



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

MAYARA OLIVEIRA DE ALMEIDA

**BIOMASSA DO LCC: COMBATE AO *Aedes Aegypti* E INVESTIGAÇÃO DO
POTENCIAL ANSIOLÍTICO EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

FORTALEZA

2023

MAYARA OLIVEIRA DE ALMEIDA

BIOMASSA DO LCC: COMBATE AO *Aedes Aegypti* E INVESTIGAÇÃO DO
POTENCIAL ANSIOLÍTICO EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Centro de Ciências, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química

Orientador: Profa. Dra. Selma Elaine Mazzetto.

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)

A449b Almeida, Mayara Oliveira de.
Biomassa do LCC: combate ao *Aedes aegypti* e investigação do potencial ansiolítico em zebrafish (*Danio rerio*) / Mayara Oliveira de Almeida. – 2023.
114 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Selma Elaine Mazzetto.

1. LCC. 2. larvicida. 3. *Aedes aegypti*. 4. ansiolítico. 5. zebrafish. I. Título.

CDD 540

MAYARA OLIVEIRA DE ALMEIDA

BIOMASSA DO LCC: COMBATE AO *Aedes Aegypti* E INVESTIGAÇÃO DO
POTENCIAL ANSIOLÍTICO EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Centro de Ciências, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química

Aprovada em 06/03/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Selma Elaine Mazzetto (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof.^a Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Viviane Gomes Pereira Ribeiro
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dr. Francisco Felipe Maia da Silva
Instituto Federal do Rio Grande do Norte (IFRN)

À minha família e amigos, por todo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, com todo meu amor, a Deus, por ter me ajudado a chegar até aqui. Deus é bom o tempo todo e o tempo todo Deus é bom!

Aos meus pais Fátima e Marcondes, e aos meus irmãos Marylia e Marcos, por sempre estarem ao meu lado.

Aos meus filhos Pedro e Lucca, meus combustíveis de motivação.

Ao meu esposo Emerson, pelo apoio e companherismo.

A minha orientadora Profa. Dra. Selma Elaine Mazzetto, por ter me aberto as portas do seu laboratório, ao qual fiz parte desde a iniciação científica, e pela excelente orientação ao longo do doutorado. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos Thayllan, Viviane, Nayane e Rita, por todas as sugestões e contribuições que foram de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho, e principalmente pela nossa amizade.

Aos professores participantes da banca examinadora pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A todos os colegas do LPT, pela ajuda, conhecimentos compartilhados e momentos de descontração.

RESUMO

O Líquido da Casca da Castanha de Caju (LCC), única fonte vegetal conhecida de monômeros fenólicos insaturados, é composto de: ácido anacárdico (AA), cardanol (CDN), cardol (CD) e 2-metilcardol (2MCD). O LCC apresenta inúmeras atividades biológicas importantes, dentre elas: larvicida, no combate ao *Aedes aegypti* e ansiolítica, no tratamento do transtorno de ansiedade. O presente trabalho envolve a síntese e caracterização de compostos organofosforados e piridínicos derivados do LCC, além da microencapsulação com pectina cítrica, do CDN e CD, para posterior avaliação da atividade larvicida. Neste trabalho foi avaliado a citotoxicidade dos compostos sintetizados em macrófagos, e o potencial inibitório *in vitro* contra a acetilcolinesterase (AChE) dos derivados organofosforotioatos. O presente trabalho envolve também o estudo da toxicidade e do potencial ansiolítico dos compostos, CDN, CD, AA, cardanol piridínico (CDN-BrP) e cardol fosforotioato di-substituído (CD-dPS) em Zebrafish adulto (*Danio rerio*). Considerando o potencial larvicida, os resultados mostraram que as microcápsulas de CDN e CD foram obtidas com rendimentos acima de 72% e eficiência de microencapsulação acima de 65%. O CD-dPS apresentou $CL_{50} = 0,8$ ppm, quatro vezes mais eficiente que o larvicida comercial Temefos ($CL_{50} = 3,2$ ppm). Este derivado foi o que apresentou diâmetro do halo (1,1 cm) mais próximo do controle Eserina (1,5 cm), e, portanto, o mais eficiente tanto como larvicida, como inibidor da AChE. CD-dPS, não apresentou toxicidade em células de macrófagos em nenhuma das concentrações testadas, assim como o CDN-BrP. Com relação ao potencial ansiolítico, os resultados mostraram que todos os compostos causaram efeito sedativo, diminuíram a atividade locomotora do peixe e não se mostraram tóxicos até 96h de análise. Além disso, apresentaram comportamento ansiolítico em todas as doses testadas, com destaque para o CDN, que foi mais eficiente que o DZP, com porcentagem de permanência na zona clara (%PZC) de 91,16%, seguido do CD-dPS com %PZC de 86,50%. Em relação à estrutura-atividade, o estudo de docking molecular mostrou que o CDN-BrP di-insaturado necessitou de uma menor concentração para inibir o receptor $GABA_A$. O complexo CDN-BrP- $GABA$ di-insaturado foi o mais estável, com menor valor de energia de afinidade comparado ao DZP. Esses resultados sugerem que os derivados do LCC são materiais promissores a serem usados como larvicidas e como ansiolíticos, uma vez que não são tóxicos e são oriundos de uma fonte renovável e de baixo custo.

Palavras-chave: LCC; larvicida; *Aedes aegypti*; ansiolítico; zebrafish; $GABA_A$.

ABSTRACT

Cashew Nut Shell Liquid (CNSL), the only known plant source of unsaturated phenolic monomers, is composed of: anacardic acid (AA), cardanol (CDN), cardol (CD) and 2-methylcardol (2MCD). CNSL has several important biological activities, including: larvicidal, in the fight against *Aedes aegypti* and anxiolytic, in the treatment of anxiety disorder. This work involves the synthesis and characterization of organophosphate and pyridine compounds derived from LCC, in addition to the microencapsulation with citrus pectin, of CDN and CD, for subsequent evaluation of larvicidal activity. The work evaluated the cytotoxicity in macrophages of the synthesized compounds, and also evaluated the in vitro inhibitory potential against acetylcholinesterase (AChE) of the organophosphorothioate derivatives. This study also involves the study of the toxicity and anxiolytic potential of the compounds CDN, CD, AA, cardanol pyridinium (CDN-BrP) and di-substituted phosphorothioate cardol (CD-dPS) in adult Zebrafish (*Danio rerio*). Considering the larvicidal potential, the results showed that the CDN and CD microcapsules were obtained with yields above 72% and microencapsulation efficiency above 65%. CD-dPS presented $LC_{50} = 0.8$ ppm, four times more efficient than the commercial larvicide Temephos ($LC_{50} = 3.2$ ppm). This derivative presented a halo diameter (1.1 cm) closest to the Eserine control (1.5 cm), and, therefore, the most efficient both as a larvicide and as an AChE inhibitor. CD-dPS did not present toxicity in macrophage cells at any of the concentrations tested, as did CDN-BrP. Regarding the anxiolytic potential, the results showed that all compounds caused a sedative effect, decreased the locomotor activity of the fish and were not toxic up to 96h of analysis. Furthermore, they presented anxiolytic behavior at all doses tested, with emphasis on CDN, which was more efficient than DZP, with a percentage of permanence in the clear zone (%PZC) of 91.16%, followed by CD-dPS with %PZC of 86.50%. Regarding the structure-activity, the molecular docking study showed that the di-unsaturated CDN-BrP required a lower concentration to inhibit the $GABA_A$ receptor. The di-unsaturated CDN-BrP-GABA complex was the most stable, with a lower affinity energy value compared to DZP. These results suggest that CNSL derivatives are promising materials for use as larvicides and anxiolytics, since they are non-toxic and come from a renewable and low-cost source.

Keywords: CNSL; larvicide; *Aedes aegypti*; anxiolytic; zebrafish; $GABA_A$.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Principais constituintes do LCC	18
Figura 2	– Descarboxilação do ácido anacárdico	18
Figura 3	– Fases da metamorfose do <i>Aedes aegypti</i>	21
Figura 4	– Casos confirmados de dengue, chikungunya e Zika, no Ceará e em Fortaleza, de janeiro a julho de 2022	24
Figura 5	– Estrutura de uma microcápsula	26
Figura 6	– Estrutura química de um segmento de pectina cítrica	27
Figura 7	– Interações entre ânions carboxilatos e cátions de cálcio	28
Figura 8	– Esquema geral da síntese dos derivados organofosforados	33
Figura 9	– Esquema da síntese do cardanol bromado	35
Figura 10	– Esquema da síntese do cardanol piridínico	36
Figura 11	– Obtenção das microcápsulas por meio da gelificação iônica	37
Figura 12	– Microcápsulas formadas após a gelificação iônica	38
Figura 13	– Organofosforados derivados do cardol	42
Figura 14	– Espectro de massa do cardanol piridínico (CDN-BrP)	43
Figura 15	– Espectro de RMN ¹ H do cardanol piridínico (CDN-BrP)	43
Figura 16	– Espectro de FT-IR do CDN, CDN-Br e CDN-BrP	44
Figura 17	– Formas tautoméricas estáveis da 2-hidroxipiridina	44
Figura 18	– Curvas de TGA e DTG do cardanol piridínico (CDN-BrP)	45
Figura 19	– Rendimento do processo de obtenção das microcápsulas	47
Figura 20	– Teor de núcleo retido no interior das microcápsulas	48
Figura 21	– Eficiência do processo de obtenção das microcápsulas	48
Figura 22	– Micrografias das microcápsulas: a) pectinato de cálcio, b) CDN-10, c) CDN-20, d) CD-10 e e) CD-20	49

Figura 23	– Espectros de FT-IR da pectina cítrica e do pectinato de cálcio	51
Figura 24	– Espectro de FT-IR, em absorvância, da pectina cítrica	52
Figura 25	– Espectros de FT-IR dos sistemas microencapsulados com cardanol (A) e com cardol (B)	53
Figura 26	– Curvas de TGA e DTG da pectina cítrica	54
Figura 27	– Oxidação enzimática do paration a paraoxon pelo citocromo CYP	56
Figura 28	– Morfologia das larvas do <i>Aedes aegypti</i> . (I) Microscópio e (II) MEV: (a) controle, (b) LCC técnico, (c) CD, (d) CD-dPS, (e) CDN e (f) CDN-BrP ...	58
Figura 29	– Estudo da citotoxicidade em macrófagos: a) CD, b) CD-dPS e c) CDN-BrP	60
Figura 30	– Reação de hidrólise da acetilcolina (ACh) pela enzima AChE	61
Figura 31	– Zebrafish adulto (<i>Danio rerio</i>)	63
Figura 32	– Número de publicações com zebrafish, de 1981 a 2022	64
Figura 33	– Ilustração do teste de campo aberto	65
Figura 34	– Exemplos de benzodiazepínicos	67
Figura 35	– Ilustração do aquário onde é realizado o teste claro/escuro	67
Figura 36	– Injeção, via intraperitoneal (i.p.), das amostras no zebrafish	72
Figura 37	– Compostos avaliados nos testes com o zebrafish	72
Figura 38	– Efeito do CDN, CD, AA, CDN-BrP e CD-dPS sob a atividade locomotora do zebrafish no teste de campo aberto	79
Figura 39	– Efeito ansiolítico do CDN, CD, AA, CDN-BrP e CD-dPS em zebrafish no teste claro/escuro	81
Figura 40	– Efeito do flumazenil (FMZ) sob o efeito ansiolítico do CDN, CD, AA, CDN-BrP e CD-dPS no teste claro/escuro	83
Figura 41	– Resultados do docking molecular: energia de afinidade (a), complexos ligante-receptor formados (b). *ligante co-cristalizado (re-docking)	85

Figura 42 – Complexo de interação do receptor GABAA com os ligantes (A); Mapas de interação do CDN-BrP mono-insaturado (B), CDN-BrP di-insaturado (C), CD di-insaturado (D) e do inibidor co-cristalizado Diazepam (E) 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de CL50 do LCC técnico, cardanol, cardol e dos derivados organofosforados e piridínico	56
Tabela 2 – Diâmetro do halo dos larvicidas com inibição da AChE	62
Tabela 3 – Resultados dos testes de toxicidade aguda dos compostos frente ao zebrafish	77
Tabela 4 – Energia de afinidade e valores de RMSD dos complexos formados após simulações de docking frente ao receptor GABAA, organizados por energia de afinidade	84
Tabela 5 – Interações dos ligantes com os receptores GABA _A	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-MCD	2-metilcardol
%PZC	Porcentagem de permanência na zona clara
AA	Ácido anacárdico
AC	Anacardato de cálcio
AChE	Acetilcolinesterase
ATCI	Iodeto de acetilcolina
ATR	Refletância Total Atenuada
BZD	Benzodiazepínicos
CCD	Cromatografia em camada gelgada
CD	Cardol
CDN	Cardanol
CD-dP	Cardol fosforado di-substituído
CD-dPS	Cardol fosforotioato di-substituído
CD-mP	Cardol fosforado mono-substituído
CD-mPS	Cardol fosforotioato mono-substituído
CDN-Br	Cardanol bromado
CDN-BrP	Cardanol piridínico
CENAUREMN	Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
CL ₅₀	Concentração letal mediana
CNSL	Cashew Nut Shell Liquid
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTG	Termogravimetria Derivada
DTN	Doença Tropical Negligenciada
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
DZP	Diazepam
FMZ	Flumazenil
FT-IR	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
γ-GABA	Ácido gama-aminobutírico

GM	Grau de Metoxilação
HCl	Ácido clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGR	Insect Growth Regulators
LCC	Líquido da Casca da Castanha de Caju
LPT	Laboratório de Produtos e Tecnologias em Processos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NUVET	Núcleo de Controle de Vetores e Endemias
OCDE	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Root Mean Square Deviation
SIS	Síntese de Indicadores Sociais
SNC	Sistema Nervoso Central
TGA	Análise termogravimétrica
UFC	Universidade Federal do Ceará
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	ESTADO DA ARTE	17
1.1	Biomassa nordestina	17
1.1.1	<i>Líquido da Casca da Castanha de Caju (LCC)</i>	17
2	COMBATE AO AEDES AEGYPT	20
2.1	Fundamentação teórica	20
2.1.1	<i>Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs)</i>	20
2.1.2	<i>Dengue, Zika e Chikungunya</i>	20
2.1.3	<i>Microencapsulação</i>	25
2.1.4	<i>Pectina Cítrica</i>	27
2.2	Objetivos	29
2.2.1	<i>Geral</i>	29
2.2.2	<i>Específicos</i>	29
2.3	Materiais e métodos	30
2.3.1	<i>Materiais</i>	30
2.3.2	<i>Técnicas de caracterização</i>	30
2.3.2.1	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	30
2.3.2.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	30
2.3.2.3	Cromatografia em camada delgada (CCD)	31
2.3.2.4	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM)	31
2.3.2.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
2.3.2.6	Análise Termogravimétrica (TGA)	31
2.3.3	<i>Procedimento experimental</i>	32
2.3.3.1	Separação do cardanol e cardol a partir do LCC técnico	32
2.3.3.2	Síntese dos derivados organofosforados do cardol	32
2.3.3.3	Síntese do derivado piridínico do cardanol	34
2.3.3.4	Obtenção das microcápsulas de cardol e cardanol	36
2.3.3.5	Teste da atividade larvicida	39
2.3.3.6	Estudo da citotoxicidade em macrófagos	39
2.3.3.7	Ensaio da atividade anticolinesterase	40
2.4	Resultados e discussão	41

2.4.1	<i>Obtenção e caracterização do cardol e cardanol</i>	41
2.4.2	<i>Síntese e caracterização dos derivados organofosforados do cardol</i>	42
2.4.3	<i>Síntese e caracterização do derivado piridínico do cardanol</i>	42
2.4.4	<i>Microcápsulas de cardol e cardanol</i>	45
2.4.4.1	Rendimento e eficiência da microencapsulação	46
2.4.4.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	49
2.4.4.3	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	50
2.4.4.4	Análise Termogravimétrica (TGA)	54
2.4.5	<i>Atividade larvicida</i>	55
2.4.5.1	Alterações morfológicas	57
2.4.6	<i>Estudo da citotoxicidade em macrófagos</i>	59
2.4.7	<i>Ensaio da atividade anticolinesterase</i>	61
3	EFEITO ANSIOLÍTICO EM ZEBRAFISH (DANIO RERIO)	63
3.1	Fundamentação teórica	63
3.1.1	<i>Zebrafish (Danio rerio)</i>	63
3.1.2	<i>Análise de ansiedade em zebrafish</i>	66
3.2	Objetivos	69
3.2.1	<i>Geral</i>	69
3.2.2	<i>Específicos</i>	69
3.3	Materiais e métodos	69
3.3.1	<i>Materiais</i>	69
3.3.2	<i>Procedimento experimental</i>	69
3.3.2.1	Obtenção do ácido anacárdico a partir do LCC natural	70
3.3.2.2	Síntese do derivado tiofosforado do cardol	71
3.3.2.3	Síntese do derivado piridínico do cardanol	71
3.3.2.4	Zebrafish adulto (Danio rerio)	71
3.3.2.5	Toxicidade aguda (96 horas)	71
3.3.2.6	Teste de campo aberto	73
3.3.2.7	Teste claro/escuro	73
3.3.2.8	Participação do sistema GABAérgico	73
3.3.2.9	Docking molecular	74
3.3.2.10	Análise estatística	75

3.4	Resultados e discussão	76
3.4.1	<i>Obtenção e caracterização dos constituintes do LCC</i>	76
3.4.2	<i>Síntese e caracterização do derivado organofosforado do cardol</i>	76
3.4.3	<i>Síntese e caracterização do derivado piridínico do cardanol</i>	76
3.4.4	<i>Toxicidade aguda (96 horas)</i>	76
3.4.5	<i>Teste de campo aberto</i>	77
3.4.6	<i>Teste claro/escuro</i>	80
3.4.7	<i>Participação do sistema GABAérgico</i>	82
3.4.8	<i>Docking molecular</i>	84
4	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO DO CDN: (A) CROMATOGRAMA, (B) ESPECTROS DE MASSA, (C) RMN 1H, (D) RMN 13C E (E) FT-IR	103
	APÊNDICE B – CARACTERIZAÇÃO DO CD: (A) CROMATOGRAMA, (B) ESPECTRO DE MASSA, (C) RMN 1H, (D) RMN 13C E (E) FT-IR	106
	APÊNDICE C – CARACTERIZAÇÃO DO CD-mP: (A) ESPECTRO DE MASSA E (B) RMN 1H	109
	APÊNDICE D – CARACTERIZAÇÃO DO CD-mPS: (A) ESPECTRO DE MASSA E (B) RMN 1H	110
	APÊNDICE E – CARACTERIZAÇÃO DO CD-dP: (A) ESPECTRO DE MASSA E (B) RMN 1H	111
	APÊNDICE F – CARACTERIZAÇÃO DO CD-dPS: (A) ESPECTRO DE MASSA E (B) RMN 1H	112
	APÊNDICE G – CARACTERIZAÇÃO DO CDN-Br: (A) ESPECTRO DE MASSA E (B) RMN 1H	113
	APÊNDICE H – CARACTERIZAÇÃO DO AA: (A) RMN 1H, (B) RMN 13C E (C) FTIR	114

1 ESTADO DA ARTE

1.1 BIOMASSA NORDESTINA

1.1.1 Líquido da Casca da Castanha de Caju (LCC)

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta tropical nativa do Nordeste brasileiro, pertencente à família *Anacardiaceae*. O caju, além de ser muito conhecido pelo sabor e valor nutricional de suas amêndoas, é uma cultura de grande importância sócio-econômica para o Brasil. Ele é constituído basicamente de duas partes: o pseudofruto (pendúculo), o caju, e o fruto propriamente dito, a castanha de caju (LOMONACO, MELE e MAZZETTO, 2017; MAIA *et al.*, 2012; VIDAL, 2017).

A castanha de caju apresenta comprimento e largura variável, casca lisa e mesocarpo alveolado, onde se encontra um líquido escuro, de coloração preta, cáustico e inflamável, chamado de Líquido da Casca da Castanha do Caju (LCC), ou *cashew nut shell liquid* (CNSL) na nomenclatura internacional, o qual representa cerca de 25% do peso da castanha. Na camada interna da castanha está localizada a amêndoa, constituída de dois cotilédones carnosos e oleosos, que compõem a parte comestível do fruto (Figura 2) (MAZZETTO *et al.*, 2009).

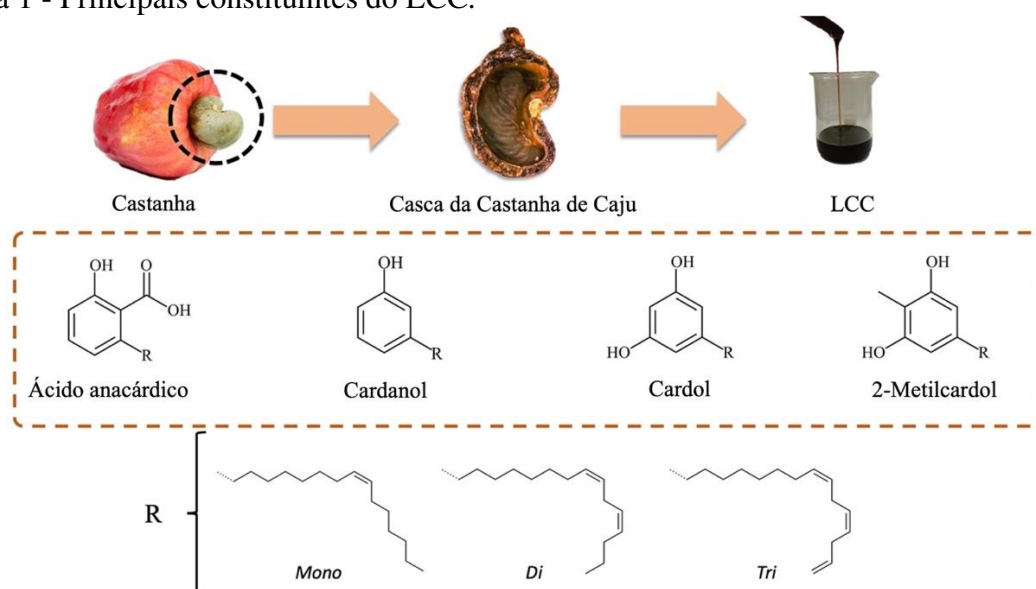
Costa do Marfim, Índia e Vietnã foram os três maiores produtores mundiais de castanha de caju em 2020. O Brasil situou-se como décimo primeiro maior produtor mundial. Dentre os estados brasileiros, o Ceará é o primeiro maior produtor. Com base nas informações disponibilizadas até maio de 2022, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção nacional de castanha de caju foi cerca de 120.750 toneladas, sendo o Ceará responsável por aproximadamente 55,2% desta produtividade. Esses dados correspondem a cerca de 30.769 toneladas de LCC *in natura* produzidos no Brasil como resíduo agroindustrial (CONAB, 2022).

O LCC, subproduto de baixíssimo valor agregado do agronegócio do caju, é a única fonte vegetal conhecida de monômeros fenólicos insaturados, formado por fenóis substituídos que possuem em comum uma cadeia lateral alifática de 15 átomos de carbono, possuindo diferentes graus de insaturação, que podem variar de 0 a 3.

De acordo com o método de extração, o LCC pode ser classificado como natural ou técnico. Ambos apresentam como principais constituintes: ácido anacárdico, cardanol, cardol e 2-metilcardol (Figura 1). O LCC natural é obtido *in natura*, por prensagem a frio ou extração

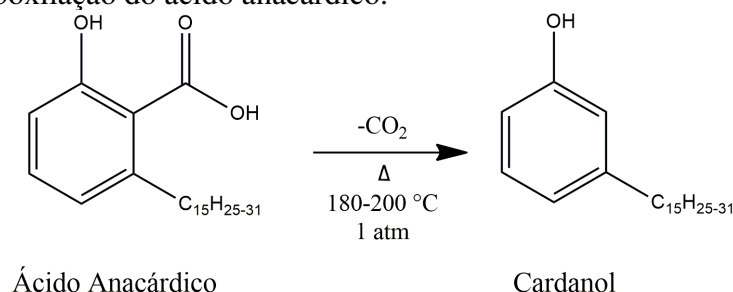
por solvente, apresentando como componente majoritário o ácido anacárdico (cerca de 70%). No Brasil, as indústrias de processamento da castanha, empregam um processo térmico-mecânico, no qual utiliza-se elevadas temperaturas (180 °C). Nessas condições, o ácido anacárdico sofre reação de descarboxilação convertendo-se a cardanol e produzindo o LCC técnico (Figura 2), o qual apresenta cerca de 90% de cardanol e é considerado um resíduo industrial, uma vez que o beneficiamento das amêndoas é realizado apenas para fins alimentícios (MAZZETTO et al., 2009; LOMONACO et al., 2009; MOTA et al., 2016).

Figura 1 - Principais constituintes do LCC.



Fonte: Próprio autor.

Figura 2 - Descarboxilação do ácido anacárdico.



Fonte: Próprio autor.

Os constituintes do LCC apresentam inúmeras atividades farmacológicas importantes, como antioxidante (LOMONACO et al., 2012), antibacteriana (CASTILLO-JUAREZ et al., 2007), anticancerígena (HSIEH et al., 2011), ovicida (CARVALHO et al., 2019), larvicida e pupicida (KANYABOON et al., 2018; CARVALHO et al., 2019), inibidor da

acetilcolinesterase (ALMEIDA *et al.*, 2019), no tratamento da leishmaniose (BEZERRA *et al.*, 2022) e ansiolítica (JÚNIOR *et al.*, 2018).

Objetivando agregar maior valor a um subproduto nacional e abundante no Ceará, além de reduzir o impacto ambiental, gerando produtos ecologicamente corretos, derivados da biomassa nordestina, faz-se necessário a obtenção de novas espécies moleculares derivadas do LCC. Além disso, busca-se também o desenvolvimento e a aplicação de novos bioprodutos e bioprocessos de interesse industrial, a custos menores que os atuais derivados do petróleo oferecidos pelo mercado, a fim de ampliar o leque de suas propriedades.

