseases: Why *aedes aegypti*? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 6, p. 1563–1565, 2018.

RADHIKA SAMARASEKERA, INDIRA S WEERASINGHE, AND K. P. H. Review Semiochemicals for biting y control: their identification and exploitation. **Pest Management Science**, v. 657, n. April, p. 647–657, 2008.

RADKE, E. G. et al. Dengue outbreak in Key West, Florida, USA, 2009. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 135–137, 2012.

REITER, P. et al. Texas lifestyle limits transmission of dengue virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 86–89, 2003.

RODRIGUES, P. et al. Nociceptive-like behavior and analgesia in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Physiology & Behavior**, v. 210, n. March, p. 112648, 2019.

SALLES TREVISAN, M. T. et al. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Quimica Nova**, v. 26, n. 3, p. 301–304, 2003.

SALPEKAR, J. A. et al. The intersections of stress, anxiety and epilepsy. **International Review of Neurobiology**, v. 152, p. 195–219, 2020.

SANTOS, L. M. M. et al. Fatty acid-rich volatile oil from *Syagrus coronata* seeds has larvicidal and oviposition-deterrent activities against *Aedes aegypti*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 100, p. 35–40, 2017.

SCHULTE, H. L. et al. Degradation evaluation and toxicity profile of bilobol, a promising eco-friendly larvicide. **Chemosphere**, v. 263, 2021.

SHAMS, S. et al. The zebrafish as a promising tool for modeling human brain disorders: A review based upon an IBNS Symposium. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 85, p. 176–190, 2018.

SILVA-FILHA, M. H. N. L. et al. Bacterial toxins active against mosquitoes: Mode of action and resistance. **Toxins**, v. 13, n. 8, 2021.

SILVA MENDES, F. R. et al. GABAA receptor participation in anxiolytic and anticonvulsant effects of (E)-3-(furan-2-yl)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one in adult zebrafish. **Neurochemistry International**, v. 155, n. February,

2022.

SINGH, M. et al. Synthesis, antimicrobial evaluation, and QSAR analysis of 2-isopropyl-5-methylcyclohexanol derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 4, p. 511–522, 2012.

SIRISENA, P. D. N. N.; NOORDEEN, F. Evolution of dengue in Sri Lanka-changes in the virus, vector, and climate. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 6–12, 2014.

SOUZA, L. G. D. S. et al. Synthesis, antibacterial and cytotoxic activities of new biflorin-based hydrazones and oximes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 2, p. 435–439, 2016.

STRINGARO, A.; COLONE, M.; ANGIOLELLA, L. Antioxidant, Antifungal, Antibiofilm, and Cytotoxic Activities of Mentha spp. Essential Oils. **Medicines**, v. 5, n. 4, p. 112, 2018.

SUNDARARAJAN, B.; RANJITHA KUMARI, B. D. Novel synthesis of gold nanoparticles using Artemisia vulgaris L. leaf extract and their efficacy of larvicidal activity against dengue fever vector Aedes aegypti L. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 43, p. 187–196, 2017.

TAPIA-CONYER, R.; BETANCOURT-CRAVIOTO, M.; MÉNDEZ-GALVÁN, J. Dengue: An escalating public health problem in Latin America. **Paediatrics and International Child Health**, v. 32, n. SUPP1, p. 14–17, 2012.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Cryptosporidium, Giardia, Cryptococcus, Pneumocystis Genetic Variability: Cryptic Biological Species or Clonal Near-Clades? **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 4, 2014.

VENI, T.; PUSHPANATHAN, T.; MOHANRAJ, J. Larvicidal and ovicidal activity of Terminalia chebula Retz. (Family: Combretaceae) medicinal plant extracts against Anopheles stephensi, Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 3, p. 693–702, 2017.

WEAVER, S. C. et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Research**, v. 130, p. 69–80, 2016.

WEEKS, E. N. I. et al. Novel effective mosquito larvicide DL-methionine: Lack of toxicity to non-target aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 213, p. 112013, 2021.

WHITEHORN, J.; VAN, V. C. N.; SIMMONS, C. P. Dengue human infection models supporting drug development. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. SUPPL. 2, 2014.

ZHANG, J. LIANG et al. Quercetin affects shoaling and anxiety behaviors in zebrafish: Involvement of neuroinflammation and neuron apoptosis. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 105, n. July, p. 359–368, 2020.

ZHU, T. et al. Enhanced adsorption of fluoride by cerium immobilized cross-linked chitosan composite. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 194, p. 80–88, 2017.