2 COMBATE AO AEDES AEGYPT

2.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs)

Doenças tropicais negligenciadas são consideradas doenças endêmicas que acometem mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo, principalmente populações pobres e com dificuldade de acesso à assistência básica de saúde. As DTNs prevalecem em áreas tropicais e subtropicais, e fazem parte do grupo de doenças comunicáveis, ou seja, podem ser transmitidas por contato com sangue e fluidos corporais, inalação de vírus, picadas de insetos, dentre outros. (ENGELS *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022; SRIPA *et al.*, 2022;)

A Organização Mundial da Saúde (OMS), do inglês *World Health Organization*, considera DTNs as seguintes infecções: úlcera de Buruli, doença de Chagas, cisticercose, dengue e chikungunya, dracunculíase (doença do verme da Guiné), equinococose, fasciolíase, tripanossomíase africana (doença do sono), leishmaniose, hanseníase (doença de Hansen), lepra, filariíase linfática, oncocercose (cegueira dos rios), raiva, esquistossomose, parasitoses, tracoma e bouba (WHO, 2022).

As DTNs estão se tornando mais intensas devido às viagens e comércio global, urbanização não planejada e mudanças climáticas (BEZERRA *et al.*, 2022). Dentre as DTNs, a dengue e a chikungunya requerem atenção especial das autoridades governamentais, por apresentarem caráter emergencial de controle do vetor transmissor e indisponibilidade de tratamento adequado.

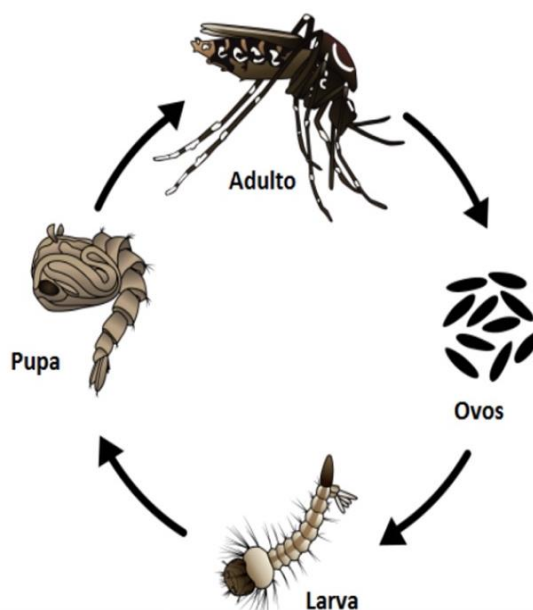
2.1.2 Dengue, Zika e Chikungunya

A dengue é uma infecção viral transmitida ao homem através da picada do mosquito infectado. O principal vetor que transmite a doença é a fêmea do *Aedes aegypti*. A transmissão se faz através da picada do mosquito durante a captação de sangue (hematofagia). O vírus responsável por causar essa infecção é pertencente à família *Flaviviridae* e é chamado de vírus da dengue (DENV). Existem quatro sorotipos do DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), sendo possível ser infectado quatro vezes (DE *et al.*, 2022; WHO, 2022).

Pesquisas relatam que a recuperação da infecção pode fornecer imunidade permanente contra o vírus da dengue. No entanto, a imunidade cruzada com os outros sorotipos após a recuperação, é apenas parcial e temporária. Infecções subsequentes por outros sorotipos aumentam o risco de desenvolver dengue grave (WHOa, 2022).

O *Aedes aegypti* se desenvolve através da metamorfose completa (holometabolismo), que compreende quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 3); sua fase larvária está dividida em quatro estágios de desenvolvimento. Geralmente, o mosquito sobrevive em ambientes urbanos no intra e peridomicílio humano, nos quais o convívio com o homem favorece a sua proliferação através do seu ciclo reprodutivo, bastando para isso, água parada e temperatura acima de 20 °C (ZARA *et al*, 2016).

Figura 3 - Fases da metamorfose do *Aedes aegypti*.



Fonte: Próprio autor.

Encontrada em climas tropicais e subtropicais em todo o mundo, principalmente em áreas urbanas e semi-urbanas, a incidência da dengue tem crescido nas últimas décadas, levando grande parte da população mundial ao risco de infecção. As mudanças climáticas e a resistência a inseticidas sintéticos são apontadas como as principais causas dessa alta incidência, e a grande maioria dos casos são assintomáticos ou leve e, portanto, os números reais são subnotificados (HU; TU, 2018).

O número de casos notificados de dengue aumentou globalmente mais de 8 vezes nas últimas duas décadas, de 505.430 casos em 2000, para mais de 2,4 milhões em 2010 e 5,2 milhões em 2019. Durante os anos de 2020 e 2021, esses números aparentemente diminuiram.

O que pode estar relacionado a pandemia de COVID-19, a qual pode ter dificultado a notificação de casos em vários países. No entanto, em 2022 o número de casos notificados voltou a aumentar (PARK *et al.*, 2022).

O Brasil viveu explosão de casos de dengue em 2022. Com base no último Boletim Epidemiológico, publicado pelo Ministério da Saúde, em 2022, ocorreram 1.423.614 casos prováveis de dengue (taxa de incidência de 667,4,8 casos/100 mil hab.) no país. Quando comparado com 2021, ocorreu um aumento de 160,4% dos casos. A região Centro-Oeste apresentou a maior taxa de incidência, com 2.043,7 casos/100 mil hab., seguida das regiões Sul (1.047,5 casos/100 mil hab.), Sudeste (521,5 casos/100 mil hab.), Nordeste (426,8 casos/100 mil hab.) e Norte (265,0 casos/100 mil hab.). Vale ressaltar que, em 2022, foram 19.272 casos confirmados e 992 óbitos por dengue no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

No Ceará, a situação não foi diferente. Com base no último Boletim Epidemiológico, publicado pela Secretaria Estadual da Saúde do Ceará (SESA), em 2022, foram 38.487 casos confirmados de dengue, onde 22.534 ocorreram na capital Fortaleza. Em 2021, foram confirmados 31.185 casos de dengue no estado e 19.280 na capital, indicando que houve aumento de casos comparando os dois últimos anos. No que diz respeito ao número de óbitos, em 2022, foram confirmados 17 no Ceará, sendo 4 em Fortaleza (SESA, 2022).

Aedes aegypti também é o vetor da chikungunya e Zika. Estas representam um grave problema de saúde pública, e colocam em risco bilhões de pessoas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (DE *et al.*, 2022).

A chikungunya é uma doença viral transmitida aos seres humanos pelo mosquito infectado. É causada pelo vírus chikungunya (CHIKV), que recentemente ressurgiu em muitas partes do mundo causando surtos em larga escala. A infecção causada pelo CHIKV apresenta-se como uma doença febril conhecida como febre chikungunya (CHIKF) a qual vem se propagando de forma acelerada no país, trazendo medo para a população devido aos malefícios causados a saúde, como aumento da temperatura corporal, inchaço articular, manchas vermelhas pelo corpo e fortes dores, que podem persistir por meses ou até anos (CAVALCANTI *et al.*, 2022).

De acordo com o último Boletim Epidemiológico, divulgado pelo Ministério da Saúde, em 2022, ocorreram 173.258 casos prováveis de chikungunya (taxa de incidência de 81,2 casos/100 mil hab.) no Brasil. Em comparação com o ano de 2021, houve um aumento de 78,2% dos casos registrados. A região Nordeste apresentou a maior incidência (267,6 casos/100 mil hab.), seguida das regiões Centro-Oeste (36,4 casos/100 mil hab.) e Norte (26,6 casos/100 mil hab.) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Vale ressaltar que, dentre os municípios que apresentaram os maiores registros de casos prováveis de chikungunya em 2022, Fortaleza/CE ocupa a primeira posição, com 20.512 casos (758,8 casos/100 mil hab.). Para o mesmo período, foram confirmados 93 óbitos no país, onde 41,9 %, ocorreram no Ceará (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

De acordo com o último Boletim Epidemiológico, publicado pela SESA, em 2022, foram 48.073 casos confirmados de chikungunya no Ceará, onde 24.606 ocorreram na capital. Em 2021, foram 827 casos confirmados no estado e 381 na capital. No que diz respeito ao número de óbitos, em 2022, foram confirmados 40 no Ceará e 20 em Fortaleza (SESA, 2022).

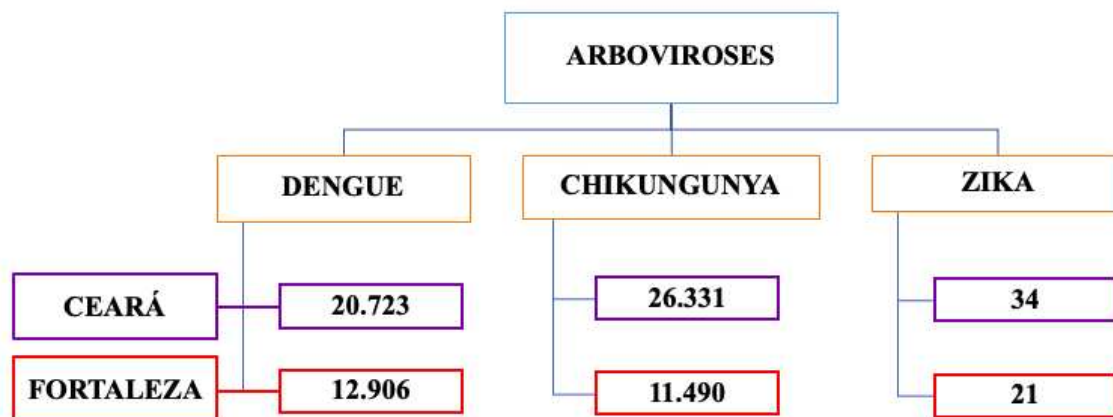
O vírus Zika é transmitido ao homem através da picada do *Aedes aegypti*. Os sintomas são geralmente leves e incluem febre, erupção cutânea, conjuntivite, dores musculares e articulares, mal-estar ou dor de cabeça, e duram de 2 a 7 dias. A maioria das pessoas infectadas pelo vírus não desenvolvem sintomas. Durante a gravidez, a infecção pelo vírus pode causar parto prematuro ou aborto espontâneo, microcefalia e outras malformações congênitas (JOHARGY, 2022).

Com relação aos dados de Zika, segundo o último Boletim Epidemiológico, divulgado pelo Ministério da Saúde, em 2022, foram notificados 9.204 casos prováveis (taxa de incidência de 4,3 caso/100 mil hab.) no Brasil. Quando comparado com 2021, observou-se um aumento de 42 % no número de casos. Foi notificado um óbito por Zika no país em 2022 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Segundo o último Boletim Epidemiológico, publicado pela SESA, em 2022, foram confirmados 27 casos de Zika no Ceará e 9 em Fortaleza. Comparando esses dados com 2021, observou-se uma redução no número de casos confirmados (175 no estado e 87 na capital) (SESA, 2022).

Para uma melhor visualização dos dados descritos acima, a Figura 4 apresenta o número de casos confirmados de dengue, chikungunya e Zika, no Ceará e em Fortaleza, de janeiro a julho de 2022.

Figura 4 - Casos confirmados de dengue, chikungunya e Zika, no Ceará e em Fortaleza, de janeiro a julho de 2022.



Fonte: (SESA, 2022), com adaptações.

O Brasil vem sofrendo as consequências da infestação pelo *Aedes aegypti*. Na região Nordeste o quadro é bastante preocupante, de acordo com os dados da Síntese de Indicadores Sociais (SIS - IBGE), grande parte da população residente nessa região vive em situação de pobreza. No Ceará a situação não é diferente, pelo menos 50% da população do estado é extremamente pobre, facilitando ainda mais o avanço das DTNs (SIS, 2021).

Uma vez que não há tratamentos específicos que sejam eficazes para essas doenças, a detecção precoce e o acesso a cuidados médicos adequados podem reduzir as taxas de infecção e consequentemente a taxa de mortalidade. No entanto, a principal estratégia de controle se concentra na prevenção da proliferação do vetor (DANIEL *et al.*, 2017; HUSTEDT *et al.*, 2020).

Algumas ações vêm sendo executadas, como o emprego de inseticidas que em sua maioria atacam os mosquitos na fase adulta ou seus estágios larvais. Vale ressaltar que, a redução da sua população é mais fácil em estágios imaturos (larva ou pupa). Inseticidas da classe dos organofosforados, inibem a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE), causando paralisia e morte das larvas (ROCHA *et al.*, 2015; CHANSANG *et al.*, 2018).

Há ainda os denominados Reguladores de Crescimento de Insetos, do inglês Insect Growth Regulators (IGR), que fazem parte de uma nova geração de inseticidas, como por exemplo os derivados piridínicos (como o piriproxifen), que são análogos do hormônio juvenil. Estes atuam inibindo o desenvolvimento das características adultas do inseto (asas, maturação dos órgãos reprodutivos e genitália externa), mantendo-o com aspecto "imaturo" (ninfa ou larva) (ALOMAR *et al.*, 2020; HUSTEDT *et al.*, 2020).

Durante o estágio larval o hormônio juvenil também está presente, sendo sua produção interrompida ao final do quarto estágio, quando a atuação do piriproxifen é mais notada.

Portanto, alguns estudos verificaram o efeito de prolongação do tempo em que o vetor se mantém como larva, o que pode chegar a 20 dias. Esse produto tem pouca influência sobre a mortalidade das larvas, agindo mais precisamente em pupas e na inibição do crescimento para a fase adulta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Porém, devido ao potencial tóxico desses larvicidas sintéticos para os seres humanos e para o meio ambiente, faz-se necessário a criação de novas estratégias no combate ao mosquito. Nesse sentido, busca-se atualmente o desenvolvimento de larvicidas naturais com maior eficiência e menor toxicidade, para atuarem de forma expressiva no combate ao *Aedes aegypti* (ROCHA *et al.*, 2015; DANIEL *et al.*, 2017; KRZYZANIAK *et al.*, 2017; KANIS *et al.*, 2018).

Entre os compostos bioativos naturais, alguns óleos essenciais apresentam atividade larvicida, como *Rollinia leptopetala* (Annonaceae) e *Tagetes patula*, por exemplo (FEITOSA *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2011; KRZYZANIAK *et al.*, 2017). As plantas tropicais também são uma fonte de compostos orgânicos bioativos com propriedades larvicidas. Estudos apontam o LCC, rico em compostos fenólicos, como um larvicida barato e eficiente (LOMONACO *et al.*, 2009; PAIVA *et al.*, 2017).

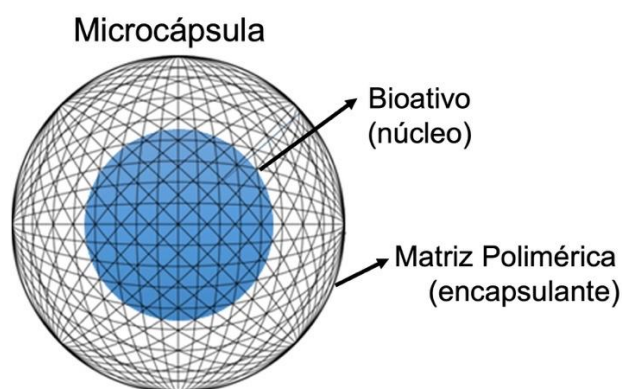
Na busca pela melhoria da atividade larvicida e inspirando-se nas estruturas moleculares de larvicidas comerciais, este trabalho busca a obtenção de novos derivados dos constituintes do LCC, com o objetivo de avaliar a eficiência desses derivados como larvicidas. O presente estudo se restringirá na obtenção de compostos pertencentes a classe dos organofosforados e piridínicos.

Vale ressaltar ainda que, algumas das mais recentes alternativas de combate ao *Aedes aegypti* é o uso de larvicidas microencapsulados, preferencialmente com liberação controlada, no sentido de prolongar sua ação, evitando situações, por exemplo, onde reservatórios de água e/ou acúmulos de água parada venham a se tornar criadouros do mosquito.

2.1.3 Microencapsulação

Método considerado recente, datando do início dos anos 70, a microencapsulação é um processo no qual substâncias hidrofílicas ou hidrofóbicas podem ser revestidas com uma matriz contendo um material de suporte constituído de um polímero hidrofílico (Figura 5). Geralmente esse material é um polissacarídeo ou um polímero sintético, considerados excipientes de baixa toxicidade, biodegradáveis e biocompatíveis (ZHANG *et al.*, 2015; OFORI-KWAKYE *et al.*, 2016).

Figura 5 - Estrutura de uma microcápsula.



Fonte: Próprio autor.

Esse processo atua na preservação do bioativo (núcleo), aumentando o seu tempo de degradação e protegendo contra agentes ambientais externos, tais como o ar, a umidade e a luz ultravioleta (UV). Além disso, facilita o manuseio seguro de materiais tóxicos e dermoabrasivos, e permite a liberação controlada, o que é útil para aplicações larvicidas (LEE *et al.*, 2016; MAES *et al.*, 2019).

A microencapsulação pode ser amplamente usada em diversas indústrias, como farmacêutica, para sistemas de administração de medicamentos, bioengenharia, para microencapsulação de células, alimentícia, para manutenção do sabor, além da cosmética (NOH *et al.*, 2018; KOUAMÉ *et al.*, 2021),

Dentre as técnicas empregadas para encapsular o bioativo, pode-se destacar a extrusão/gelificação iônica externa, atomização (*spray dray*), liofilização, dentre outras. A solubilidade em água deve ser o principal fator a ser estudado na escolha da matriz polimérica (encapsulante). A baixa solubilidade garante um maior tempo de ação, já que o intuito é que o bioativo seja liberado lentamente (MOLINA *et al.*, 2022; SOMACAL *et al.*, 2022).

Na gelificação iônica, a micropartícula se forma pela capacidade de polieletrólitos formarem ligações cruzadas na presença de contra íons, formando uma rede tridimensional, uma vez que é usado uma solução polimérica, carregada negativamente, que irá formar ligações cruzadas (crosslink) com cátions de baixa massa molecular (íons divalentes de cálcio). As micropartículas são formadas a partir dessas ligações cruzadas, formando hidrogéis, que são insolúveis, permitindo assim uma liberação mais lenta do bioativo (BENAVIDES *et al.*, 2016; NOH *et al.*, 2018).

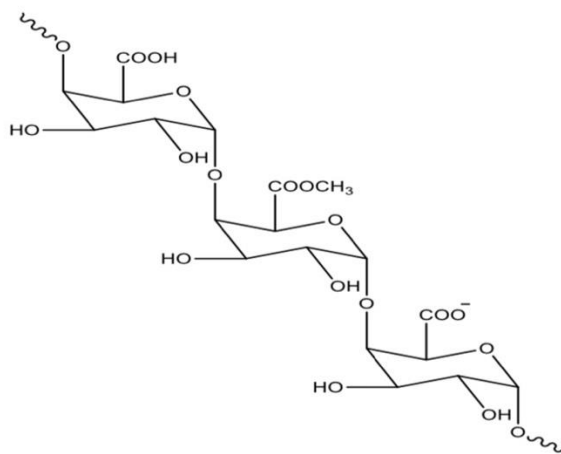
A biocompatibilidade entre encapsulante e bioativo é uma das propriedades mais importantes a ser considerada na escolha dos materiais. Os polissacarídeos são utilizados há bastante tempo, pois apresentam excelente biocompatibilidade e são mais baratos que outros

biopolímeros. Em particular, a pectina cítrica, um polímero natural de polissacarídeo, tem sido investigada quanto a sua utilização como encapsulante em sistemas de liberação de drogas (ZHOU *et al.*, 2016; NOH *et al.*, 2018; MELO *et al.*, 2021).

2.1.4 Pectina Cítrica

A pectina cítrica, polissacarídeo aniônico de massa molar entre 50.000 - 180.000 g.mol⁻¹, pode ser encontrada na parede celular de plantas, principalmente na lamela média, juntamente com a celulose e a hemicelulose (HOSSEINI *et al.*, 2016). As cadeias de pectina são formadas de ácido D-galacturônico em ligações α (1 \rightarrow 4) que podem ou não ser interrompidas por L-raminoses na posição α (1 \rightarrow 2) (Figura 6). Apresentam interações com monossacarídeos neutros; raminose, galactose, arabinose e xilose (LIANG *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2021). A interação desses açúcares com o ácido D-galacturônico leva à perda da linearidade do polímero devido ao surgimento de pequenas ramificações nesses pontos da cadeia principal (GRASSINO *et al.*, 2016).

Figura 6 - Estrutura química de um segmento de pectina cítrica.



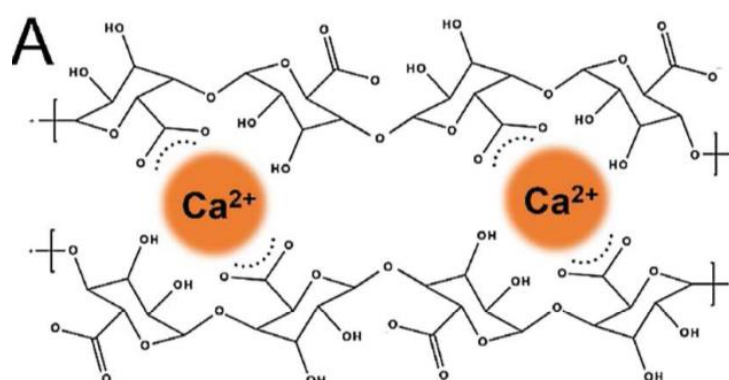
Fonte: Próprio autor.

Ao entrar em contato com a água, a pectina tem a capacidade de formar gel, e esse processo depende de alguns fatores, como, pH, temperatura, presença de íons, concentração de açúcares e grau de metoxilação (GM). Este último, é a razão entre os grupos carboxilas e carboxilatos presentes na estrutura da pectina. De acordo com o grau de metoxilação, a pectina pode ser classificada como sendo de alta metoxilação (GM>50%) ou de baixa metoxilação (GM<50%) (KIM *et al.*, 2016; HOSSEINI *et al.*, 2016).

As pectinas que apresentam GM > 50% necessitam de grande quantidade de açúcar para gelificarem, sendo utilizadas na produção de geleias e compotas. Já as pectinas com GM < 50 %, precisam de íons cálcio para gelificarem, sendo utilizadas em produtos de baixas calorias (CHAN *et al.*, 2017).

Devido a sua propriedade de gelificação, a pectina cítrica pode formar microcápsulas biocompatíveis por meio de interações eletrostáticas entre os ânions carboxilatos da pectina e cátions de cálcio (Figura 7) (NOH *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2022). Estudos também mostraram que a pectina pode aumentar a estabilidade de alguns agentes bioativos devido ao seu efeito antioxidante (RO *et al.*, 2015).

Figura 7 - Interações entre ânions carboxilatos e cátions de cálcio.



Fonte: (NOH *et al.*, 2018).

Outras características relevantes da pectina cítrica é a biodegradabilidade e a baixa toxicidade, tornando-a uma alternativa promissora para o uso em sistemas de liberação de drogas. Além disso, pode ser usada para encapsular polifenóis, óleos essenciais e probióticos, e nas aplicações de biofilme (LIU *et al.*, 2022). Pesquisas na literatura mostraram que a pectina também pode ser útil como um potencial antioxidante natural nas indústrias farmacêutica e cosmética (LIU *et al.*, 2022).

Tendo em vista a baixa solubilidade em água dos constituintes do LCC, a interação destes com fatores ambientais externos, e, buscando atender à necessidade da liberação controlada, este trabalho envolveu, também, a preparação de micropartículas de CD e CDN, encapsulados com pectina cítrica, por meio da gelificação iônica, para posterior avaliação da atividade larvicida.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Geral

Sintetizar e caracterizar os derivados organofosforados e piridínicos do LCC, além de produzir microcápsulas de CDN e CD usando pectina cítrica como encapsulante para combate ao *Aedes aegypti*.

2.2.2 Específicos

- Isolar e caracterizar os componentes majoritários do LCC técnico (CD e CDN);
- Sintetizar e caracterizar os derivados organofosforados do cardol (CD-mP, CD-mPS, CD-dP, CD-dPS) e um derivado piridínico do cardanol (CDN-BrP);
- Produzir microcápsulas de CDN e CD e avaliar a atividade larvicida dos compostos sintetizados e das microcápsulas;
- Avaliar a citotoxicidade em macrófagos do CD, CD-dPS e CDN-BrP;
- Verificar o potencial inibitório *in vitro* contra a acetilcolinesterase (AChE) dos derivados tiofosforados do cardol (CD-mPS e CD-dPS).

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Materiais

Os reagentes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram provenientes da Aldrich Chemical Company e Vetec Química, ambas de Campo Grande - Brasil, e foram utilizados sem nenhuma purificação prévia. O LCC, técnico e natural, foram fornecidos pela empresa Amêndoas do Brasil LTDA (Fortaleza, Brasil).

Durante o procedimento de purificação dos compostos sintetizados em coluna cromatográfica, foi utilizado sílica gel da marca ACROS Organics com tamanho de 60 Å. As larvas do *Aedes aegypti* (linhagem Rockefeller) foram fornecidas pelo Núcleo de Controle de Vetores e Endemias (NUVET) da Secretaria de Saúde do Ceará.

2.3.2 Técnicas de caracterização

2.3.2.1 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer®, modelo FT-IR/NIR FRONTIER, pertencente ao Laboratório de Produtos e Tecnologias em Processos (LPT), utilizando Refletância Total Atenuada (ATR) com resolução de 4 cm^{-1} usando a média aritmética de quatro varreduras, na faixa de número de ondas de $4000\text{-}550\text{ cm}^{-1}$. As micropartículas foram preparadas sob a forma de pastilhas de KBr.

2.3.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{31}P foram obtidos em espectrômetro BRUKER®, modelo Avance DPX 300, pertencente ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), operando nas frequências do 300 MHz (^1H e ^{13}C) e 121 MHz (^{31}P). Para dissolução das amostras utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl_3) à temperatura ambiente utilizando o próprio solvente como padrão interno.

2.3.2.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Análises por CCD foram utilizadas para o monitoramento das sínteses e das frações cromatográficas. Foram utilizadas cromatoplasmas com gel de sílica aderida a folha de alumínio (Thin Layer Chromatography) TCL ALUMINUM SHEETS SILICA GEL-60 F254 MERCK® 20x20cm, pertencente ao LPT. As cromatoplasmas foram reveladas em solução de vanilina.

2.3.2.4 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM)

As análises de CG/EM foram obtidas através de um cromatógrafo CG- MS-QP 2010 da SHIMADZU®, pertencente ao LPT, com impacto eletrônico de 70 eV e equipado com uma coluna DB-5 (5% fenil-metilpolisiloxano) de 20 m de comprimento, 0,18 mm de diâmetro interno e 0,4 µm de espessura do filme. O volume injetado de cada amostra foi de 1 µL, o gás hélio foi utilizado como gás de arraste.

2.3.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias dos sistemas microencapsulados foram obtidas na Central Analítica – UFC, através de um Microscópio Eletrônico de varredura com energia dispersiva de raios-X, MEV e ETD Inspect - F50 operando em 10-20 kV de voltagem. As amostras foram fixadas diretamente em “stubs” de alumínio de 12 mm de diâmetro e, em seguida, submetidas à metalização (pulverização) com uma fina camada de ouro 20 nm em um Sputter Coater Q150T ES. Após a metalização, as amostras foram observadas com ampliações de 5000 a 11000 vezes.

2.3.2.6 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas em um equipamento METTLER-TOLEDO, modelo TGA/SDTA 851°, pertencente ao Laboratório de Produtos e Tecnologias em Processos (LPT), sob atmosfera de N₂ (fluxo de 50 mL/min), com taxa de aquecimento de 10 °C/min em uma faixa de temperatura de 30 a 900 °C. Utilizou-se cadinho de alumina com aproximadamente 10 mg de amostra.

2.3.3 Procedimento experimental

2.3.3.1 Separação do cardanol e cardol a partir do LCC técnico

Transferiu-se 45 g de LCC técnico para uma coluna cromatográfica (60 cm de altura x 6 cm de diâmetro) contendo sílica gel como fase estacionária. Para a fase móvel utilizou-se misturas de solventes hexano:acetato de etila em quantidades crescentes de polaridade nas proporções 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e, 5:5. As frações eluídas foram analisadas por CCD com placas reveladas em solução de vanilina. Cardanol foi o primeiro a ser obtido, seguido de 2-metilcardol e por último o cardol. As frações foram concentradas em evaporador rotatório, obtendo-se 20 g de CDN e 4,75 g de CD. Depois do processo de separação, os compostos foram submetidos à caracterização por RMN ^1H e ^{13}C , FTIR e CG/EM.

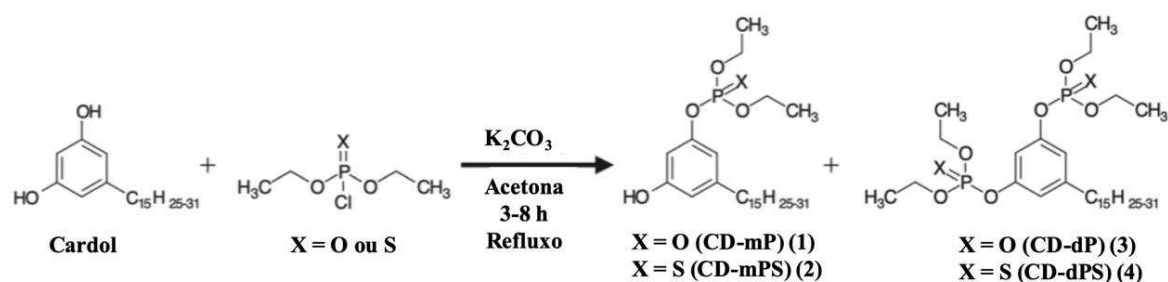
CDN: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7,19 ppm (1H, t); 6,80 ppm (1H, d); 6,72 ppm (2H, d); 5,88 ppm (2H, m); 5,47 ppm (4H, m); 5,14 ppm (1Ha, dd, *cis*); 5,07 ppm (1Hb, dd, *trans*); 2,86 ppm (4H, m); 2,61 ppm (2H, t); 2,10 ppm (2H, t); 1,65 ppm (2H, m); 1,38 ppm (8H, m); 0,98 ppm (3H, t). CG/EM m/z [M^+]: 302. FTIR: δ 3336 cm^{-1} $\nu(\text{Ar-OH})$.

CD: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 6,26 ppm (2H, s); 6,19 ppm (1H, s); 5,83 ppm (2H, m); 5,44 ppm (2H, m); 5,08 ppm (1H, dd, *cis*), 5,01 ppm (1H, dd, *trans*); 2,81 ppm (2H, t); 2,44 ppm (2H, m); 2,05 ppm (2H, t); 1,53 ppm (2H, m); 1,34 ppm (8H, m); 0,93 ppm (3H, t). CG/EM m/z [M^+]: 314. FTIR: δ 3336 cm^{-1} $\nu(\text{Ar-OH})$.

2.3.3.2 Síntese dos derivados organofosforados do cardol

Os derivados monossustituídos e dissustituídos foram sintetizados de acordo com os procedimentos descritos por LOMONACO *et al.* (2011; 2012; 2013), com modificações. O esquema reacional está apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema geral da síntese dos derivados organofosforados.



Fonte: Próprio autor.

Para a síntese dos derivados monossustituídos, adicionou-se 1 mmol de dietilclorofosfato ou dietilclorotiofosfato, à temperatura ambiente, a uma solução de cardol (314 mg; 1 mmol) e carbonato de potássio (138 mg; 1 mmol) em acetona (15 mL). A mistura foi agitada magneticamente sob temperatura de refluxo e monitorada por CCD. Após quatro horas de reação, a solução resultante foi extraída com acetato de etila (3 × 40 mL) e água destilada. A remoção do solvente deixou um resíduo oleoso, que foi então purificado através de cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente proporções de hexano/acetato de etila, para obter os produtos **CD-mP** (160,14 mg, 51%) ou **CD-mPS** (194,68 mg, 62%), ambos óleos amarelados. Os produtos foram caracterizados por RMN (^1H e ^{31}P) e CG/EM. Esta última análise mostrou o homólogo trieno como o pico do íon molecular para ambos os compostos, no entanto, ainda existe a presença dos outros homólogos.

CD-mP: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,92 (t, 3H, J 7,5 Hz, CH_3), 1,32 (m, 21H, CH_2 , $-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1,56 (m, 2H, CH_2), 2,06 (m, 2H, CH_2), 2,50 (t, 2H, J 7,5 Hz, CH_2), 2,82 (m, 4H, CH_2), 4,21 (m, 4H, $\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 5,38 (m, 6H, CH), 6,46 (s, 1H, CH), 6,51 (s, 1H, CH), 6,79 (s, 1H, CH); ^{31}P RMN (121 MHz, CDCl_3) – 6,2 ppm; CG/EM m/z [M^+]: 450.

CD-mPS: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,92 (t, 3H, J 7,5 Hz, CH_3), 1,37 (m, 20H, CH_2 , $-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1,58 (m, 2H, CH_2), 2,05 (m, 2H, CH_2), 2,53 (t, 2H, J 7,5 Hz, CH_2), 2,82 (m, 4H, CH_2), 4,24 (m, 4H, $\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 5,02-5,84 (m, 6H, CH), 6,51 (s, 1H, CH), 6,55 (s, 1H, CH); 6,59 (s, 1H, CH); ^{31}P RMN (121 MHz, CDCl_3) 64,6 ppm; CG/EM m/z [M^+]: 466.

O procedimento para a síntese dos derivados dissustituídos foi o mesmo empregado na descrição acima, modificando-se apenas a razão estequiométrica e o tempo de reação. Dois mmol de dietilclorofosfato ou dietilclorotiofosfato foram adicionados, à temperatura ambiente, a uma solução de cardol (314 mg; 1 mmol) e carbonato de potássio (276 mg; 1 mmol) em acetona (15 mL). A mistura foi agitada magneticamente sob temperatura de refluxo durante 6 h. Após este período, a solução resultante foi extraída com acetato de etila (3 × 40 mL) e água destilada. A remoção do solvente deixou um resíduo oleoso, que foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente proporções de metanol/acetato de etila, para obter os produtos **CD-dP** (263,76 mg, 84%) ou **CD-dPS** (282,60 mg, 90%), ambos óleos amarelados. Os produtos foram caracterizados por RMN (^1H e ^{31}P) e CG/EM. Devido à polaridade mais alta do CD-dPS, os homólogos de trieno e dieno são retidos na coluna e o monoeno aparece como pico do íon molecular (m/z 622 M^+).

CD-dP: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,88 (t, 3H, J 7,2 Hz, CH_3), 1,31 (m, 26H, CH_2 , $-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1,57 (m, 2H, CH_2), 2,03 (m, 2H, CH_2), 2,55 (t, 2H, J 7,5 Hz, CH_2), 2,78 (m, 4H, CH_2), 4,19 (m, 8H, $\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4,94-5,41 (m, 6H, CH), 6,87 (s, 2H, CH), 6,90 (s, 1H, CH); ^{31}P RMN (121 MHz, CDCl_3) -7,44 ppm; CG/EM m/z [M_+]: 586.

CD-dPS: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,90 (t, 3H, J 6,0 Hz, CH_3), 1,36 (m, 34H, $-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1,56 (m, 2H, CH_2), 2,04 (m, 2H, CH_2), 2,80 (m, 4H, CH_2), 4,22 (m, 8H, $\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4,95-5,43 (m, 6H, CH), 6,84 (s, 2H, CH), 6,91 (s, 1H, CH); ^{31}P RMN (121 MHz, CDCl_3) 62,1 ppm; CG/EM m/z [M^+]: 622.

2.3.3.3 Síntese do derivado piridínico do cardanol

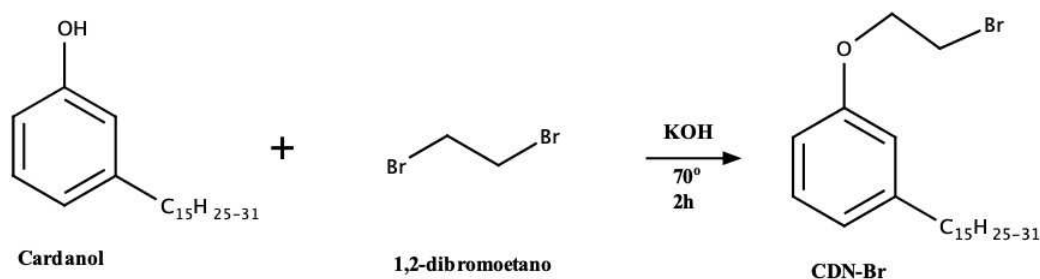
Para a síntese do derivado piridínico (CDN-BrP), fez-se necessário a obtenção de um composto precursor: o cardanol bromado (CDN-Br). Essa etapa experimental foi realizada de acordo com metodologia descrita por CLEMENTE *et al.* (2013), com modificações.

O composto 1-(2-bromoetoxi)-3-pentadecilbenzeno, chamado nesse trabalho de cardanol bromado, foi obtido pela reação entre 15,0 mL (174,00 mmol) de 1,2-dibromoetano, este sendo o próprio solvente da reação, com 4,0 g (13,16 mmol) de cardanol, seguido da adição de 2,2 g (39,50 mmol) de hidróxido de potássio (KOH); o sistema foi mantido sob agitação a 70 °C por 2 horas. O referido esquema reacional é mostrado na Figura 9. A reação foi monitorada por CCD e no final do período reacional o produto foi vertido para um funil de

separação e tratado com água destilada e acetato de etila, na proporção 6 x a20 mL, respectivamente. A fase orgânica foi separada, secada com Na₂SO₄ e concentrada sob pressão reduzida, em rotaevaporador, para promover a total remoção do solvente. O produto desejado foi obtido como um óleo transparente com rendimento de 86% (3,44 g), cuja massa molecular do homólogo monoeno é 410 g/mol (C₂₃H₃₇BrO), e em seguida caracterizado pelas técnicas de CG/EM e RMN de ¹H.

CDN-Br: RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 0,88 (t, 3H, *J* = 6,9 Hz, CH₃); 1,31 (8H, m); 1,60 (2H, m); 2,02 (2H, t); 2,57 (2H, t); 2,80 (4H, m); 3,62 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, Br-CH₂); 4,27 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, O-CH₃); 5,07 (1H_b, dd, *trans*); 5,14 (1H_a, dd, *cis*); 5,47 (4H, m); 5,88 (2H, m); 6,72 (2H, d); 6,82 (1H, d); 7,19 (1H, t). CG/EM *m/z* [M⁺]: 410.

Figura 9 - Esquema da síntese do cardanol bromado.

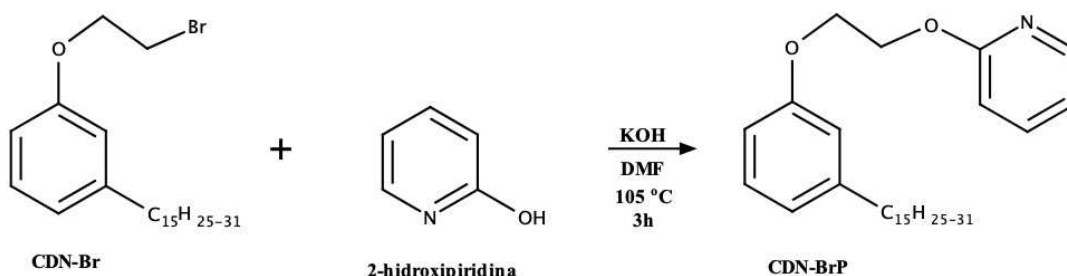


Fonte: Próprio autor.

O cardanol piridínico (CDN-BrP) foi obtido pela reação entre 4g (9,77 mmol) de CDN-Br com 0,92g (9,77 mmol) de 2-hidroxipiridina, seguido da adição de 0,82 g (14,6 mmol) de hidróxido de potássio (KOH) e 20 mL de dimetilformamida (DMF), usado como solvente. O sistema foi mantido sob agitação a 105 °C por 3 horas. O referido esquema da síntese é mostrado na Figura 10. A reação foi monitorada por CCD e no final do período reacional o produto foi vertido para um funil de separação, onde foi tratado com água destilada e acetato de etila, na proporção 3 x 20 mL, respectivamente. Após tratamento, o produto presente na fase orgânica foi purificado por cromatografia em coluna usando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de hexano/acetato de etila como fase móvel. As frações com o produto desejado foram reunidas e submetidas à evaporação sob pressão reduzida. O produto foi obtido como um óleo amarelo com rendimento de 70% (2,8 g), cuja massa molecular do homólogo monoeno é 423 g/mol (C₂₈H₄₁NO₂), e em seguida caracterizado por CG/EM, RMN de ¹H, FTIR e TGA.

CDN-BrP: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,88 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz, CH_3); 1,30 (8H, m); 1,57 (2H, m); 2,03 (2H, t); 2,54 (2H, t); 2,80 (4H, m); 4,31 (4H, dd, O- CH_2 - CH_2 -O); 5,07 (1H, dd, *trans*); 5,36 (1H, dd, *cis*); 5,81 (4H, m); 6,72 (2H, d); 6,82 (1H, d); 7,19 (1H, t). CG/EM m/z [M^+]: 423.

Figura 10 - Esquema da síntese do cardanol piridínico.



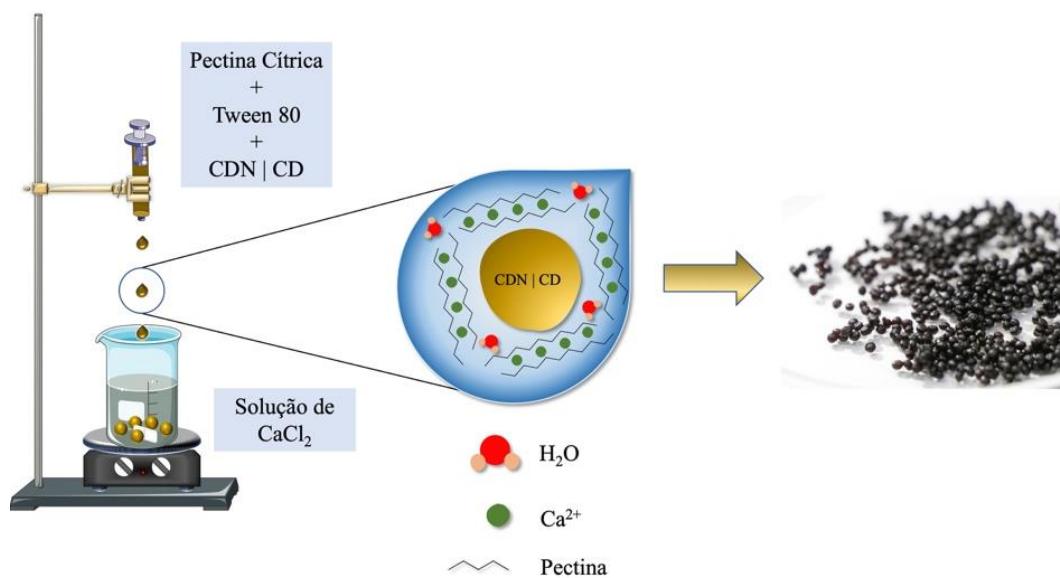
Fonte: Próprio autor.

2.3.3.4 Obtenção das microcápsulas de cardol e cardanol

As microcápsulas foram obtidas por meio da técnica extrusão/gelificação iônica externa, usando a pectina cítrica como matriz polimérica. As proporções (v/v) utilizadas de encapsulante/núcleo foram de 4:1 (20% de núcleo: CDN-20 e CD-20) e 9:1 (10% de núcleo: CDN-10 e CD-10), respectivamente. Essas proporções consideram o volume da solução de pectina e o volume de núcleo.

Inicialmente, preparou-se a solução de pectina cítrica 4% (m/v) adicionando 1,2 g de pectina em 30 mL de água. A mistura permaneceu em agitação até completa dissolução. Em seguida, adicionou-se 0,6 mL de Tween 80 na proporção 2% (v/v). Por fim, adicionou-se o núcleo (cardol/cardanol), permanecendo em agitação branda por 5 min. A emulsão formada foi pesada em um béquer previamente tarado. Com uma seringa de 10 mL retirou-se quantidades da emulsão e a mesma foi gotejada em uma solução reticulante de cloreto de cálcio 3% (m/v), previamente preparada, que também permaneceu sob agitação. A altura entre a ponta da seringa e o começo da solução reticulante foi fixada em 30 cm. O procedimento está esquematizado na Figura 11.

Figura 11 - Obtenção das microcápsulas por meio da gelificação iônica.



As microcápsulas formadas ficaram em contato com a solução reticulante por 30 min, para completa reticulação. Logo após, foram peneiradas e lavadas com água destilada (100 mL) para remover o excesso de solução reticulante. Em seguida, foram pesadas e secas à temperatura ambiente por aproximadamente 3 dias. Após esse período foram pesadas novamente e acondicionadas para caracterizações e testes futuros (Figura 12). A microcápsula de pectina cítrica vazia (sem núcleo) também foi preparada e nomeada de pectinato de cálcio, uma vez que se trata de pectina cítrica + CaCl_2 . Vale ressaltar que, todas as concentrações e quantidades utilizadas foram determinadas com base em testes prévios.

Figura 12 - Microcápsulas formadas após a gelificação iônica.



Fonte: Próprio autor.

Os sistemas microencapsulados foram avaliados quanto ao rendimento e eficiência da microencapsulação. O rendimento foi calculado com base nas massas de pectina cítrica, Tween 80 e núcleo utilizadas no preparo das soluções, e, na massa final após preparo das microcápsulas, por meio da seguinte equação: $RM = (M_{final} / M_{inicial}) \times 100$. Onde: RM = rendimento da microencapsulação, M_{final} = massa das microcápsulas logo após a extrusão/gelificação iônica, $M_{inicial}$ = massa da emulsão formada após preparo das soluções.

Para o cálculo da eficiência, inicialmente fez-se o cálculo de quantificação, que é a quantidade real de núcleo efetivamente retido no interior das microcápsulas. Esse cálculo foi feito por meio da técnica de UV-VIS, através da curva de calibração, usando o próprio núcleo (cardol e cardanol, separadamente) como padrão. A eficiência foi calculada por meio da seguinte equação: $EM = (Q_{real} / Q_{teórica}) \times 100$. Onde: EM = eficiência da microencapsulação, Q_{real} : quantidade real de núcleo retido, $Q_{teórica}$: quantidade de núcleo inserido.

2.3.3.5 Teste da atividade larvicida

A atividade larvicida dos derivados organofosforados do cardol e do derivado piridínico do cardanol foi avaliada seguindo a metodologia proposta por LOMONACO *et al.* (2099), com modificações. Cinquenta larvas do terceiro estágio foram transferidas para um béquer de 50 mL contendo 19,7 mL de água. Em seguida, diferentes quantidades dos derivados foram diluídas em 0,3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), para obter as seguintes concentrações: 4, 10, 20, 40 e 100 ppm. O controle negativo (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), ou seja, concentração necessária para matar 50% das larvas. Os testes foram realizados em triplicata e o valor de CL₅₀ foi determinado usando o software de análise estatística BioStat 2009.

Avaliou-se também a atividade larvicida das microcápsulas de cardol e cardanol. Para isso, 50 larvas do terceiro estágio foram transferidas para um béquer de 50 mL contendo 20 mL de água. Em seguida, adicionou-se as microcápsulas nas quantidades: 50, 100, 150 e 200 mg, equivalente a 20,85; 41,71; 62,56 e 83,42 mg de núcleo, respectivamente, para o sistema CDN-10. 33,23; 66,47; 99,70 e 132,94 mg de núcleo, para o sistema CDN-20. 24,61; 49,23; 73,84 e 98,46 mg de núcleo, para o sistema CD-10. 30,95; 61,90; 92,85 e 123,80 mg de núcleo, para o sistema CD-20. Todos esses valores foram obtidos baseando-se nos cálculos de quantificação.

O controle negativo (microcápsula de pectinato de cálcio / H₂O) foi testado em paralelo, com o objetivo de comprovar que a ação larvicida deveu-se ao núcleo (CD/CDN) e não a matriz de pectina cítrica. A mortalidade das larvas foi registrada durante 7 dias (168 horas) e o número de larvas mortas contabilizado a cada 24 horas. Todos os testes foram realizados no Laboratório de Entomologia do NUVET.

2.3.3.6 Estudo da citotoxicidade em macrófagos

O estudo foi realizado por meio do teste com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio). Inicialmente foram adicionados, em placas de 96 poços, 180 µL de meio RPMI 1640 suplementado e cerca de 5x10⁵ macrófagos/poço. Tais células foram incubadas por 16 h a 37 °C e 5% de CO₂ para adesão celular. Após este intervalo, adicionou-se 20 µL das drogas nas concentrações de 100, 50, 25, 10 e 5 µg.mL⁻¹. A placa foi incubada por 48 h e, ao término deste período, o conteúdo foi desprezado, seguido de lavagem com solução

salina 0,2% e adição de meio 100 μL de RPMI suplementado e 100 μL de MTT diluído em PBS (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). A placa foi, novamente, incubada em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 , por 4 h. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e, adicionou-se 150 μL de DMSO em todos os poços. Por fim, a placa foi colocada em agitador de Kline (modelo AK 0506) por 30 min e à temperatura ambiente, para completa dissolução do MTT-formazan. A leitura foi realizada a 570 nm e os resultados foram expressos em termos de concentração citotóxica média (CC_{50}). Os testes foram realizados no laboratório de Parasitologia da UFC - Campus Porangabuçu, coordenado pela Profa. Dra. Maria Jânia Teixeira.

2.3.3.7 Ensaio da atividade anticolinesterase

O ensaio foi realizado de acordo com o método calorimétrico descrito por ELMANN *et al.* (1961) e RHEE *et al.* (2001), sendo considerado um método rápido e sensível para a seleção de amostras com ação anticolinesterásica. Alíquotas de 15 μL de soluções dos compostos CD-mPS e CD-dPS, e do larvicida comercial (Temefos), na concentração de 0,45 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, foram observadas em uma placa de CCD (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) 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ com o reagente Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) deixando em repouso por 3 min para a secagem da placa. Em seguida foi borrifado a enzima acetilcolinesterase (10 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$). Após 10 min, uma cor amarela apareceu como resultado da formação de tio ânion da reação da hidrólise enzimática do substrato com DTNB. A inibição da enzima leva à formação de um halo branco ao redor dos pontos onde os larvicidas foram aplicados. Como controle positivo, um composto anticolinesterásico chamado Eserina foi utilizado em 30 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia da UFC - Campus do Pici, coordenado pela Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Obtenção e caracterização do cardol e cardanol

Cardol e cardanol foram obtidos a partir do LCC técnico por meio de coluna cromatográfica. Após o processo de obtenção, foram avaliados quanto a composição através da análise de CG/EM.

No cromatograma do cardanol (Apêndice A), observou-se um pico principal com tempo de retenção de 12,656 min. Nos seus espectros de massa (Apêndice A), foi possível observar a presença de picos relativos ao íon molecular $[M^+]$ com razão m/z de 302, atribuída ao cardanol monoinsaturado, m/z 300, relativa ao di-insaturado e m/z 304, atribuída ao saturado. Além disso, também foi observado um pico mais intenso (pico base) com m/z 108, referente ao fragmento mais estável do CDN.

A partir do cromatograma e através da integração das áreas observadas para os picos com tempo de retenção de 12,656, 12,743 e 12,870 min., foi possível afirmar que a composição química do cardanol é constituída por uma porcentagem de, aproximadamente, 71% de monoinsaturado, 23% de di-insaturado e 6% de saturado, respectivamente.

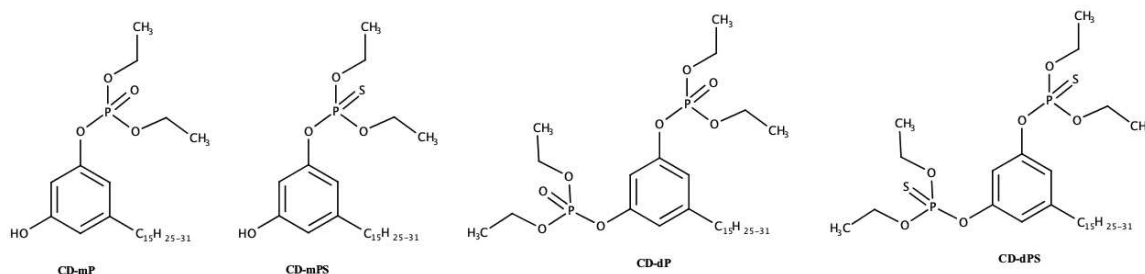
No cromatograma do cardol (Apêndice B), observou-se um pico principal com tempo de retenção de 20,749 min. No seu espectro de massa (Apêndice B), foi possível observar a presença do pico relativo ao íon molecular $[M^+]$ com razão m/z de 314, atribuída ao cardol tri-insaturado. Também foi observado um pico mais intenso (pico base) com m/z 124, referente ao fragmento mais estável do CD. A partir da integração da área do pico com tempo de retenção de 20,749 min, pode-se afirmar que o cardol apresenta em sua composição 66% do homólogo tri-insaturado.

Os espectros de RMN de 1H e ^{13}C do cardanol e cardol (Apêndices A e B, respectivamente) comprovaram que há uma mistura dos homólogos mono, di e tri-insaturados. Os espectros de FTIR do CDN e CD (Apêndices A e B, respectivamente) apresentaram praticamente os mesmos estiramentos, com pequenas diferenças de número de onda, devido a presença de outro grupo doador de elétrons (-OH) no cardol.

2.4.2 Síntese e caracterização dos derivados organofosforados do cardol

Após a síntese e purificação em coluna, os compostos organofosforados derivados do cardol (Figura 13) foram caracterizados por meio das técnicas CG/EM e RMN ^1H . Os respectivos espectros estão apresentados nos Apêndices C ao F.

Figura 13 - Organofosforados derivados do cardol.



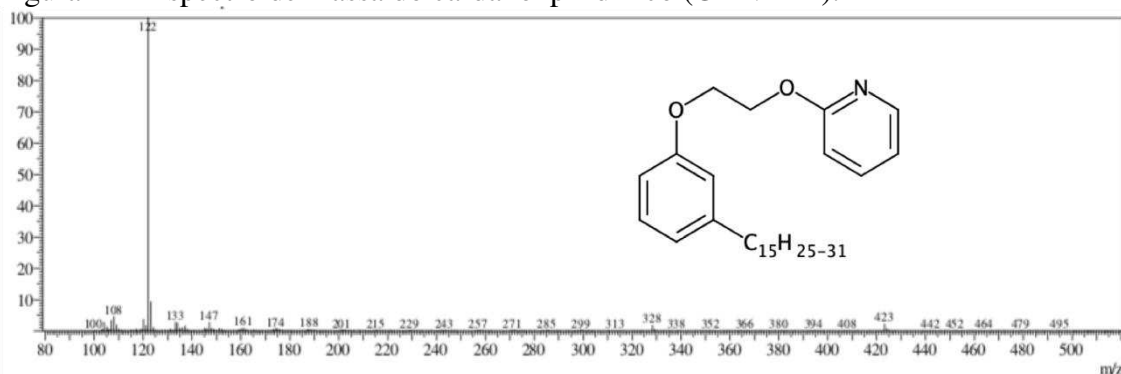
Fonte: Próprio autor.

2.4.3 Síntese e caracterização do derivado piridínico do cardanol

Após a síntese, o precursor cardanol bromado (CDN-Br) foi caracterizado por meio das técnicas CG/EM e RMN ^1H . No espectro de massa (Apêndice G) foi possível observar a presença do pico relativo ao íon molecular $[\text{M}^+]$ com razão m/z de 410, compatível com a massa molecular do produto desejado. No espectro de RMN de ^1H (Apêndice G), também foi possível confirmar a obtenção do CDN-Br, por meio da análise dos picos referentes a sua estrutura química.

Após a síntese e purificação em coluna cromatográfica, o cardanol piridínico (CDN-BrP) foi caracterizado por meio das técnicas CG/EM, RMN ^1H , FT-IR e TGA. Por se tratar de um composto inédito, os respectivos espectros serão mostrados e discutidos. No espectro de massa (Figura 14), foi possível observar a presença do pico relativo ao íon molecular $[\text{M}^+]$ com razão m/z de 423, compatível com a massa molecular do produto desejado, e a presença de um pico mais intenso (pico base) com m/z 122, referente ao fragmento mais estável do CDN-BrP.

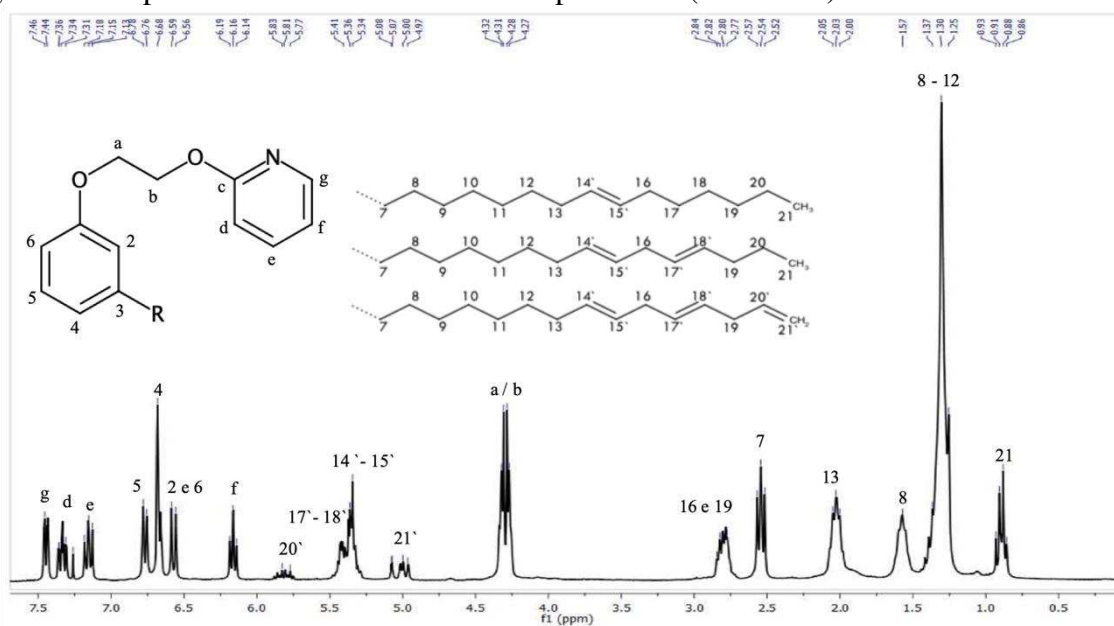
Figura 14 - Espectro de massa do cardanol piridínico (CDN-BrP).



Fonte: Próprio autor.

No espectro de RMN ^1H do CDN-BrP (Figura 15), foi possível observar um sinal, multipeto, com deslocamento químico próximo a 4,25 ppm, atribuído aos hidrogênios dos grupamentos CH_2 (posições **a** e **b**) ligados aos átomos de oxigênio da molécula. Observou-se, também, sinais com deslocamentos 6,16; 7,16; 7,33 e 7,44 ppm referentes aos hidrogênios (posições **f**, **e**, **d** e **g**, respectivamente) do anel aromático do grupo piridínico. Todos os sinais ditos acima, são as principais diferenças quando comparados aos sinais presentes no espectro de RMN de ^1H do CDN-Br, confirmando assim a obtenção do CDN-BrP.

Figura 15 - Espectro de RMN ^1H do cardanol piridínico (CDN-BrP).



Fonte: Próprio autor.

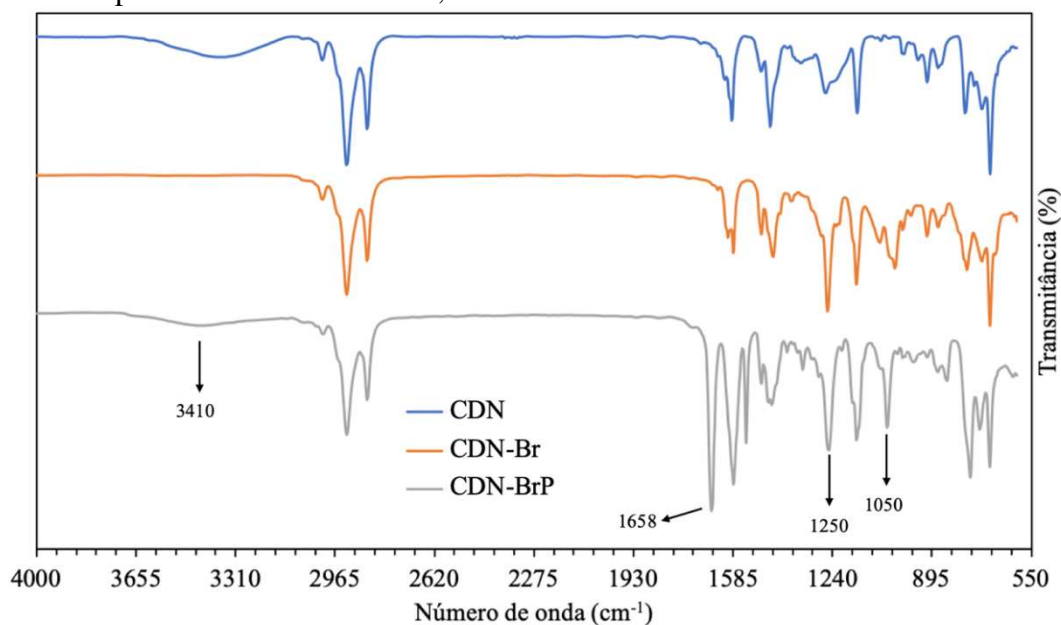
A Figura 16 mostra os espectros de infravermelho do CDN-BrP, CDN-Br e CDN. Os espectros desses dois últimos compostos são mostrados para melhor visualizar as diferenças entre as bandas referentes as modificações químicas feitas na estrutura do cardanol. De acordo

com a Figura 16, no espectro do CDN-BrP, foi possível observar uma pequena banda de absorção por volta de 3410 cm^{-1} que pode ser atribuída ao estiramento vibracional da ligação O-H ou N-H.

A 2-hidroxipiridina, reagente usado na síntese do CDN-BrP, apresenta duas formas tautoméricas estáveis, a forma enol e a forma ceto, esta última denominada 2-piridona (Figura 17) (MATSUDA *et al.*, 2001). Portanto, as ligações O-H e N-H, podem ser explicadas devido a possível presença dessas duas formas tautoméricas.

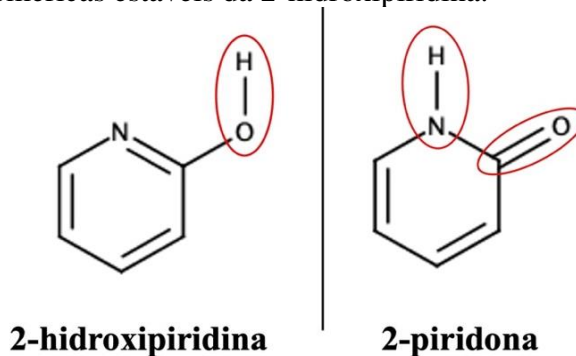
Observou-se, também, bandas de absorção por volta de 1658 cm^{-1} , característica de estiramento vibracional da ligação C=O, que também pode ser explicada devido a possível presença da 2-piridona, 1250 cm^{-1} , característica de estiramento vibracional da ligação C-N, e 1050 cm^{-1} , característica de estiramento vibracional da ligação C-O.

Figura 16 - Espectro de FT-IR do CDN, CDN-Br e CDN-BrP.



Fonte: Próprio autor.

Figura 17 - Formas tautoméricas estáveis da 2-hidroxipiridina.

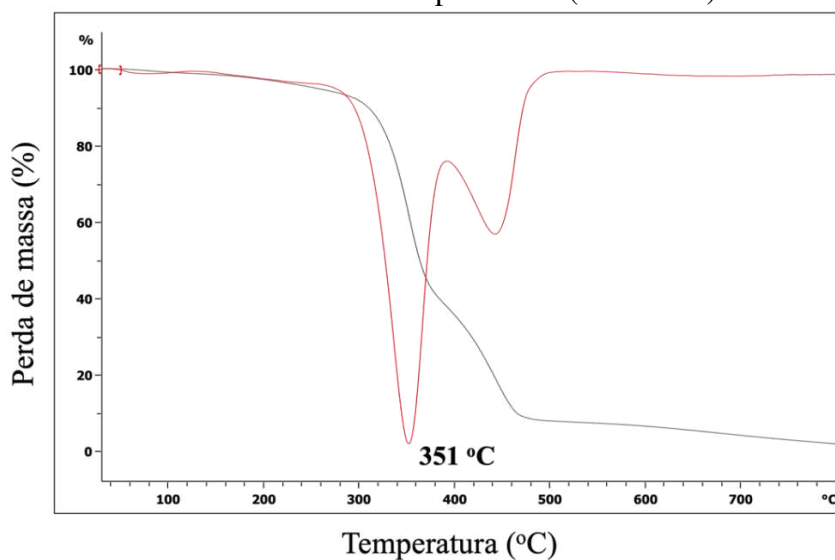


Fonte: Próprio autor.

A estabilidade térmica do CDN-BrP foi investigada através da análise termogravimétrica (TGA), uma técnica termoanalítica que possibilita o monitoramento da perda ou ganho de massa da amostra, em função da temperatura ou do tempo. Essa análise foi realizada sob atmosfera inerte (N_2), a fim de conhecer as temperaturas iniciais dos eventos de degradação.

A Figura 18 ilustra as curvas de TGA e DTG do CDN-BrP. Notou-se que o derivado piridínico apresentou uma temperatura inicial de degradação de 325 °C, e, a temperatura máxima de degradação ocorreu por volta de 351 °C. É evidente que as modificações químicas no cardanol levaram a obtenção de um produto com maior estabilidade térmica, uma vez que a perda de massa inicial do cardanol (CDN) ocorre na faixa de temperatura de 251 °C (ALMEIDA *et al.*, 2020).

Figura 18 - Curvas de TGA e DTG do cardanol piridínico (CDN-BrP).



Fonte: Próprio autor.

2.4.4 Microcápsulas de cardol e cardanol

Cardol e cardanol foram microencapsulados com pectina cítrica, objetivando potencializar suas propriedades como larvicidas. Alguns larvicidas são aplicados em altas doses, podem ser voláteis ou interagir com agentes ambientais externos. A microencapsulação pode contornar esses problemas, pois o composto encapsulado não fica exposto, e conseqüentemente seu tempo de ação se prolonga, uma vez que será liberado gradualmente (LLE *et al.*, 2016; NOH *et al.*, 2018).

A primeira etapa do ciclo de vida do *Aedes aegypti*, os ovos, pode ter duração de até um ano e sua eclosão só é iniciada com a chegada das chuvas (WHOa, 2022). Assim, faz-se necessário a criação de larvicidas microencapsulados, que possam ser liberados gradativamente, e conseqüentemente com maior tempo de ação, impedindo, dessa forma, o desenvolvimento da larva.

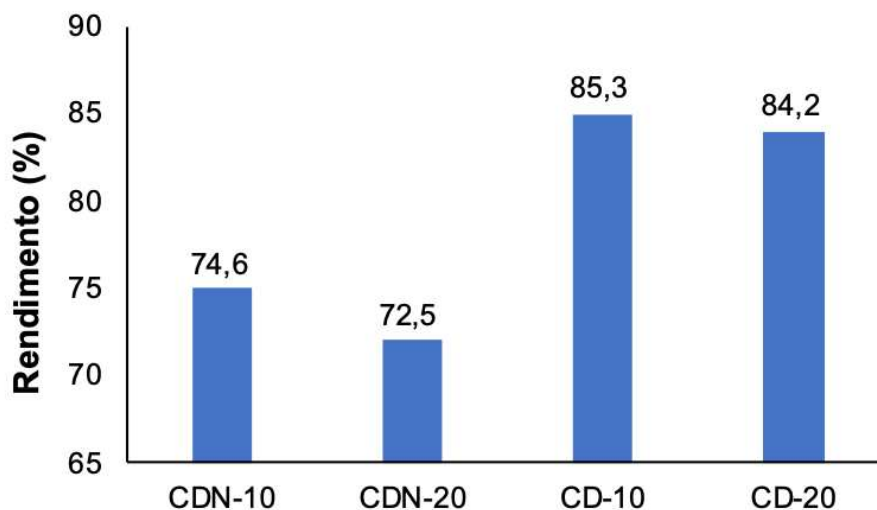
A solubilidade do encapsulante em água deve ser avaliada. Por exemplo, a galactomanana, polissacarídeo de sementes de olho-de-pavão (*Adenantha pavonina* L), vem sendo bastante utilizada como encapsulante na liberação controlada de fármacos por via oral (FARIAS *et al.*, 2018; JOSINO *et al.*, 2021). No entanto, ela apresenta alta solubilidade em água, não sendo vantajoso o seu uso em aplicações larvicidas, uma vez que as larvas do *Aedes aegypti* sobrevivem em meio aquoso (DOS SANTOS *et al.*, 2015).

Neste trabalho, o encapsulante utilizado foi a pectina cítrica, uma vez que apresenta menor solubilidade em água comparada a galactomanana. As microcápsulas de cardol e cardanol foram avaliadas quanto ao rendimento e eficiência da microencapsulação, e caracterizadas pelas técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia na Região do Infravermelho.

2.4.4.1 Rendimento e eficiência da microencapsulação

Com o intuito de averiguar a viabilidade da gelificação iônica, foi avaliado o rendimento do processo de obtenção dos sistemas microencapsulados. Todos os sistemas apresentaram rendimentos acima de 70% (Figura 19), indicando a escolha adequada da técnica de microencapsulação empregada neste estudo. Vale ressaltar que, a pectina cítrica mostrou uma pequena perda durante o processamento.

Figura 19 - Rendimento do processo de obtenção das microcápsulas.

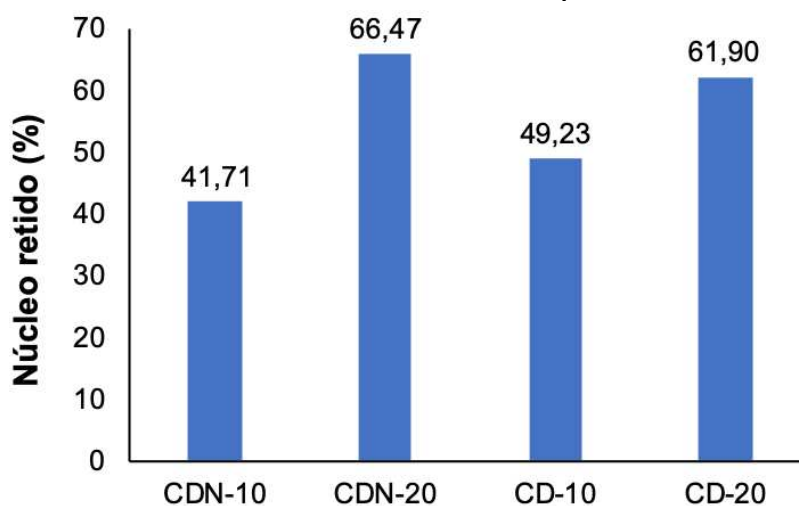


Fonte: Próprio autor.

Os maiores valores de rendimento foram observados para as menores concentrações de núcleo, CDN-10 e CD-10. Como nesses sistemas foram utilizadas menores quantidades de cardanol e cardol, isso possibilita uma consequente redução na perda de material durante o preparo das soluções. Essa perda de material pode se intensificar com o aumento da quantidade de núcleo, tornando a solução mais viscosa e consequentemente mais material aderido na parede do recipiente, diminuindo assim o rendimento.

Muitas vezes o encapsulante não é adequado para o núcleo, apresentando baixa retenção. Para verificar a capacidade de retenção do encapsulante utilizado, fez-se o cálculo da quantificação, por meio dos dados obtidos na curva de calibração do cardol e cardanol ($\lambda_{\text{CDN}} = 273 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{CD}} = 275 \text{ nm}$). Os valores do teor de núcleo retido no interior das microcápsulas estão expostos na Figura 20.

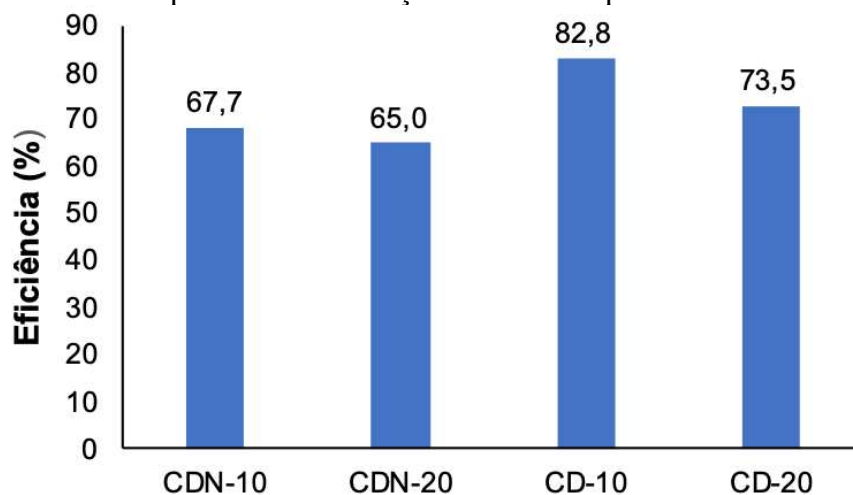
Figura 20 - Teor de núcleo retido no interior das microcápsulas.



Fonte: Próprio autor.

Por fim, fez-se o cálculo da eficiência (Figura 21), onde foi possível observar que todos os sistemas apresentaram eficiência de microencapsulação acima de 65%, com destaque para a formulação CD-10, que mostrou a maior eficiência, 82,8%. Portanto, a partir dos resultados obtidos pode-se concluir que, a pectina cítrica apresenta alta elegibilidade para seu uso como encapsulante graças ao seu considerável poder de retenção. Resultados semelhantes foram observados por diversos autores em que usaram a pectina cítrica como encapsulante (NOH *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2021).

Figura 21 - Eficiência do processo de obtenção das microcápsulas.

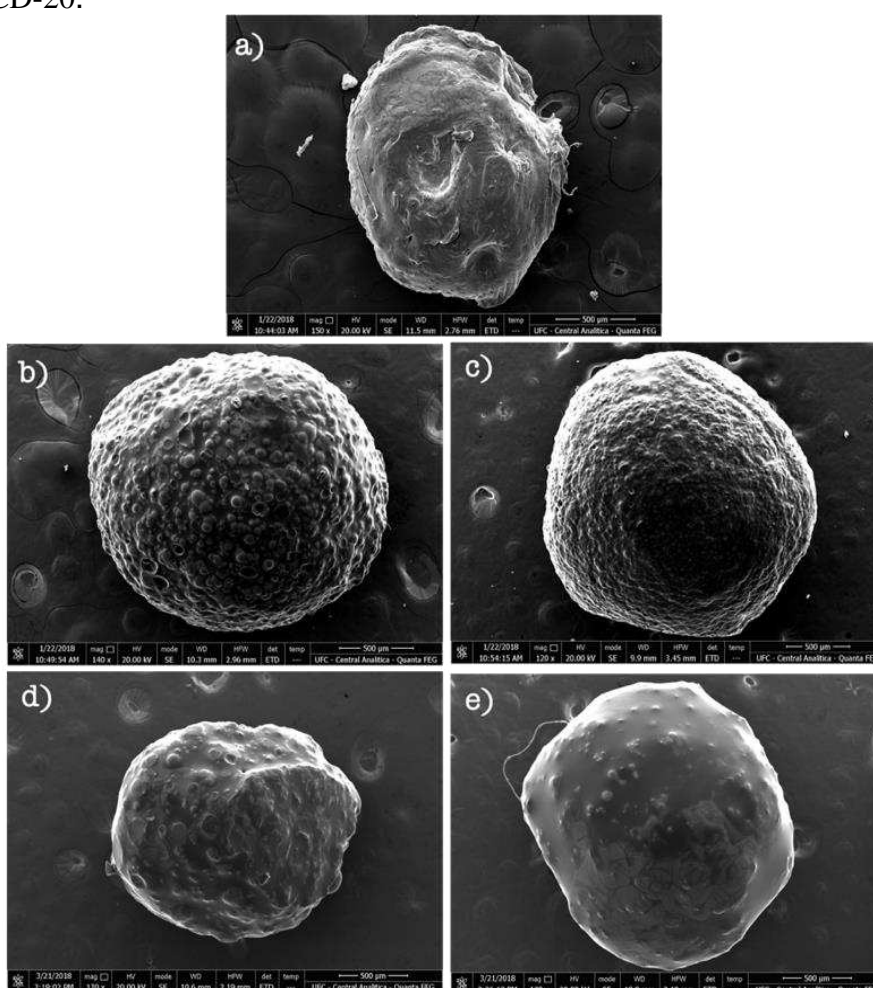


Fonte: Próprio autor.

2.4.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi feita para avaliar a morfologia da superfície externa das microcápsulas, com e sem núcleo. Por meio dessa análise é possível observar o formato e se há presença de poros ou fissuras. Essas observações são importantes, pois irão influenciar na velocidade de liberação do núcleo, e por consequência, na atividade larvívica. As micrografias encontram-se reunidas na Figura 22.

Figura 22 - Micrografias das microcápsulas: a) pectinato de cálcio, b) CDN-10, c) CDN-20, d) CD-10 e e) CD-20.



Fonte: Próprio autor.

De acordo com as micrografias, observou-se que a microcápsula de pectinato de cálcio (Figura 22a) apresentou uma superfície irregular, porém íntegra, selada e sem porosidade. A micrografia desse sistema foi feita com o objetivo de comparar sua superfície com as demais microcápsulas de cardol e cardanol.

Nas micrografias das microcápsulas com núcleo (Figura 22**b, c, d e e**), foi possível observar superfícies diferentes, íntegras e sem porosidade, comprovando assim, a adequação do encapsulante escolhido. Nesses sistemas, observou-se, também, a presença de rugosidades, semelhantes a semiesferas (gotículas) nas superfícies, as quais são mais evidentes nas microcápsulas de cardanol.

As microcápsulas com menor concentração de núcleo (CD-10 e CDN-10) apresentaram superfícies mais rugosas comparadas as superfícies das microcápsulas CD-20 e CDN-20. Essa rugosidade pode ser devido a presença de núcleo na superfície, o que acarretará uma liberação mais rápida do mesmo. Esse fato pode ser comprovado com base nos valores de quantificação mostrados na Figura 20, quando se aumenta o teor de núcleo observa-se uma maior retenção. Portanto, todos os sistemas apresentaram microestruturas parecidas, formatos semiesféricos, sem poros, fissuras ou imperfeições que possam comprometer a efetividade da microencapsulação.

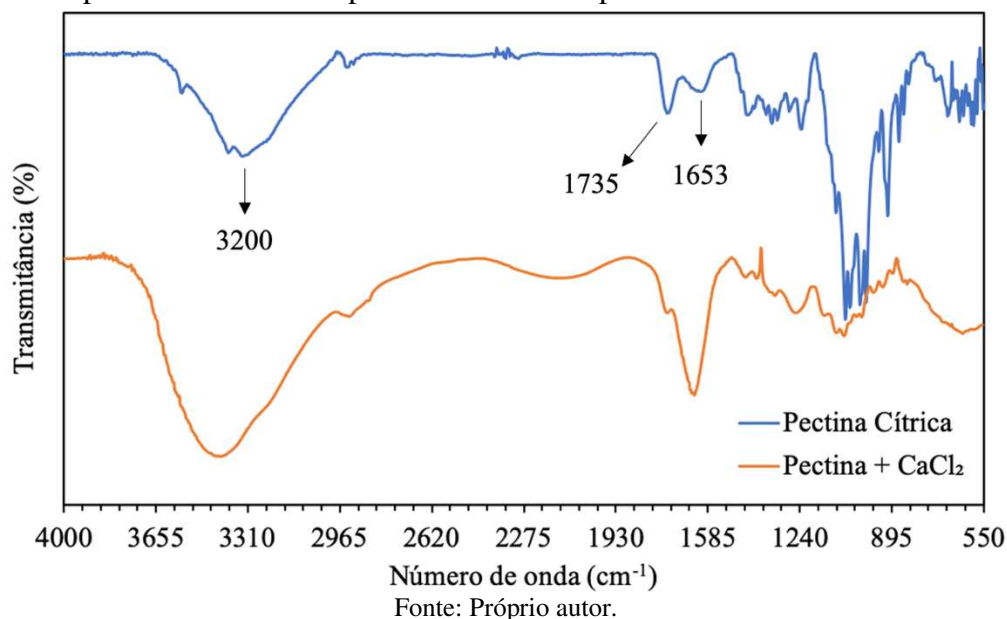
2.4.4.3 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

As análises de infravermelho foram realizadas com o intuito de avaliar a compatibilidade entre encapsulante e núcleo, e verificar se houve reação química entre eles. Esta análise permite confirmar a presença das principais bandas referentes as ligações cruzadas entre a pectina cítrica e o cloreto de cálcio (CaCl_2), além daquelas que confirmam a presença de cardol e cardanol nas microcápsulas. Quando o cátion divalente de cálcio forma ligação iônica com o ânion carboxilato da pectina, fortes interações eletrostáticas impedem o estiramento assimétrico desse ânion (RIBEIRO *et al.*, 2021).

A Figura 23 apresenta os espectros da pectina cítrica isolada e do sistema pectinato de cálcio (pectina + CaCl_2). De acordo com a figura, no espectro da pectina, foi possível observar uma banda larga e de forte intensidade em 3200 cm^{-1} referente ao estiramento de grupos hidroxila (O-H), estando associada à presença de água, bem como, às interações de hidrogênio inter e intramoleculares das unidades do ácido galacturônico. Observou-se, também, uma banda em 1735 cm^{-1} atribuída aos estiramentos de grupos carboxílicos metil esterificados (C=O), e uma banda em 1653 cm^{-1} característica de estiramentos de grupos carboxilatos (COO^-). Resultados semelhantes foram observados por diversos autores da literatura (NOH *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2021; PINHEIRO *et al.*, 2022). Em relação ao espectro do pectinato de cálcio,

observou-se as mesmas bandas presentes no espectro da pectina, uma vez de trata de uma microcápsula composta apenas de pectina.

Figura 23 - Espectros de FT-IR da pectina cítrica e do pectinato de cálcio.

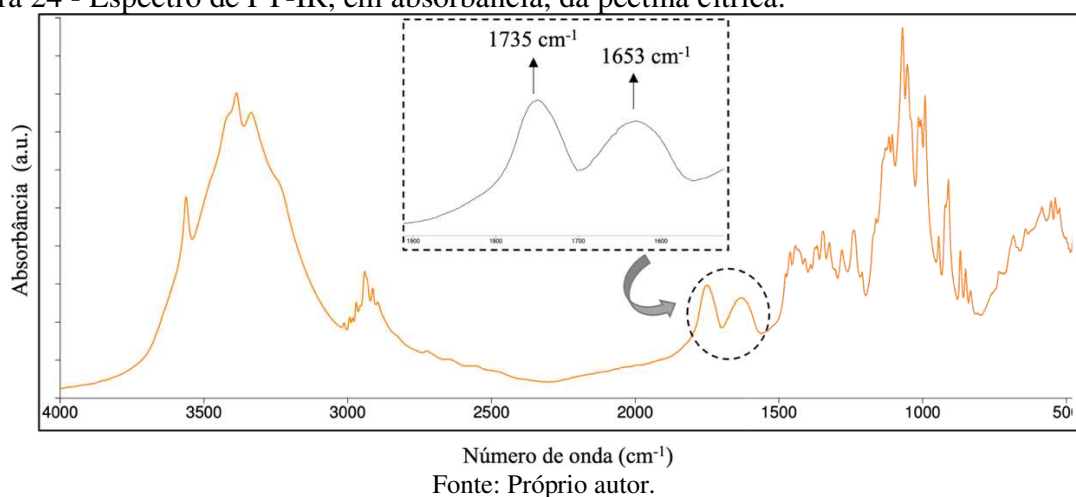


O espectro de infravermelho da pectina pode ajudar a identificar o grau de metoxilação (GM), o qual está correlacionado com as duas bandas espectrais que são usadas para determinar esse grau, a banda por volta de 1730 cm^{-1} (característica de ésteres carboxílicos) e a banda em torno de 1630 cm^{-1} (característica de ácidos carboxílicos desprotonados). O método baseia-se na medida da razão entre a área da banda em 1730 cm^{-1} e a soma das áreas das bandas em 1730 cm^{-1} e em 1630 cm^{-1} (KYOMUGASHO *et al.*, 2015), como mostra a equação a seguir:

$$GM (\%) = \frac{A_{\text{COOR}}}{A_{\text{COOR}} + A_{\text{COO}^-}}$$

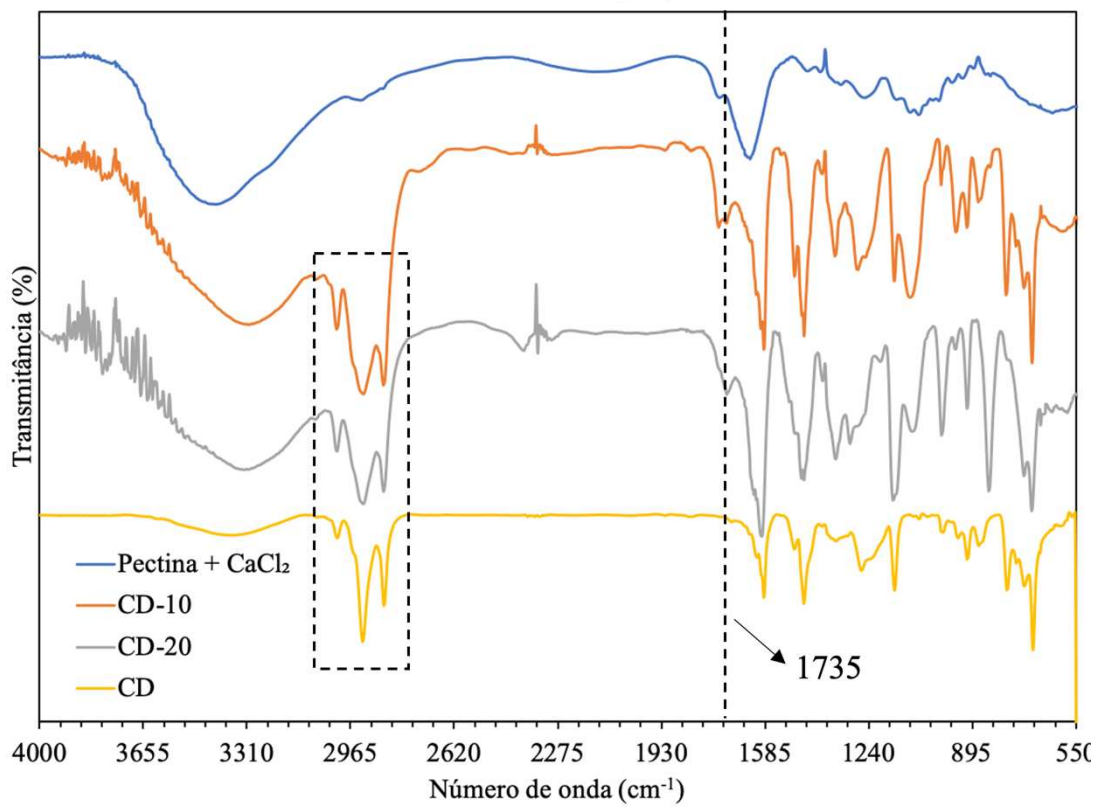
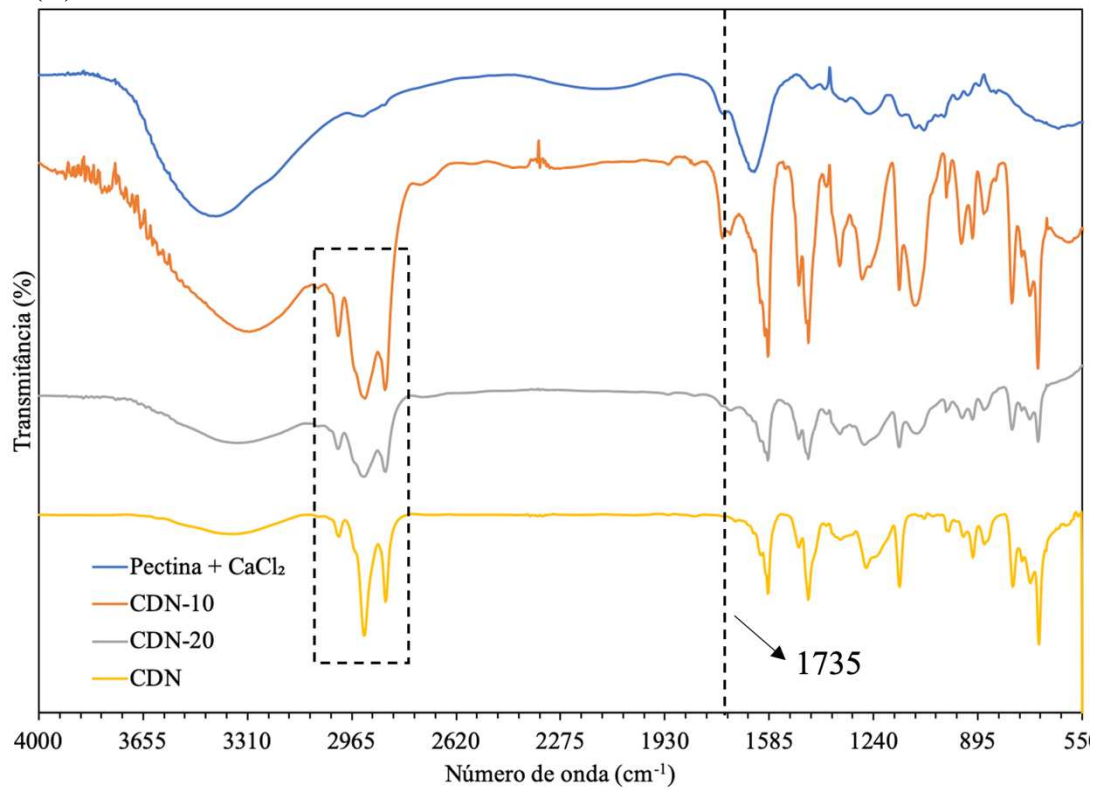
A Figura 24 mostra o espectro de infravermelho, em absorvância, da pectina cítrica, bem como a ampliação da região entre 1730 e 1630 cm^{-1} . Os cálculos a partir do espectro e da equação acima, indicam que a pectina usada nesse trabalho apresentou grau de metoxilação de 49,64%, sendo classificada como de baixa metoxilação ($GM < 50\%$). A área da banda em 1735 cm^{-1} foi 14,07 e a área da banda em 1653 cm^{-1} foi 14,27. Resultados semelhantes foram observados por RIBEIRO *et al.* (2021), em que utilizaram a pectina cítrica para encapsular a mangiferina.

Figura 24 - Espectro de FT-IR, em absorbância, da pectina cítrica.



No que diz respeito aos sistemas microencapsulados, os espectros apresentaram uma junção das bandas do pectinato de cálcio e dos respectivos núcleos isolados (Figura 25). Nos espectros de CDN e CD, observou-se as bandas em 3009, 2926 e 2854 cm⁻¹ atribuídas ao estiramento da ligação C-H sp² (alifático) e aos estiramentos assimétrico e simétrico de CH₂ da cadeia alifática, respectivamente. Essas mesmas bandas estão presentes nos espectros dos sistemas microencapsulados, indicando a presença de cardanol e cardol dentro das microcápsulas de pectina. Vale ressaltar que, CDN e CD apresentam praticamente os mesmos estiramentos, com pequenas diferenças de número de onda, devido a presença de outro grupo doador de elétrons (-OH) no cardol.

Figura 25 - Espectros de FT-IR dos sistemas microencapsulados com cardanol (A) e com cardol (B).



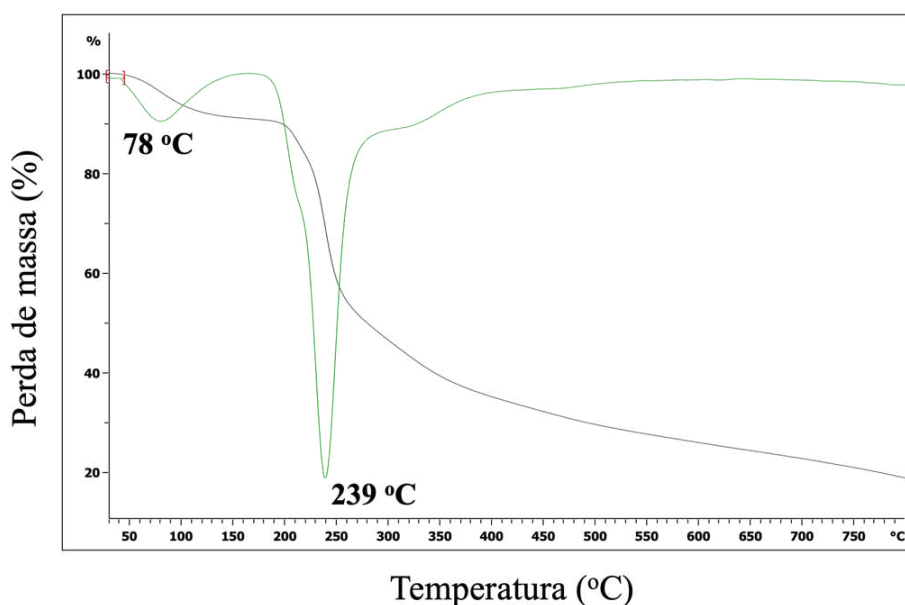
Fonte: Próprio autor.

Observou-se, também, que a banda em 1735 cm^{-1} presente no espectro do pectinato de cálcio, não sofreu alteração nos espectros dos sistemas microencapsulados, indicando que o encapsulante não interagiu com o núcleo. Em relação as demais bandas, os espectros mostraram, de maneira geral, que os sistemas apresentaram basicamente os mesmos estiramentos comparados aos núcleos isolados. Assim, comprova-se a manutenção da integridade das microcápsulas, pois não houve interação química entre a pectina e os núcleos estudados, confirmando a eficiência dessa matriz polimérica como encapsulante.

2.4.4.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 26 ilustra as curvas de TGA e DTG da pectina. Inicialmente, foi observado um evento em 78 °C referente à perda de água, com uma perda de massa associada de 10% . Observou-se, também, um evento por volta de 239 °C , atribuído a temperatura máxima de degradação da cadeia polimérica da pectina, com perda de massa total de 30% . Vale ressaltar que, a temperatura inicial de degradação da pectina ocorreu na faixa de 216 °C . A evaporação de água residual ocorreu em temperatura abaixo de 150 °C , estando de acordo com o que já se tem reportado sobre decomposição térmica de polissacarídeos (DALPASQUALE *et al.*, 2016; SESLIJA *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2021).

Figura 26 - Curvas de TGA e DTG da pectina cítrica.



Fonte: Próprio autor.

2.4.5 Atividade larvicida

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.

Os compostos fenólicos derivados de fontes naturais apresentam uma ampla gama de propriedades biológicas, incluindo a larvicida (DEVI; BORA, 2017). Trabalhos anteriores (LOMONACO *et al.*, 2009) avaliaram o efeito do LCC técnico e de seus principais constituintes (cardanol e cardol) como agentes larvicidas, e como resultado, dentre os compostos avaliados, o cardol apresentou o menor valor de CL_{50} . Amostras apresentando valores de $CL_{50} < 100$ ppm são consideradas ativas e constituem-se em fortes candidatas ao combate do mosquito.

Sendo assim, com o intuito de melhorar ainda mais o efeito larvicida do cardol, adicionou-se grupos fosfato e fosforotioato a sua estrutura, dando origem aos derivados: CD-mP, CD-mPS, CD-dP e CD-dPS (Figura 9, Página 33).

A Tabela 1 apresenta os valores de CL_{50} para o LCC técnico, cardanol, cardol e os derivados organofosforados e piridínico. De acordo com a tabela, foi possível observar que a inserção de grupos fosfatos no cardol aumentou o valor de CL_{50} para mais de 100 ppm, sendo inadequado o seu uso para aplicações larvicidas. Por outro lado, observou-se como a presença do átomo de enxofre no grupo organofosforotioato é fundamental para a atividade larvicida.

Essa atividade apresentada pelo enxofre é ainda mais bem visualizada quando se compara os resultados entre os derivados mono e dissustituídos do cardol, onde se observa um aumento de 11 vezes da atividade larvicida, com diminuição da CL_{50} de 9,2 para 0,8 ppm, devido à presença de um segundo grupo tiofosforado, valor esse menor que o apresentado pelo larvicida comercial Temefos ($CL_{50} = 3,2$ ppm).

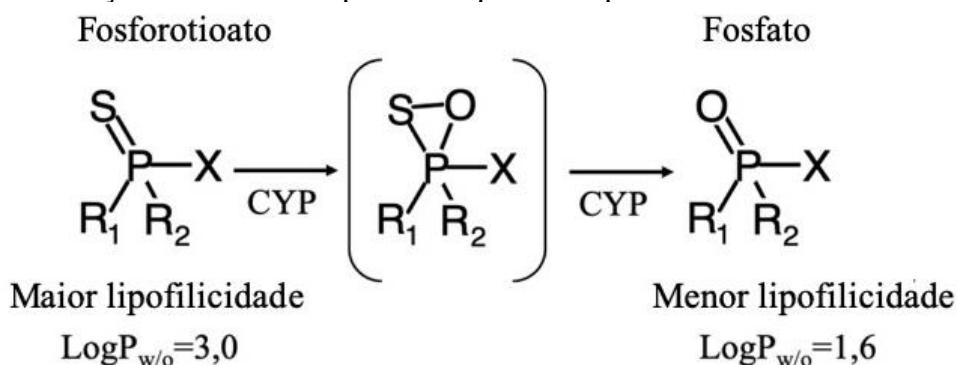
Tabela 1 - Valores de CL₅₀ do LCC técnico, cardanol, cardol e dos derivados organofosforados e piridínico.

Larvicida	CL ₅₀ (ppm)
LCC técnico	50,03 ± 0.61
Cardanol	28,90 ± 0.36
Cardol	13,10 ± 0.61
CD-mP	>100
CD-dP	>100
CD-mPS	9,2 ± 0.41
CD-dPS	0,8 ± 0.30
CDN-BrP	>100
Temefos	3,2

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 paration (fosfortioato) 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 fosfortioato 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 27) (VERHEYEN; STOKS, 2019). Isso explica a excelente atividade larvicida do composto **CD-dPS**.

Figura 27 - Oxidação enzimática do paration a paraoxon pelo citocromo CYP.



Fonte: Próprio autor.

Outra classe de compostos utilizados atualmente no combate ao *Aedes aegypti*, são os piridínicos, como o piriproxifen, disponíveis comercialmente. Em vista disso, com o objetivo de potencializar ainda mais a atividade larvicida dos derivados do LCC, realizou-se a síntese do derivado piridínico do cardanol (CDN-BrP). Vale salientar que, o cardanol foi escolhido pois é obtido mais facilmente e em grande quantidade comparado ao cardol.

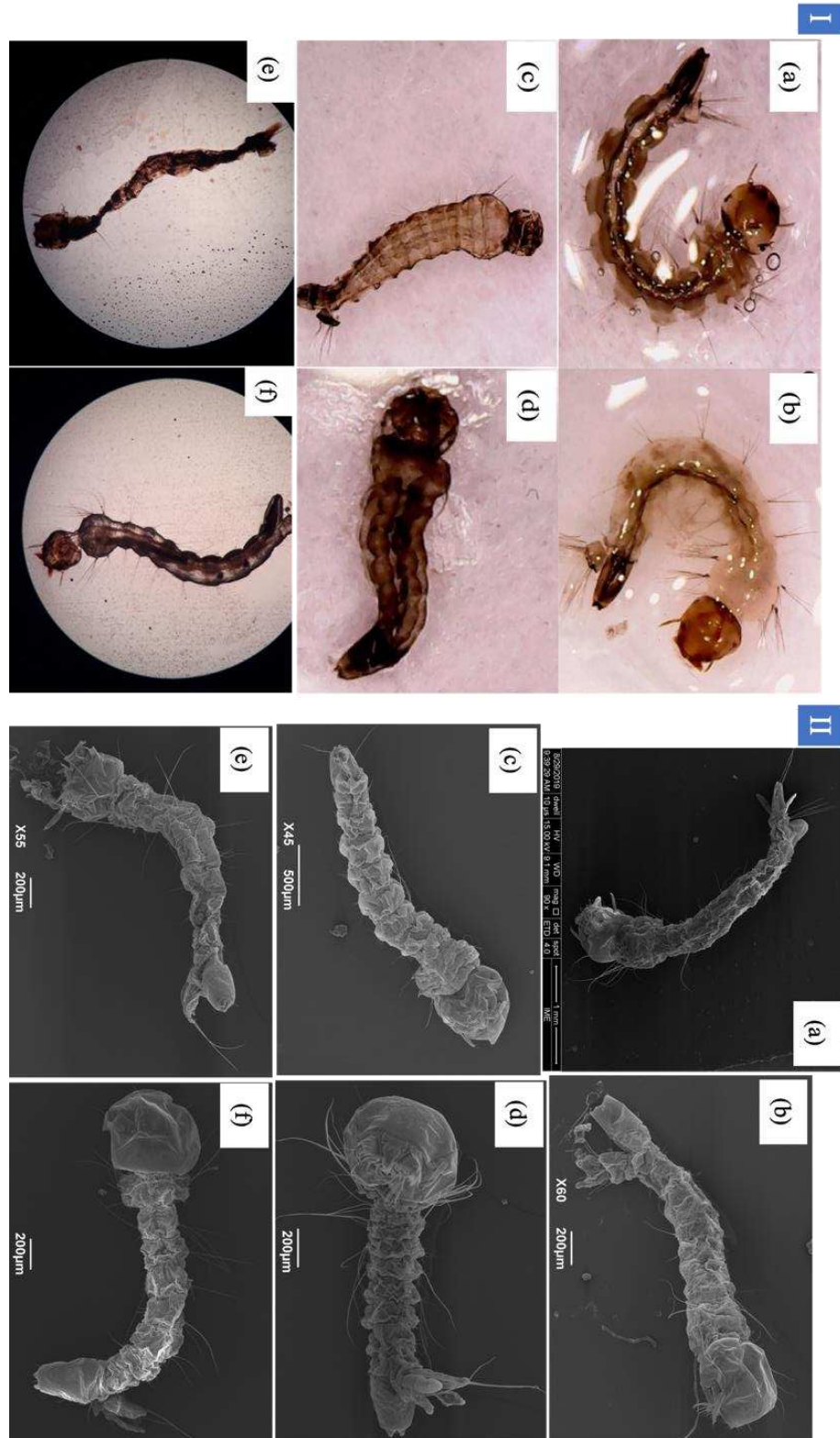
De forma geral, o CDN-BrP não apresentou atividade satisfatória, ou seja, sua concentração letal (CL_{50}) superou o limite de referência de 100 ppm (Tabela 1). Esperava-se que esse composto apresentasse o mesmo comportamento do larvicida comercial, piriproxifen, inibindo o desenvolvimento do mosquito mantendo-o na fase larval.

A atividade larvicida das microcápsulas de cardol e cardanol foi avaliada durante 7 dias. Ao final desse período observou-se que, todas as formulações mataram cerca de metade das larvas adicionadas. No entanto, as formulações de 10% mataram uma maior quantidade comparada às de 20 %. Isso se deve ao fato de que nos sistemas CDN-10 e CD-10, há presença de núcleo exposto na superfície, facilitando a liberação e conseqüentemente melhorando a atividade larvicida.

2.4.5.1 Alterações morfológicas

Após avaliação da atividade larvicida dos compostos sintetizados e dos sistemas microencapsulados, verificou-se as possíveis modificações causadas na estrutura externa das larvas após exposição aos larvicidas. As larvas foram inicialmente analisadas em microscópio (Microscope micrometer 300X), e em seguida por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura, onde as micrografias foram obtidas em um Microscópio modelo JEOL, JSM - 6390LV, pertencente ao Laboratório LIVEDIH da FioCruz, Rio de Janeiro. As imagens obtidas estão ilustradas na Figura 28.

Figura 28 - Morfologia das larvas do *Aedes aegypti*. (I) Microscópio e (II) MEV: (a) controle, (b) LCC técnico, (c) CD, (d) CD-dPS, (e) CDN e (f) CDN-BrP.



Fonte: Próprio autor.

De acordo com a Figura 28, as imagens obtidas no microscópio corroboram com as obtidas no MEV. Foi possível observar alterações nas estruturas externas de todas as larvas, após 24 horas de exposição aos larvicidas. Comparando todas as imagens ao grupo controle (Figura 28a), o LCC técnico (Figura 28b) causou destruição total da estrutura interna da larva. A exposição ao cardol (Figura 28c) causou perda de cerdas e encolhimento do exoesqueleto.

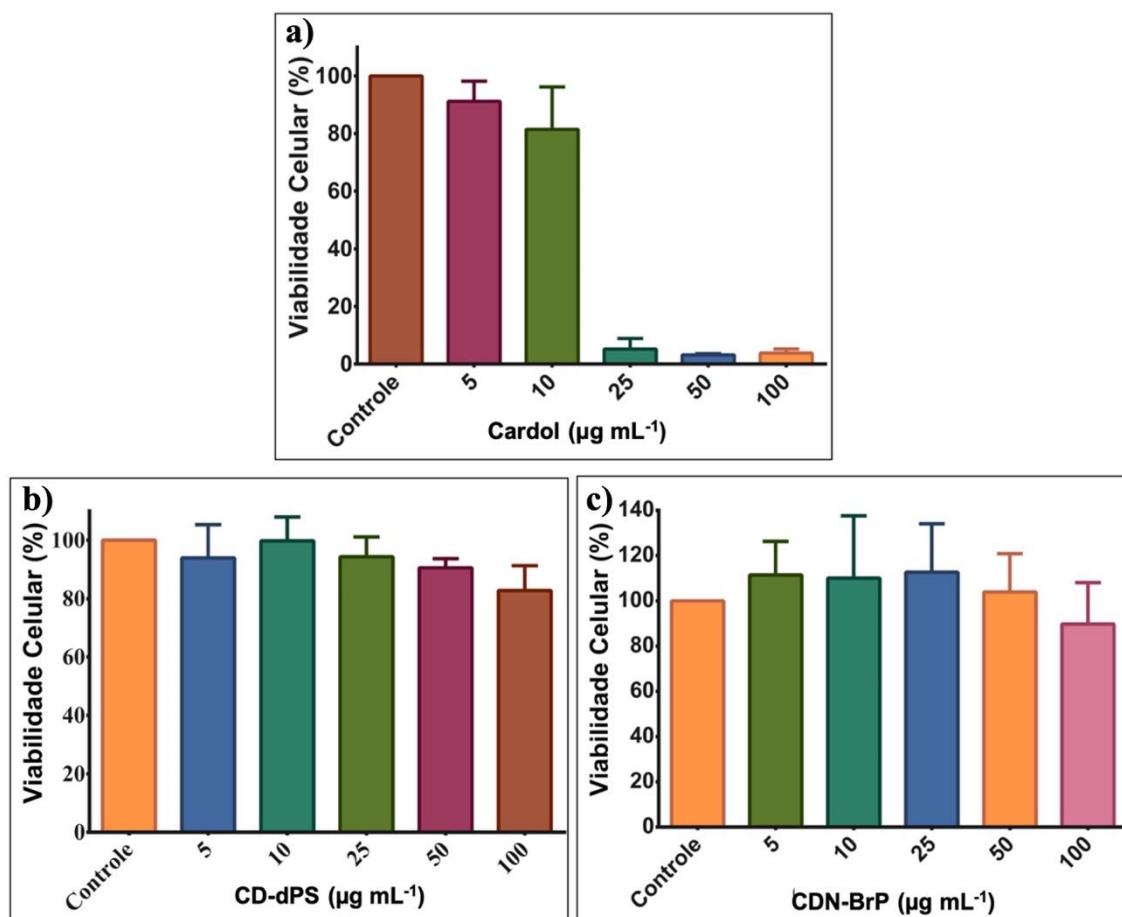
Vale ressaltar que, o derivado do cardol, CD-dPS (Figura 28d) paralisou as larvas após 1 h de contato, levando ao endurecimento e contração do exoesqueleto em 24 h. O cardanol (Figura 28e), além de causar o encolhimento do exoesqueleto, causou perda de cerdas e destruição total da estrutura interna da larva. O que pode ser evidenciado pela imagem do MEV, em que parte da cabeça foi destruída.

O cardanol piridínico, CDN-BrP, (Figura 28f) não causou danos severos na estrutura da larva, foi possível notar perda de cerdas e leve encolhimento do exoesqueleto. Portanto, todos os compostos avaliados causaram alterações na estrutura externa das larvas.

2.4.6 Estudo da citotoxicidade em macrófagos

Após análise da atividade larvicida, avaliou-se a toxicidade do CD, CD-dPS e CDN-BrP. Para isso, realizou-se o estudo da citotoxicidade em células de macrófagos (Figura 29). O CDN não foi avaliado, pois é insolúvel em DMSO 1%, meio em que os testes foram realizados.

Figura 29 - Estudo da citotoxicidade em macrófagos: a) CD, b) CD-dPS e c) CDN-BrP.



Fonte: Próprio autor.

Observou-se que o cardol é tóxico na concentração 25 µg.mL⁻¹, pois de acordo com o gráfico, a barra referente a essa concentração está bem menor comparada a barra do controle (células vivas de macrófagos), indicando que o cardol, nessa concentração, matou praticamente todas as células. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura (BEZERRA *et al.*, 2022).

O derivado tiofosforado do cardol, CD-dPS, não apresentou toxicidade em nenhuma das concentrações testadas, assim como o derivado piridínico do cardanol, CDN-BrP. Observou-se que este último estimula o crescimento dos macrófagos nas concentrações 5 a 50 µg.mL⁻¹.

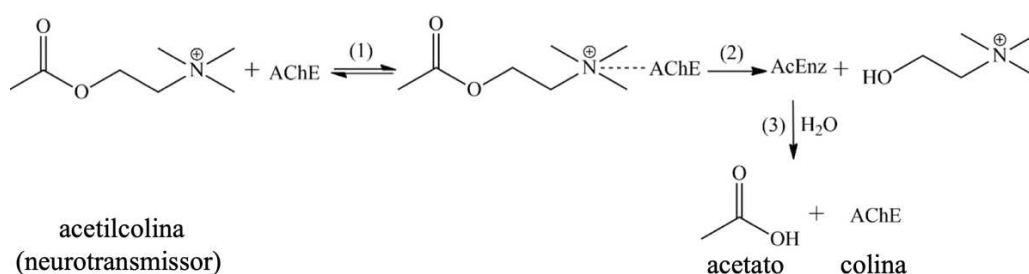
Vale ressaltar que, com base nos resultados dos testes larvicidas, o CDN- BrP apresentou CL₅₀ > 100 ppm. Sabendo que 100 ppm equivale a 100 µg.mL⁻¹, pode-se considerar que esse composto pode ser usado como potencial larvicida, pois nessa concentração o mesmo não é tóxico.

2.4.7 Ensaio da atividade anticolinesterase

Os compostos organofosforados utilizados como larvicidas atuam, basicamente, como inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), bloqueando sua função de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em acetato e colina. O acúmulo desse neurotransmissor provoca uma série de efeitos neurotóxicos, colapso do sistema nervoso central, levando à paralisia e, conseqüentemente, à morte da larva (HORN *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Segundo LOPEZ e FERNANDEZ-BOLANOS (2011), a reação de hidrólise entre ACh e AChE ocorre em três estágios, como mostrado na Figura 30: (1) formação do complexo de Michaelis entre o substrato, acetilcolina e AChE; (2) acetilação da enzima e formação de colina; e (3) hidrólise da enzima acetilada para produzir enzima livre e ácido acético.

Figura 30 - Reação de hidrólise da acetilcolina (ACh) pela enzima AChE.



Fonte: (Lopez e Fernandez-Bolanos, 2011).

Sabendo disso, avaliou-se o comportamento, frente a AChE, do derivado fosforado do cardol que apresentou melhor atividade larvicida, o CD-dPS. Para o teste de inibição da enzima AChE foi usado a Eserina, medicamento com atividade anticolinesterase, como controle positivo.

Durante o experimento, a formação de um halo branco (método Ellman) ao redor das manchas nas placas de CCD é uma indicação da inibição da AChE. O diâmetro dos halos (cm) foi comparado com o padrão positivo de Eserina. Conforme mostrado na Tabela 2, o composto CD-dPS apresentou o maior diâmetro (1,1 cm), seguido pelo Temefos (1 cm) e o CD-mPS (0,9 cm). O CD- dPS foi o que apresentou diâmetro do halo mais próximo do controle (1,5 cm), e, portanto, o mais eficiente.

Tabela 2 - Diâmetro do halo dos larvicidas com inibição da AChE.

Inibidor da AChE	Resultado	Diâmetro do halo
CD-mPS	positivo	0,9
Temefos	positivo	1,0
CD-dPS	positivo	1,1
Eserina	positivo	1,5

A atividade anticolinesterase dos derivados do LCC técnico, estudada anteriormente por OLIVEIRA et al. (2011), mostrou que o cardol e o cardanol apresentaram diâmetros de halo de 1,2 e 0,8 cm, respectivamente. Apesar da maior inibição da AChE do cardol *in vitro*, o composto CD-dPS tem melhor interação com a membrana celular, agindo assim de forma mais rápida e eficiente *in vivo*. Essa ação é comprovada no teste larvicida, onde o valor de CL₅₀ do cardol (13,10 ppm) é quase 18 vezes maior que o do CD-dPS (0,8 ppm). E, isso comprova que a adição do grupo fosforotioato à estrutura do cardol foi exitosa.

Dessa forma, foi possível verificar que os compostos sintetizados, com exceção apenas do CD-mP, CD-dP e CDN-BrP, apresentaram propriedades eficientes para serem usados como larvicidas, com valores de CL₅₀ < 100 ppm. Vale destacar que, CD-dPS foi o mais eficiente tanto como larvicida como inibidor da AChE, além de não apresentar toxicidade em células de macrófagos em nenhuma das concentrações testadas, assim como o CDN-BrP. Assim, o uso de compostos derivados da biomassa, além de sustentáveis, minimiza o impacto sobre o meio ambiente.

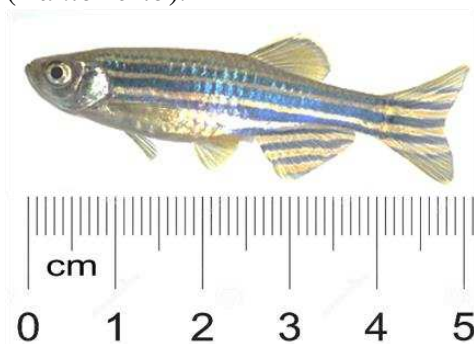
3 EFEITO ANSIOLÍTICO EM ZEBRAFISH (DANIO RERIO)

3.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1.1 Zebrafish (*Danio rerio*)

Modelos animais têm sido utilizados para ajudar a entender os efeitos de toxicidade aguda de inúmeros compostos químicos, além de avaliar seus possíveis mecanismos de ação. Estudos recentes colocaram o zebrafish adulto (*Danio rerio*) (Figura 31), um peixe usado em testes *in vivo*, em uma posição atraente para uso como modelo toxicológico (MAGALHÃES *et al.*, 2018). O animal é assim chamado pois apresenta listras lineares distintas, que se assemelham às listras da zebra (KATOCH; PATIAL, 2021).

Figura 31 - Zebrafish adulto (*Danio rerio*).



Fonte: Próprio autor.

O zebrafish, popularmente conhecido como paulistinha, é um pequeno peixe tropical de água doce, cujo comprimento é de cerca de 3 a 5 cm. Nativo do Norte da Índia, Norte do Paquistão e algumas regiões do Sul da Ásia, foi descoberto nos rios do Norte do Himalaia (Índia). Exibe dimorfismo sexual marcante com expectativa de vida entre 2 e 4 anos e alta produção de ovos por fêmea (aproximadamente 200 ovos/postura) (GEBAUER *et al.*, 2011; SIMONETTI *et al.*, 2015; CABALLERO; CANDIRACCI, 2018).

Por ser de baixo custo e devido aos seus mecanismos genéticos e bioquímicos conservados, o zebrafish vem sendo utilizado como alternativa ao uso de roedores. Diversos estudos confirmam que os perfis entre zebrafish e mamíferos são surpreendentemente semelhantes, ou seja, apresentam aproximadamente 70-80% de homologia genética humana (HOWE *et al.*, 2017; CABALLERO; CANDIRACCI, 2018). Além disso, seu pequeno porte requer baixas quantidades de amostra a ser analisada, possibilidade de realizar maior número

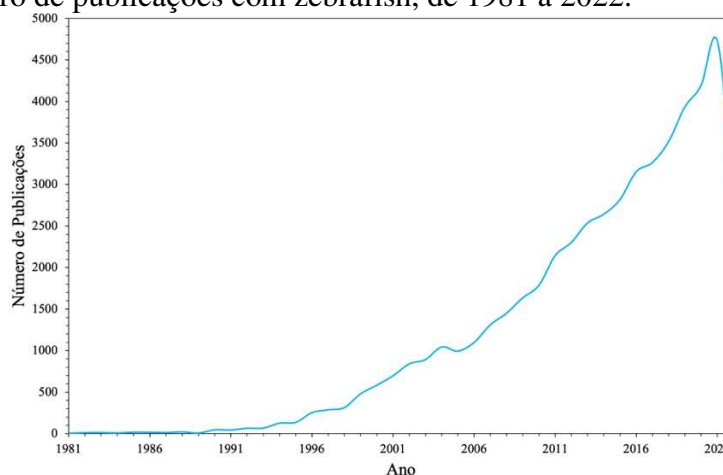
de testes e diminuição dos gastos operacionais da pesquisa (FACCIOL *et al.*, 2017; TAYLOR *et al.*, 2017).

Em 2007, a Academia Nacional de Ciências dos EUA publicou um relatório intitulado: Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy (Testes de Toxicidade no Século 21: Uma Visão e uma Estratégia), anunciando mudanças na forma como os testes de toxicidade eram realizados. De acordo com a academia, o teste de toxicidade em roedores e coelhos tem sido o padrão para avaliar a toxicidade aguda desde a década de 1950. No entanto, o procedimento além de caro é demorado, levando a atrasos nos testes químicos (KREWSKI *et al.*, 2010). Devido a essas limitações, a necessidade do uso de outros modelos animais alternativos aumentou.

George Streisinger, biólogo e professor da Universidade de Oregon (EUA), é considerado o introdutor do zebrafish como modelo animal na pesquisa científica. Streisinger estudou as vantagens da utilização do peixe para estudos genéticos e, em 1981 publicou um artigo, considerado um marco na medicina translacional. Desde então, os estudos envolvendo zebrafish cresceram significativamente (STREISINGER *et al.*, 1981).

A Figura 32 ilustra o gráfico, retirado do banco de dados do Scopus, com o número de publicações envolvendo o zebrafish, de 1981 a julho de 2022. É notável o crescente aumento nas publicações, em 2021 foram 4.727 artigos científicos publicados, e, até julho de 2022, esse número já chegou a 2.842 (SCOPUS, 2022). Desta forma, a praticidade e a eficiência tornam o zebrafish um modelo ideal para pesquisas em toxicologia, cujo objetivo é identificar os efeitos adversos da exposição ou uso de substâncias químicas.

Figura 32 - Número de publicações com zebrafish, de 1981 a 2022.



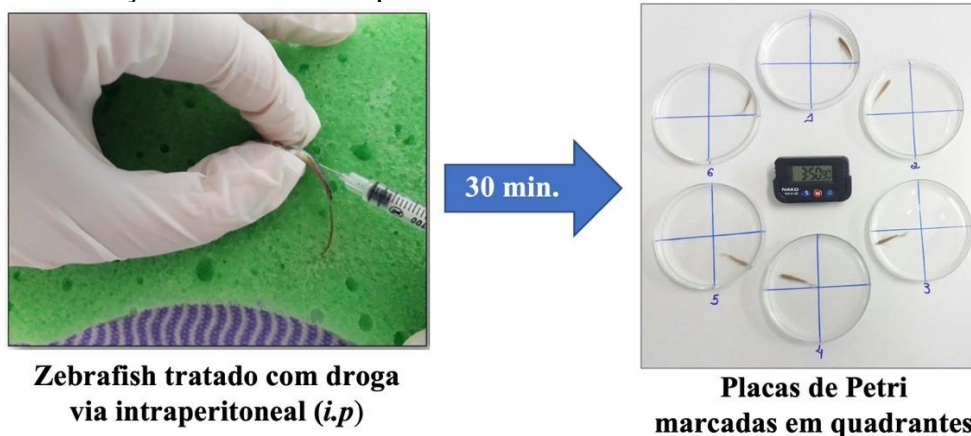
Fonte: (SCOPUS, 2022).

Além da toxicologia, outra principal linha de pesquisa realizada com zebrafish é a análise de comportamento. Nessa análise, o peixe é usado como modelo para avaliar a segurança e eficácia de compostos com ação ansiolítica (NOWICKI *et al.*, 2014; GAWEL *et al.*, 2020; JHA *et al.*, 2020; TIRABOSCHI *et al.*, 2020). Os testes comportamentais podem ajudar na compreensão da ação desses compostos, e acelerar o ritmo da descoberta de novos medicamentos ansiolíticos (GEBAUER *et al.*, 2011).

O comportamento do zebrafish pode ser avaliado por meio do teste de campo aberto, o qual é utilizado principalmente quando se tem o objetivo de analisar manifestações comportamentais sugestivas de ansiedade, estresse e, também, o efeito de possíveis fármacos (RESENDE; SOCCOL, 2015). O teste foi adaptado por AHMAD e RICHARDSON (2013), em placas de Petri, para avaliar a atividade locomotora do zebrafish sob ação de drogas analgésicas.

Objetivando aprimorar o teste, MAGALHÃES *et al.* (2017) simplificaram a técnica. Após o tratamento com drogas, os peixes foram adicionados em placas de Petri, marcadas com quatro quadrantes e a atividade locomotora foi analisada por meio da contagem do número de cruzamentos de linhas, durante 5 minutos (Figura 33).

Figura 33 - Ilustração do teste de campo aberto.



Fonte: Próprio autor.

O uso do zebrafish como modelo alternativo de animais em pesquisas na neurociência vem crescendo consideravelmente nos últimos anos. Estudos comportamentais associados à análise de ansiedade foram realizados por vários autores, onde avaliaram o efeito ansiolítico, em zebrafish, de diversas chalconas (FERREIRA *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2020; MENDES *et al.*, 2022).

3.1.2 Análise de ansiedade em zebrafish

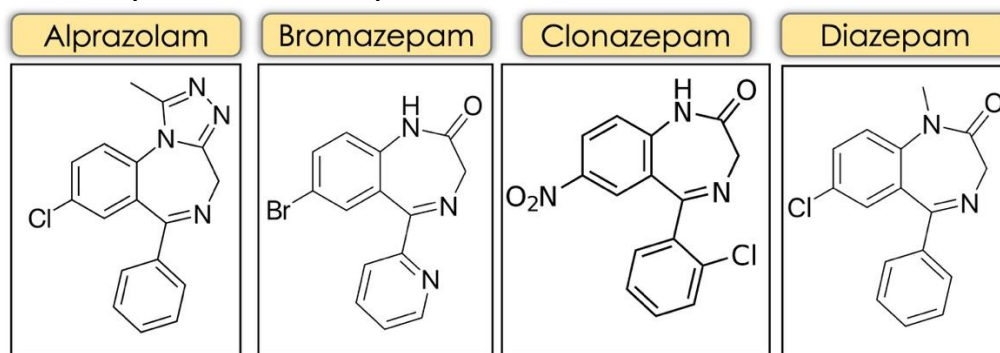
A ansiedade é um transtorno mental caracterizado por preocupação ou medo excessivo, resultando em inquietação, fadiga, falta de concentração, irritabilidade e insônia (SANTOMAURO *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2021). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2017, cerca de 3,6% da população mundial 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 (γ -GABA) (FERREIRA *et al.*, 2019). O complexo proteico GABA_A é um ligante endógeno de γ -GABA, o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central. O BZD se liga às subunidades alfa (α) e gama (γ) do receptor GABA_A, 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) (Figura 34), 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).

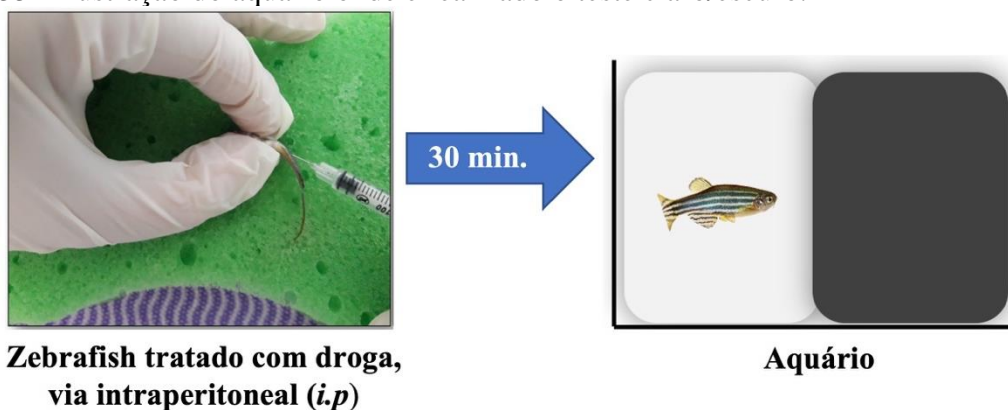
Figura 34 - Exemplos de benzodiazepínicos.



Fonte: Próprio autor.

Uma análise amplamente utilizada em roedores e atualmente adaptada para peixes, com o objetivo de avaliar ansiedade, é o teste claro/escuro (Figura 35). 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 35 - Ilustração do aquário onde é realizado o teste claro/escuro.



Fonte: Próprio autor.

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). O efeito ansiolítico dos constituintes do LCC foi estudado por JÚNIOR *et al.* (2018) em camundongos, onde mostraram que os ácidos anacárdicos do LCC têm efeito sedativo mediado pelo receptor GABA_A.

Com base nessas considerações e sabendo que os compostos sintetizados no trabalho foram avaliados quanto a atividade larvicida, faz-se necessário analisar, também, a toxicidade desses compostos, uma vez que serão aplicados em ambientes onde podem estar presentes

outros organismos aquáticos, além das larvas do *Aedes aegypti*. Assim, o estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade e o potencial ansiolítico dos constituintes do LCC (cardol, cardanol e ácido anacárdico) e dos derivados fosforado e piridínico.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Geral

Avaliar a toxicidade e o efeito ansiolítico dos constituintes do LCC e dos derivados fosforado e piridínico em zebrafish adulto (*Danio rerio*), e seus mecanismos de interação com os receptores GABA_A, por meio do docking molecular.

3.2.2 Específicos

- Avaliar a toxicidade aguda (96h) dos constituintes do LCC (CD, CDN e AA), e dos derivados tiofosforado (CD-dPS) e piridínico (CDN-BrP);
- Analisar a ação dos compostos no sistema locomotor do zebrafish por meio do teste de campo aberto;
- Averiguar o efeito ansiolítico e o mecanismo de ação ansiolítica dos compostos por meio do teste claro/escuro;
- Realizar o estudo *in silico* de docking molecular a fim de verificar possíveis interações dos compostos com os receptores GABA_A.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Materiais

Os reagentes e fármacos utilizados foram acetato de etila e n-hexano (Vetec Química®), Diazepam (DZP) (Neo Química®), Flumazenil (Sandoz®) e Dimetilsulfóxido (DMSO) (Dynamic®).

Zebrafish (*Danio rerio*) (60-90 dias de idade, peso de $0,4 \pm 0,1$ g e comprimento de $3,5 \pm 0,5$ cm), selvagens e de ambos os sexos, foram obtidos da Bio Pet Comércio de Produtos Veterinários LTDA (Fortaleza, Brasil).

3.3.2 Procedimento experimental

3.3.2.1 Obtenção do ácido anacárdico a partir do LCC natural

Cardanol e cardol foram isolados a partir do LCC técnico, de acordo com a metodologia descrita na seção 2.3.3.1.

O ácido anacárdico (AA) foi obtido a partir do LCC natural de acordo com metodologia previamente relatada, com algumas modificações (RIBEIRO *et al.*, 2013). Diluiu-se 10 g de LCC natural em uma mistura de metanol (45 mL) e água destilada (5 mL), em um balão de reação acoplado a um condensador. Em seguida, hidróxido de cálcio (5 g) foi adicionado para precipitar o AA como anacardato de cálcio (AC). A reação foi mantida a 50 °C por 90 minutos, resultando em um precipitado de coloração rosa, que foi filtrado e lavado com metanol. O AC foi seco em estufa a 60 °C por 2 horas. O pó de AC foi diluído em uma solução de ácido clorídrico a 5% (HCl) (50 mL), a qual foi transferida para um funil de separação contendo acetato de etila (50 mL). Em meio ácido, o AC sofre protonação, formando o AA, que devido à sua polaridade passa para o acetato de etila. O resíduo aquoso foi neutralizado e descartado, e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e, em seguida, concentrada em evaporador rotativo para obtenção do AA, que foi submetido à caracterização por RMN ¹H e ¹³C, e FTIR.

AA: RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 10,70 ppm (COOH); 7,37 ppm (1H,t); 6,87 ppm (1H, d); 6,78 ppm (1H, d); 5,82 ppm (2H, m); 5,43 ppm (4H, tq); 5,07 ppm (1Ha, dd, *cis*); 5,00 ppm (1Hb, dd, *trans*); 2,99 ppm (2H, t); 2,80 ppm (4H, dq); 2,04 ppm (2H, tt); 1,62 ppm (2H,

t); 1,34 ppm (8H, m); 0,91 ppm (3H, t). RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) δ : 175,92 ppm (COOH). FTIR: δ 1646 cm^{-1} $\nu(\text{C} = \text{O})$.

3.3.2.2 Síntese do derivado tiofosforado do cardol.

O composto CD-dPS foi obtido de acordo a metodologia descrita na seção 2.3.3.2 e caracterizado por CG/EM e RMN (^1H e ^{31}P).

3.3.2.3 Síntese do derivado piridínico do cardanol

O composto CDN-BrP foi obtido de acordo a metodologia descrita na seção 2.3.3.3 e caracterizado por CG/EM, RMN ^1H , FTIR e TGA.

3.3.2.4 Zebrafish adulto (*Danio rerio*)

Os peixes foram mantidos em um aquário de vidro (10 L, 30 cm x 15 cm x 20 cm) contendo água desclorada ProtecPlus® 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 alimentação foi oferecida, à 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.

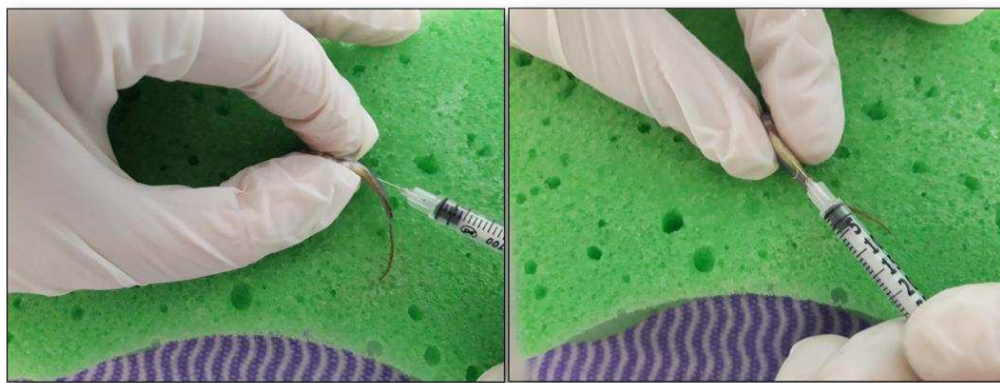
Os testes com o zebrafish foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais da UECE - Campus Itaperi, coordenado pela Profa. Dra. Jane Eire Bezerra de Menezes. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE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

3.3.2.5 Toxicidade aguda (96 horas)

O teste de toxicidade aguda (CL_{50} -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 ($n = 6/\text{grupo}$) foram tratados intraperitonealmente (*i.p.*) (Figura 36) com os compostos: CD, CDN, AA, CDN-BrP e CD-dPS (20 μL) (Figura 37) nas doses 4, 20 e 40 mg/Kg. DMSO 3% foi usado como controle negativo

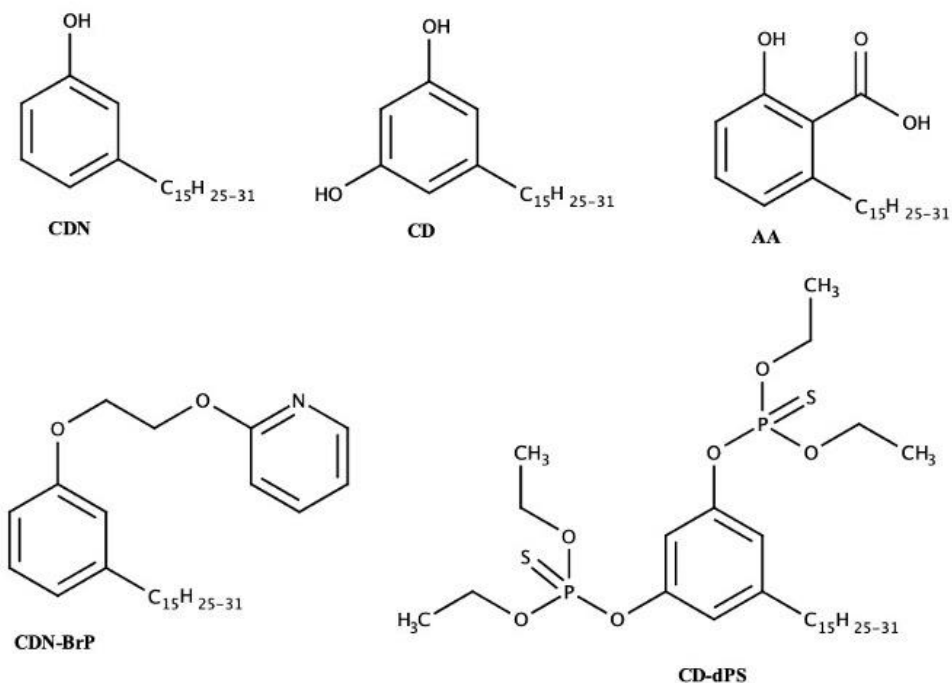
(20 μ L; *i.p.*). A mortalidade, em cada concentração, foi registrada após 24, 48, 72 e 96 horas. O número de peixes mortos foi submetido à análise estatística, estimando-se a dose letal para matar 50% (CL₅₀) pelo método Trimmed Spearman-Kärber com intervalos de confiança de 95%. Os tratamentos via intraperitoneal (*i.p.*) foram realizados com seringas de insulina (0,5 mL; UltraFine® BD) com agulha de calibre 30G.

Figura 36 - Injeção, via intraperitoneal (*i.p.*), das amostras no zebrafish.



Fonte: Próprio autor.

Figura 37 - Compostos avaliados nos testes com o zebrafish.



Fonte: Próprio autor.

3.3.2.6 Teste de campo aberto

Os animais ($n = 6/\text{grupo}$) foram tratados intraperitonealmente (*i.p.*) com 20 μL de CD, CDN, AA, CDN-BrP e CD-dPS 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 (MAGALHÃES *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).

3.3.2.7 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 ($n = 6/\text{grupo}$) foram tratados intraperitonealmente (*i.p.*) com 20 μL de CD, CDN, AA, CDN-BrP e CD-dPS 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.

3.3.2.8 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 ($n = 6/\text{grupo}$) foram tratados *i.p.* com flumazenil (4 mg/Kg; 20 μL), um antagonista do GABA. Após 15 min, os peixes foram tratados *i.p.* com CD, CDN, AA, CDN-BrP e CD-dPS, na dose efetiva mais baixa (4 mg/Kg, 20 μL) e DZP (4 mg/Kg; 20 μL). Como grupo controle, outros peixes ($n = 6/\text{grupo}$) 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 à zona

clara do aquário. O efeito ansiolítico foi quantificado como a porcentagem de permanência na zona clara (%PZC) durante 5 minutos.

3.3.2.9 Docking molecular

As interações entre os receptores GABA_A e os compostos foram analisadas por meio da análise de docking molecular. A estrutura química bidimensional dos ligantes, CD, CDN, AA, CDN-BrP e CD-dPS, foi desenhada usando o código MarvinSketch (<https://chemaxon.com/products/marvin>) (CSIZMADIA, 2019). As conformações de menor energia foram salvas e otimizadas usando ciclos de 50 interações do algoritmo *steepest descente* e campo de força Merck Molecular Force Field (MMFF94) (HALGREN, 1996) a partir do código Avogadro (HANWELL *et al.*, 2012). Os ligantes foram nomeados pelo grau de insaturação, saturado (C₁₅H₃₁), monoinsaturado (C₁₅H₂₉), di-insaturado (C₁₅H₂₇) e tri-insaturado (C₁₅H₂₅).

A estrutura tridimensional do receptor GABA_A foi obtida no repositório Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), está identificada como “*CryoEM structure of human full-length alpha1beta3gamma2L GABA(A)R in complex with diazepam (Valium), GABA and megabody Mb38*” (PDB ID 6HUP), depositada com resolução de 2,58 Å e determinada por microscopia eletrônica. Os resíduos presentes na estrutura da proteína foram removidos e os átomos de hidrogênios polares foram adicionados (YAN *et al.*, 2014).

Para a realização das simulações de docking molecular, foi utilizado o código AutoDock Vina (versão 1.1.2) (TROTT; OLSON, 2009). O espaço de simulação foi determinado a partir do grid box, que foi centralizado no alvo englobando toda a proteína, usando os eixos x, y e z: 125,281, 139,534, 136,018 respectivamente, com parâmetros de 126Å (x), 100Å (y) e 126Å (z). Cinquenta simulações independentes foram realizadas, obtendo-se 20 poses por simulação.

Para a seleção de simulações com melhores poses (*Best Pose*), foi utilizado o desvio quadrático médio, do inglês Root Mean Square Deviation (RMSD), onde valores menores que 2 Å são considerados ideais (YUSUF *et al.*, 2008).

A estabilidade dos complexos proteína-ligante formados foi avaliada utilizando a energia de afinidade (ΔG) (Equação 1), que tem como parâmetro de idealidade valores iguais ou inferiores a -6.0 kcal/mol (SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014). A partir dos valores de energia de afinidade, foram determinados os valores das constantes de inibição (K_i) (Equação 2) de cada complexo (KADELA-TOMANEK *et al.*, 2021).

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (1)$$

$$K_i = e^{(\Delta G/RT)} \quad (2)$$

Onde ΔG é a energia livre de ligação em $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, R ($8.32 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) é a constante dos gases, T (298K) é a temperatura absoluta e K_i é a constante de inibição.

Foram utilizados valores das distancias entre os átomos doadores e receptores para avaliar a força das ligações de hidrogênio (H-bond), onde as interações que ficaram entre 2.5 Å e 3.1 Å são classificadas como *Strong* (forte), entre 3.1 Å e 3.55 Å são consideradas *Average* (média) e distancias superiores a 3.55 Å são classificadas como *Weak* (fraca). Os resultados foram analisados e visualizados usando os códigos Discovery Studio Visualizer e UCSF Chimera (PETTERSEN *et al.*, 2004).

3.3.2.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média, para testes *in vitro* ($n = 3$), e média \pm erro padrão da média, para testes *in vivo* ($n = 6/\text{grupo}$). Após confirmação da distribuição de normalidade e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (one-way ANOVA), seguida do teste de Tukey, utilizando o software GraphPad Prism v. 7.0. O nível de significância estatística foi de 5% ($p < 0,05$).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Obtenção e caracterização dos constituintes do LCC

Cardanol e cardol foram obtidos a partir do LCC técnico e caracterizados por CG/EM, RMN de ^1H e ^{13}C e FTIR (Apêndices A e B).

Ácido anacárdico (6,8 g) foi obtido como um líquido escuro e caracterizado por RMN (^1H e ^{13}C) e FTIR. O espectro de FTIR do AA (Apêndice H) apresentou os estiramentos da cadeia lateral de 15 carbonos com insaturações, $\delta 3010\text{ cm}^{-1}$ $\nu(-\text{CH}=\text{CH}-)$, $\delta 2925\text{ cm}^{-1}$ $\nu(-\text{CH}_3)$, $\delta 2854\text{ cm}^{-1}$ $\nu(-\text{CH}_2)$, e o estiramento $\delta 1646\text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{C}=\text{O})$. Os espectros de RMN (^1H e ^{13}C) (Apêndice H) foram utilizados para complementar a caracterização do AA. Todos os espectros indicaram que há uma mistura dos homólogos mono, di e triinsaturados.

3.4.2 Síntese e caracterização do derivado organofosforado do cardol

Após a síntese e purificação em coluna, o composto CD-dPS foi caracterizado por CG/EM e RMN (^1H e ^{31}P). Os respectivos espectros estão apresentados no Apêndice F.

3.4.3 Síntese e caracterização do derivado piridínico do cardanol

Após a síntese e purificação em coluna, o composto CDN-BrP foi caracterizado por meio das técnicas CG/EM, RMN ^1H , FT-IR e TGA. Os respectivos espectros estão apresentados e discutidos na seção 2.4.3 (Figuras 14, 15, 16 e 18).

3.4.4 Toxicidade aguda (96 horas)

O zebrafish vem sendo usado como modelo animal complementar ao uso de roedores em testes genéticos, neurobiológicos e toxicológicos (RESENDE; SOCCOL, 2015). Além disso, também é utilizado para avaliar a toxicidade de compostos farmacêuticos, bem como biomonitoramento toxicológico no desenvolvimento de medicamentos (CABALLERO; CANDIRACI, 2018).

Desde muito tempo vem sendo empregado em testes de toxicidade no monitoramento de contaminantes ambientais. Como por exemplo, HUANG *et al.* (2014) utilizaram o zebrafish

para avaliar a ação de um agente agroquímico (Deltametrin), empregando o comportamento locomotor e a mortalidade (CL_{50}) em 24 horas como parâmetros de toxicidade aguda.

Nesse contexto, o zebrafish foi usado como modelo animal para avaliar a toxicidade aguda do CD, CDN, AA, CDN-BrP e CD-dPs. Como resultado, constatou-se que todos os compostos se mostraram seguros, pois não foram tóxicos para o zebrafish até 96 horas de análise ($LC_{50} > 40$ mg/kg) (Tabela 3). Permitindo assim, o uso desses compostos em testes farmacológicos *in vivo*.

Tabela 3 - Resultados dos testes de toxicidade aguda dos compostos frente ao zebrafish.

Composto	Mortalidade				96h
	CN	D1	D2	D3	CL_{50} (mg/mL) / IV
AA	0	1	0	0	> 40
CDN	0	0	1	0	> 40
CD	0	0	0	0	> 40
CDN-BrP	0	0	0	1	> 40
CD-dPS	0	0	1	0	> 40

CN - Grupo controle negativo: DMSO 3%. D1 - Dose 1 (4 mg/kg). D2 - Dose 2 (20 mg/kg). D3 - Dose 3 (40 mg/kg). IV - Intervalo de confiança.

Esses resultados comprovam a eficiência dos compostos avaliados, tornando-se excelentes candidatos para serem usados como larvicidas, uma vez que não são tóxicos e não irão causar danos a outros animais marinhos que possam estar presentes no mesmo ambiente das larvas do *Aedes aegypt*.

3.4.5 Teste de campo aberto

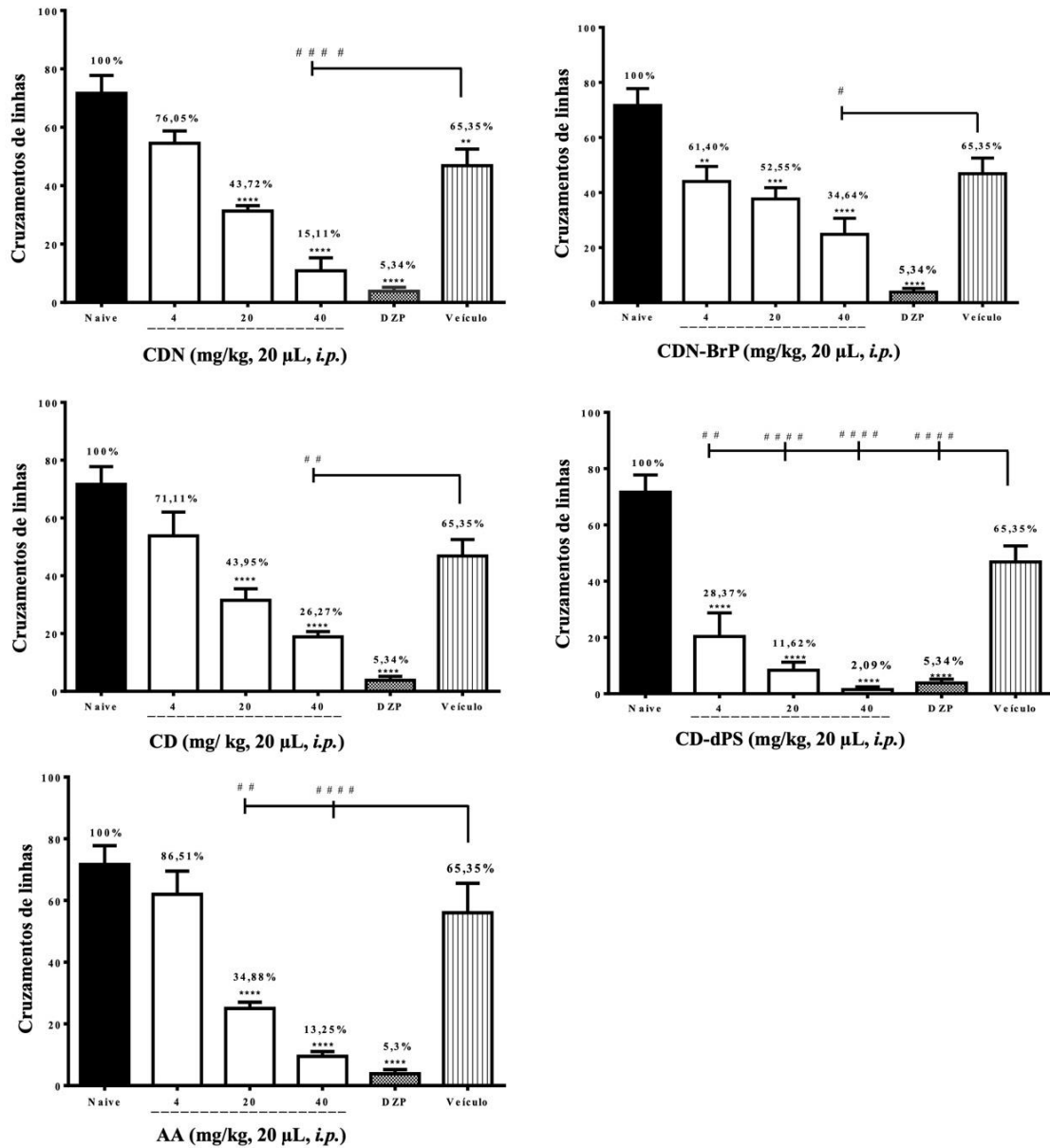
A análise da atividade locomotora através do teste de campo aberto é um parâmetro de análise comportamental que permite avaliar substâncias químicas que atuam no Sistema Nervoso Central (SNC) do zebrafish (GUPTA *et al.*, 2014), podendo causar comprometimento locomotor ou não (GEBAUER *et al.*, 2011; TAYLOR *et al.*, 2017). O comportamento natural do zebrafish em campo aberto é caracterizado por atividade natatória constante e manifestações de imobilidade (CACHAT *et al.*, 2011).

Diferentes parâmetros podem ser avaliados a partir da análise da atividade locomotora realizada em campo aberto, como por exemplo a hiperatividade, usada como indicativo de

ansiedade (RESENDE; SOCCOL, 2015). Segundo diversos autores, os benzodiazepínicos utilizados no tratamento da ansiedade atuam no sistema nervoso central do zebrafish, induzindo um efeito sedativo e causando alterações locomotoras (GEBAUER *et al.*, 2011; BENNEH *et al.*, 2017).

Desta forma, avaliou-se a ação do CD, CDN, AA, CDN-BrP e CD-dPS, sob o sistema locomotor do zebrafish (Figura 38). Onde: Naive - animais não tratados. DZP (40 mg/kg; 20 μ L; *i.p.*). Veículo - DMSO 3% (20 μ L; *i.p.*). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey $p < 0,0001$; $< 0,001$ e $0,1$ vs. naive; ##### $p < 0,0001$; ## $p < 0,01$ e # $0,1$ vs. Veículo. Os números acima de cada coluna indicam a porcentagem da atividade locomotora (%AL).

Figura 38 - Efeito do CDN, CD, AA, CDN-BrP e CD-dPS sob a atividade locomotora do zebrafish no teste de campo aberto.



Fonte: Próprio autor.

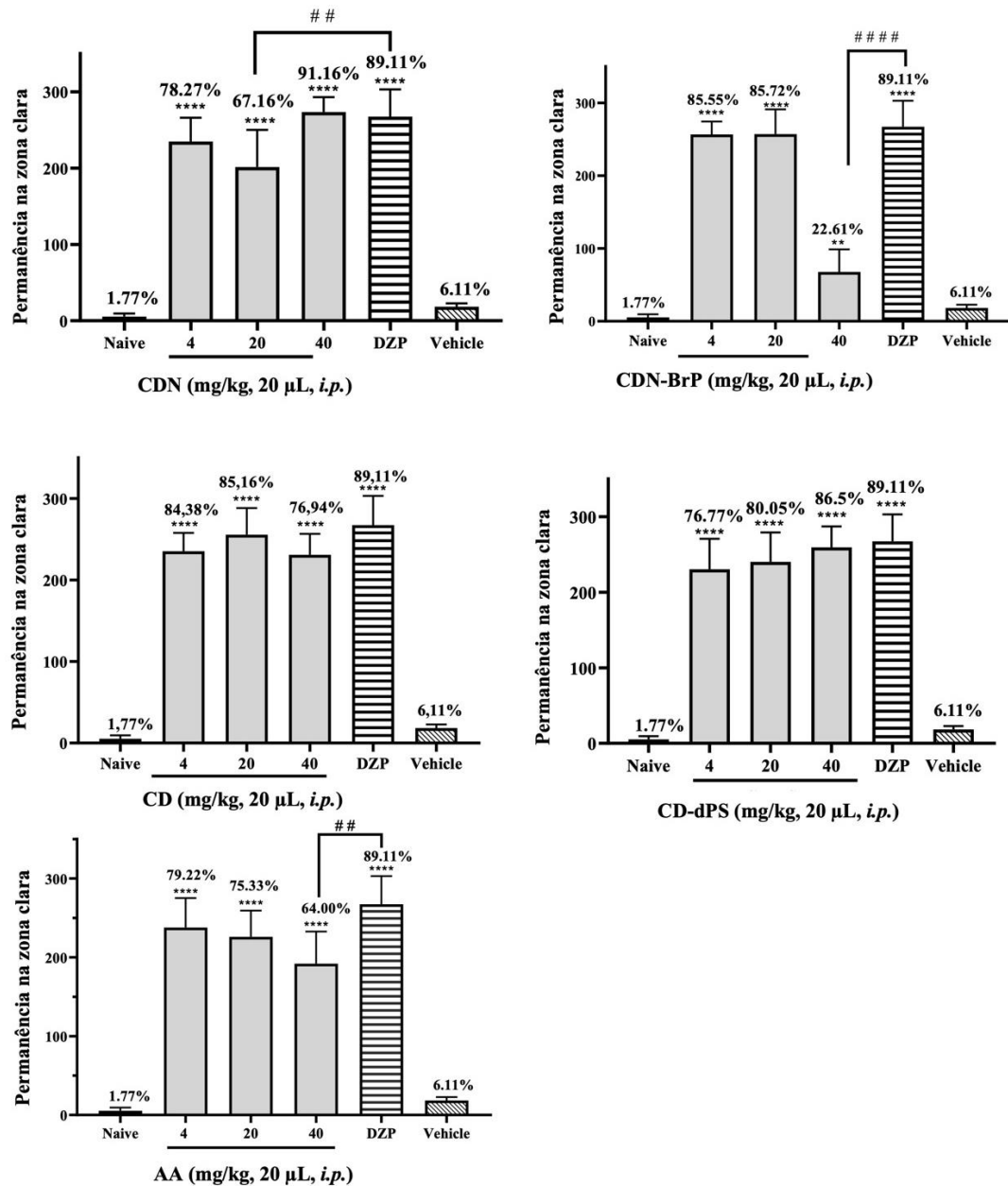
O teste de campo aberto mostrou que todos os compostos, em todas as doses testadas, causaram efeito sedativo e diminuíram a atividade locomotora, comportamento similar ao DZP, resultando em uma redução no número de cruzamentos de linha, resultado significativamente diferente do controle veículo ($p < 0,0001$; $p < 0,01$ e $0,1$ vs. veículo) e do grupo naive ($p < 0,0001$; $< 0,001$ e $0,1$ vs. naive). Esses resultados foram semelhantes aos obtidos com drogas ansiolíticas que causaram efeito sedativo e diminuição da atividade locomotora em animais (GUPTA *et al.*, 2014; BENNEH *et al.*, 2017).

3.4.6 Teste claro/escuro

O teste claro/escuro em zebrafish confirmou o possível efeito ansiolítico do CD, CDN, AA, CDN-BrP e CD-dPS, observado no teste de campo aberto. Nesse teste, o tempo gasto na região clara é aumentado por agentes ansiolíticos, como o diazepam. Em condições normais, o zebrafish tem aversão a áreas iluminadas, comportamento semelhante ao dos camundongos e roedores (GEBAUER *et al.*, 2011; STEWART *et al.*, 2012).

A Figura 39 ilustra o efeito ansiolítico dos compostos em zebrafish no teste claro/escuro. Os números acima de cada coluna indicam a porcentagem de permanência do zebrafish na zona clara do aquário, durante 5 minutos de análise. Naive - grupo sem tratamento. Controle - DMSO 3% (20 μ L *i.p.*). DZP (4 mg/kg; 20 μ L *i.p.*). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de *Tukey*. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs Controle e Naive; ## $p < 0,01$ ##### $p < 0,0001$ vs veículo.

Figura 39 - Efeito ansiolítico do CDN, CD, AA, CDN-BrP e CD-dPS em zebrafish no teste claro/escuro.



Fonte: Próprio autor.

Constatou-se que CD, CDN, AA, CDN-BrP, CD-dPS e DZP tiveram efeitos semelhantes sobre o zebrafish, apresentando comportamento ansiolítico nas três concentrações testadas. Todos os compostos (**** $p < 0,0001$ vs veículo) aumentaram o tempo gasto pelo peixe na zona clara do aquário, comportamento semelhante ao do DZP, com destaque para o CDN, na concentração 40 mg/Kg, que foi mais eficiente que o DZP, com porcentagem de permanência na zona clara (%PZC) de 91,16%, seguido do CD-dPS com %PZC de 86,50%, na mesma concentração.

Segundo JÚNIOR *et al.* (2018), os derivados do LCC também tiveram o mesmo efeito em camundongos. CHO *et al.* (2012) estudaram o efeito ansiolítico da fisostigmina, um inibidor da enzima acetilcolinesterase, no zebrafish. Os autores observaram que os peixes tratados com fisostigmina, apresentaram preferência pela zona clara no teste claro/escuro, comprovando a ação ansiolítica deste inibidor.

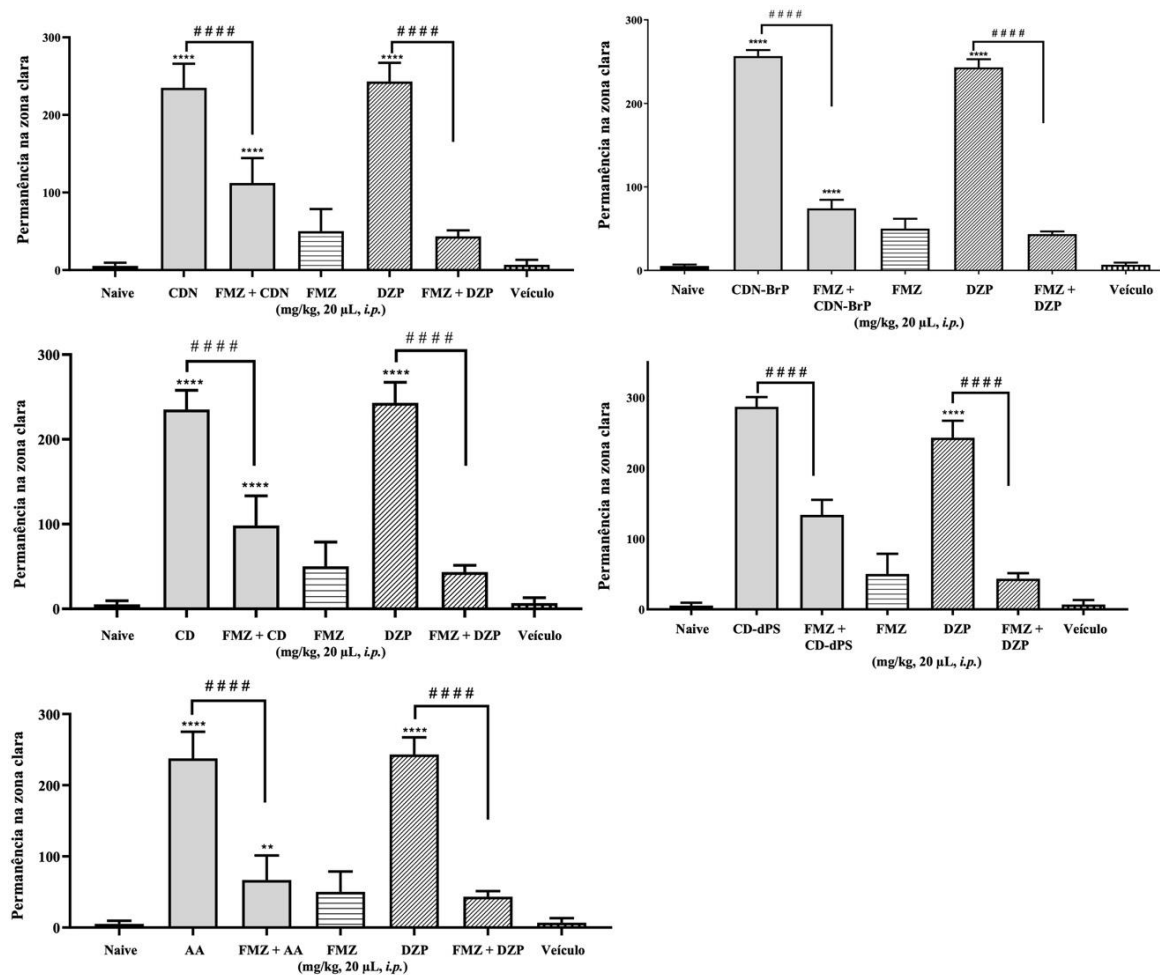
Vale ressaltar que, os constituintes do LCC (CD, CDN e AA) carregam em sua estrutura grupos hidroxila, os quais estão entre os substituintes mais comuns em drogas ansiolíticas, que também incluem grupos metoxi, metil, dimetilamina, halogênios e nitro (HIGGS *et al.*, 2019; ERTL *et al.*, 2020).

3.4.7 Participação do sistema GABAérgico

CD, CDN, AA, CDN-BrP e CD-dPS podem atuar no sistema GABAérgico, assim, para investigar esse possível mecanismo ansiolítico, um novo teste claro/escuro foi realizado com flumazenil (FMZ). Este é um antagonista específico do ácido gama-aminobutírico (GABA) do complexo receptor do tipo A. Ele antagoniza os efeitos de benzodiazepínicos, tais como o diazepam, incluindo os efeitos ansiolíticos, sedativos e hipnóticos. O FMZ liga-se às subunidades α [1–3, 5] β e γ desses receptores e é considerado uma excelente ferramenta para estudos nesta área (BENTUÉ-FERRER *et al.*, 1996; PENNINGA *et al.*, 2016; SEELHAMMER *et al.*, 2018).

A Figura 40 ilustra o efeito do flumazenil (FMZ) sob o efeito ansiolítico do CDN, CD, AA, CDN-BrP e CD-dPS no teste claro/escuro. Onde: DZP (4 mg/kg; 20 μ l; *i.p.*). FMZ (4 mg/kg; 20 μ l; *i.p.*). Os valores representam o erro médio \pm média para 6 animais/grupo. ANOVA seguida por Tukey (** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$ vs veículo; ##### $p < 0,0001$ vs FMZ + DZP ou FMZ + CDN ou FMZ + CD ou FMZ + AA ou FMZ + CDN-BrP ou FMZ + CD-dPS).

Figura 40 - Efeito do flumazenil (FMZ) sob o efeito ansiolítico do CDN, CD, AA, CDN-BrP e CD-dPS no teste claro/escuro.



Fonte: Próprio autor.

Como resultado, o pré-tratamento com FMZ reverteu significativamente ($p < 0,0001$) o efeito ansiolítico de todos os compostos estudados, bem como reverteu significativamente ($#### p < 0,0001$) o efeito ansiolítico do diazepam (4 mg/kg; 20 μ L; *i.p.*), indicando que a atividade ansiolítica dos compostos atua através do sistema GABA. Houve uma redução significativa na permanência na zona clara dos peixes tratados com FMZ e os compostos: ($PZC_{FMZ + CDN} = 37,44\%$; $PZC_{FMZ + CDN-BrP} = 24,77\%$; $PZC_{FMZ + CD-dPS} = 44,61\%$; $PZC_{FMZ + CD} = 32,77\%$; $PZC_{FMZ + AA} = 22,27\%$), significativamente ($p > 0,05$) semelhante aos animais tratados com flumazenil e diazepam ($PZC_{FMZ + DZP} = 14,7\%$).

3.4.8 Docking molecular

Para estudar a atividade ansiolítica do CD, CDN, AA, CDN-BrP e CD-dPS no sistema GABAérgico, foram realizadas simulações de docking molecular com o receptor GABA_A. O docking revela os mecanismos estruturais de inibição dos ligantes e do receptor (proteína), identificando os modos de interação molecular com o sítio ativo da proteína (GABA) (DUONG *et al.*, 2020).

As simulações de docking molecular realizadas na proteína γ -GABA aminotransferase comprovaram a atividade ansiolítica de todos os ligantes estudados. A Tabela 4 apresenta os valores de energia de afinidade, constante de inibição e RMSD para todos os ligantes. De acordo com a tabela, todos os valores estão dentro do parâmetro ideal, RMSD menor que 2 Å e energia de afinidade próximo a 6,0 kcal/mol (YUSUF *et al.*, 2008; SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014).

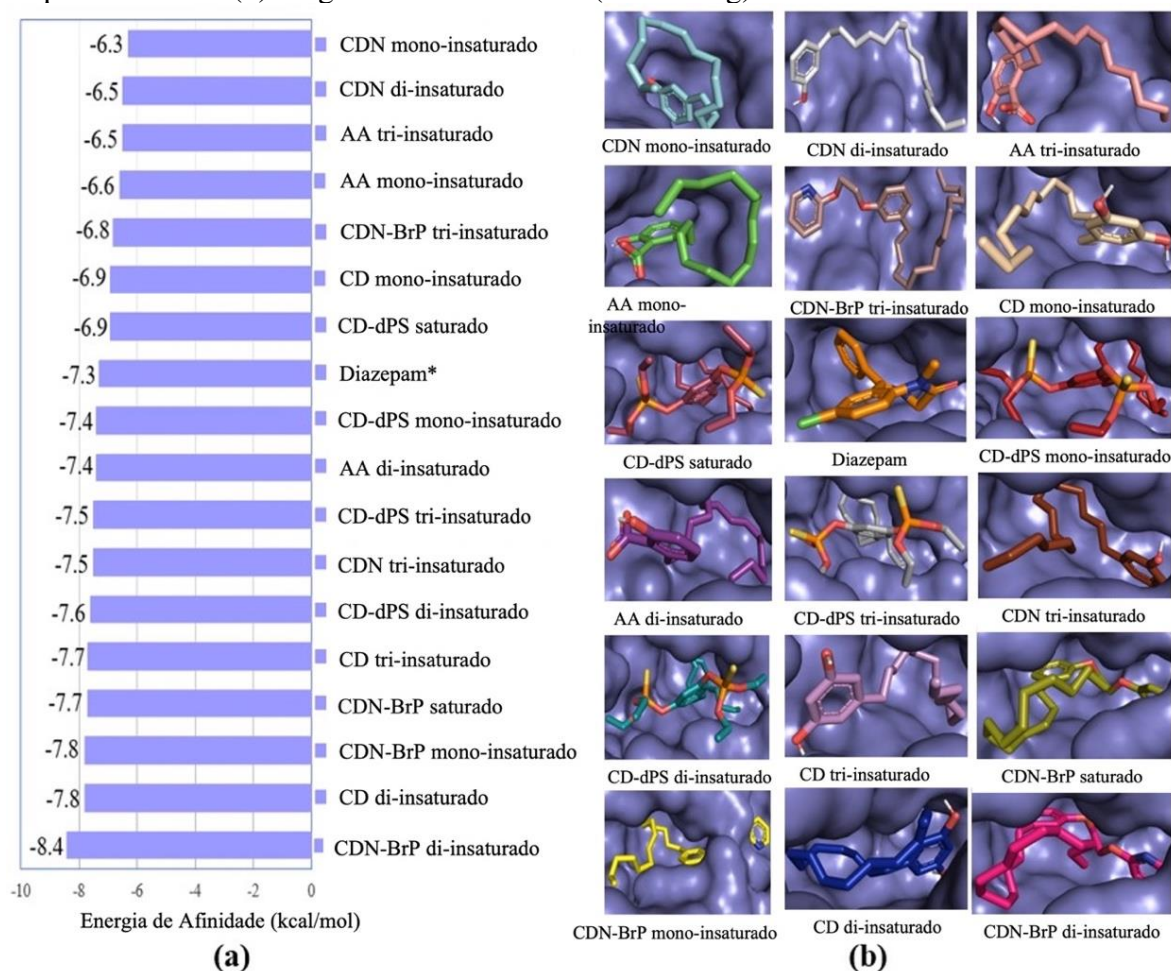
Tabela 4 - Energia de afinidade e valores de RMSD dos complexos formados após simulações de docking frente ao receptor GABAA, organizados por energia de afinidade.

Ligante	GABA			
	Energia de Afinidade (kcal/mol)	K _i	pK _i	RMSD (Å)
CDN-BrP di-insaturado	-8,4	7,01 x 10 ⁻⁷	6,15	0,839
CD di-insaturado	-7,8	1,92 x 10 ⁻⁶	5,72	0,813
CDN-BrP mono-insaturado	-7,8	1,92 x 10 ⁻⁶	5,72	1,233
CDN-BrP saturado	-7,7	2,27 x 10 ⁻⁶	5,64	0,968
CD tri-insaturado	-7,7	2,27 x 10 ⁻⁶	5,64	1,653
CD-dPS di-insaturado	-7,6	2,69 x 10 ⁻⁶	7,57	1,440
CDN tri-insaturado	-7,5	3,18 x 10 ⁻⁶	5,49	1,404
CD-dPS tri-insaturado	-7,5	3,18 x 10 ⁻⁶	5,49	1,766
AA di-insaturado	-7,4	3,77 x 10 ⁻⁶	5,42	1,244
CD-dPS mono-insaturado	-7,4	3,77 x 10 ⁻⁶	5,42	1,689
Diazepam*	-7,3	4,46 x 10 ⁻⁶	5,35	0,719
CD-dPS saturado	-6,9	8,77 x 10 ⁻⁶	5,05	1,630
CD mono-insaturado	-6,9	8,77 x 10 ⁻⁶	5,05	1,942
CDN-BrP tri-insaturado	-6,8	1,04 x 10 ⁻⁵	4,98	1,608
AA mono-insaturado	-6,6	1,45 x 10 ⁻⁵	4,84	1,956
AA tri-insaturado	-6,5	1,72 x 10 ⁻⁵	4,76	1,932
CDN di-insaturado	-6,5	1,72 x 10 ⁻⁵	4,76	1,892
CDN mono-insaturado	-6,3	2,41 x 10 ⁻⁵	4,62	1,758

*ligante co-cristalizado (re-docking).

Com a seleção da melhor pose, seguindo os parâmetros do menor valor para o desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD), que é a medida da distância média entre os átomos dos complexos ligante-proteína sobrepostos, e energia de afinidade, foi possível determinar que o CDN-BrP di-insaturado (-8,4 kcal/mol), CD di-insaturado (-7,8 kcal/mol), CDN-BrP mono-insaturado (-7,8 kcal/mol), CDN-BrP saturado (-7,7 kcal/mol) e CD tri-insaturado (-7,7 kcal/mol) possuem energias mais favoráveis que o diazepam, ambas acopladas em uma região próxima do fármaco de referencia (DZP) (-7,3 kcal/mol). Na simulação de re-docking, o complexo DZP-GABA apresentou RMSD na ordem de 0,719 Å. (Figura 41).

Figura 41 - Resultados do docking molecular: energia de afinidade (a), complexos ligante-receptor formados (b). *ligante co-cristalizado (re-docking).



Fonte: Próprio autor.

Para refinar esta análise (docking molecular) avaliou-se a constante de inibição (K_i) e o pK_i , onde quanto menor o valor de K_i , maior o pK_i , e maior será a afinidade do ligante pela proteína, logo, menor será a concentração do ligante necessária para inibir a atividade enzimática (KADELA-TOMANEK *et al.*, 2021). Desse modo, foi possível observar, a partir da Tabela 4, que o CDN-BrP di-insaturado, CD di-insaturado, CDN-BrP mono-insaturado, CDN-BrP saturado, CD tri-insaturado, CD-dPS di-insaturado, CDN tri-insaturado, CD-dPS tri-insaturado, AA di-insaturado e CD-dPS mono-insaturado necessitam de uma menor concentração para inibir o receptor $GABA_A$, pois apresentaram menor K_i comparado ao diazepam ($K_i = 4,46 \times 10^{-6}$ e $pK_i = 5,35$), com ênfase para o ligante CDN-BrP di-insaturado ($K_i = 7,01 \times 10^{-7}$ e $pK_i = 6,15$).

O tipo de interação entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos do receptor $GABA_A$, bem como as distâncias entre essas interações, são mostrados na Tabela 5 e Figura 42. Sabe-se que quanto menor a distância, mais favoráveis são as interações.

Tabela 5 - Interações dos ligantes com os receptores $GABA_A$.

Ligante	Resíduo	Interação	Distância (Å)
CDN-BrP di-insaturado	TYR58C	Hydrofobic	3,68
	ALA79C	Hydrofobic	4,90
	GLU189C	H-Bond	3,57
	SER205D	H-Bond	2,14
	SER205D	H-Bond	2,45
	THR207D	H-Bond	2,31
	TYR160D	π - π Stacked	5,38
	TYR210D	π - π Stacked	3,97
	CD di-insaturado	TYR58C	Hydrofobic
ALA79C		Hydrofobic	5,41
VAL203D		Hydrofobic	4,95
TYR210D		Hydrofobic	3,75
TYR210D		Hydrofobic	3,88
SER205D		H-Bond	2,88
TYR58C		π - π Stacked	5,28
SER206D		Unfavorable Donor-Donor	1,73
CDN-BrP mono-insaturado		PHE77C	Hydrofobic
	ALA79C	Hydrofobic	5,30
	LEU140C	Hydrofobic	3,67
	TYR210D	Hydrofobic	3,57
	SER206D	H-Bond	2,63

CDN-BrP saturado	PHE77C	π - π Stacked	5,19	
	TYR58C	Hydrofobic	3,53	
	PHE77C	Hydrofobic	3,99	
	ALA79C	Hydrofobic	4,88	
	SER205D	H-Bond	2,18	
	SER205D	H-Bond	2,53	
	THR207D	H-Bond	2,46	
	TYR160D	π - π Stacked	5,40	
	TYR210D	π - π Stacked	4,28	
	CD tri-insaturado	TYR58C	Hydrofobic	5,17
VAL203D		Hydrofobic	4,52	
VAL203D		Hydrofobic	5,37	
ASN60C		Unfavorable Donor-Donor	0,98	
CD-dPS di-insaturado	ALA79C	Hydrofobic	4,05	
	LYS156D	Hydrofobic	4,66	
	VAL203D	Hydrofobic	3,87	
	TYR210D	Hydrofobic	3,52	
	LYS156D	H-Bond	5,36	
	HIS102D	H-Bond	4,18	
	TYR58C	π - π Stacked	4,49	
	ALA79C	Hydrofobic	4,96	
CDN tri-insaturado	SER205D	H-Bond	2,52	
	SER206D	H-Bond	2,65	
	CD-dPS tri-insaturado	TYR58C	Hydrofobic	5,28
		TYR58C	Hydrofobic	5,32
PHE77C		Hydrofobic	4,74	
ALA79C		Hydrofobic	3,72	
HIS102D		Hydrofobic	4,58	
VAL203D		Hydrofobic	4,97	
TYR210D		Hydrofobic	3,52	
TYR58C		H-Bond	1,98	
LYS156D		H-Bond	5,81	
GLN204D		H-Bond	3,79	
AA di-insaturado	TYR58C	π - π Stacked	4,28	
	TYR58C	Hydrofobic	3,94	
	PHE77C	Hydrofobic	3,68	
	VAL203D	Hydrofobic	3,77	
	LYS156D	H-Bond	4,26	
	HIS102D	π -Anion	3,68	
	HIS102D	Attractive Charge	4,26	

	LYS156D	Attractive Charge	4,23
	LYS156D	Unfavorable Donor-Donor	2,30
CD-dPS mono-insaturado	TYR58C	Hydrofobic	4,53
	TYR58C	Hydrofobic	5,45
	LYS156D	Hydrofobic	4,40
	VAL203D	Hydrofobic	3,91
	LYS156D	H-Bond	3,09
	TYR58C	π - π Stacked	4,59
Diazepam*	TYR58C	Hydrofobic	4,62
	PHE77C	Hydrofobic	5,10
	HIS102D	Hydrofobic	4,35
	VAL203D	Hydrofobic	4,88
	VAL203D	Hydrofobic	5,15
	SER205D	H-Bond	2,89
	GLN204D	H-Bond	3,35
	TYR210D	π - π Stacked	4,18
CD-dPS saturado	ALA79C	Hydrofobic	4,12
	LYS156D	Hydrofobic	4,57
	VAL203D	Hydrofobic	3,73
	VAL203D	Hydrofobic	4,99
	TYR58C	H-Bond	3,67
	ASN60C	H-Bond	3,57
	LYS156D	H-Bond	2,55
	TYR58C	π - π Stacked	4,78
CD mono-insaturado	GLU189C	H-Bond	2,11
	GLN204D	H-Bond	2,32
	SER206D	H-Bond	2,46
	TYR58C	π - π Stacked	3,64
CDN-BrP tri-insaturado	ILE239D	Hydrofobic	5,42
	VAL243D	Hydrofobic	4,40
	LEU297E	Hydrofobic	3,66
AA mono-insaturado	VAL65C	Hydrofobic	4,83
	ILE68C	Hydrofobic	5,03
	ALA67C	H-Bond	2,32
	GLN200C	H-Bond	2,81
	GLN200C	H-Bond	3,19
	PHE201C	π - π T-shaped	5,04
	LYS279D	Salt Bridge	4,09
AA tri-insaturado	VAL65C	Hydrofobic	4,91
	ALA67C	Hydrofobic	5,39

	LYS279D	Hydrofobic	4,39
	ALA67C	H-Bond	2,34
	GLN200C	H-Bond	2,38
	GLN200C	H-Bond	2,78
	PHE201C	π - π T-shaped	5,04
	LYS279D	Salt Bridge	4,28
CDN di-insaturado	TRP246D	Hydrofobic	4,64
	TYR304E	Hydrofobic	4,96
	PHE431E	π - π T-shaped	4,77
CDN mono-insaturado	VAL65C	Hydrofobic	4,56
	TYR199C	H-Bond	1,90
	GLN200C	H-Bond	2,78
	PHE201C	π - π T-shaped	4,88
	VAL65C	Unfavorable Donor-Donor	1,38

*ligante co-cristalizado (re-docking).

Com relação as interações envolvidas na formação dos complexos proteína-ligante (Tabela 5) foi possível identificar que o complexo AA-GABA mono-insaturado apresentou duas interações hidrofóbicas com VAL65C (4.83 Å), ILE68C (5.03 Å), três H-bond envolvendo os resíduos ALA67C (2.32 Å), GLN200C (2.81 e 3.19 Å), uma π - π T-shaped com PHE201C (5.04 Å) e uma Salt Bridge com LYS279D (4.09 Å). O complexo AA-GABA di-insaturado apresentou três interações hidrofóbicas com TYR58C (3.94 Å), PHE77C (3.68 Å), VAL203D (3.77 Å), uma H-bond envolvendo o resíduo LYS156D (4.26 Å), uma π -Anion com HIS102D (3.68 Å), duas Attractive Charge com HIS102D (4.26 Å), LYS156D (4.23 Å) e uma Unfavorable Donor-Donor com LYS156D (2.30 Å). O complexo AA-GABA tri-insaturado apresentou três interações hidrofóbicas com VAL65C (4.91 Å), ALA67C (5.39 Å), LYS279D (4.39 Å), três H-Bond com ALA67C (2.34 Å), GLN200C (2.38 e 2.78 Å), uma π - π T-shaped com PHE201C (5.04 Å) e uma Salt Bridge com LYS279D (4.28 Å).

O complexo CDN-GABA mono-insaturado apresentou uma interação hidrofóbica com VAL65C (4.56 Å), duas H-Bond com TYR199C (1.90 Å), GLN200C (2.78 Å), uma π - π T-shaped com PHE201C (4.88 Å) e uma Unfavorable Donor-Donor com VAL65C (1.38 Å). O complexo CDN-GABA di-insaturado apresentou duas interações hidrofóbicas com TRP246D (4.64 Å), TYR304E (4.96 Å) e uma π - π T-shaped com PHE431E (4.77 Å). O complexo CDN-GABA tri-insaturado apresentou uma interação hidrofóbica com ALA79C (4.96 Å) e duas H-Bond com SER205D (2.52 Å), SER206D (2.65 Å).

O complexo CD-GABA mono-insaturado apresentou três H-Bond com GLU189C (2.11 Å), GLN204D (2.32 Å), SER206D (2.46 Å) e uma π - π Stacked com TYR58C (3.64 Å). O complexo CD-GABA di-insaturado (Figura 37C) é formado predominantemente por interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos TYR58C (4.48 Å), ALA79C (5.41 Å), VAL203D (4.95 Å), TYR210D (3.75 e 3.88 Å), uma H-Bond com SER205D (2.88 Å), uma π - π Stacked com TYR58C (5.28 Å) e uma Unfavorable Donor-Donor com SER206D (1.73 Å). O complexo CD-GABA tri-insaturado apresentou três interações hidrofóbicas com TYR58C (5.17 Å), VAL203D (4.52 e 5.37 Å) e uma Unfavorable Donor-Donor com ASN60C (0.98 Å).

O complexo CDN-BrP-GABA saturado apresentou três interações hidrofóbicas com os resíduos TYR58C (3.53 Å), PHE77C (3.99 Å), ALA79C (4.88 Å), três H-Bond com SER205D (2.18 e 2.53 Å), THR207D (2.46 Å) e duas π - π Stacked com TYR160D (5.40 Å), TYR210D (4.28 Å). O complexo CDN-BrP-GABA mono-insaturado (Figura 37B) apresentou quatro interações hidrofóbicas com os resíduos PHE77C (3.92 Å), ALA79C (5.30 Å), LEU140C (3.67 Å), TYR210D (3.57 Å), uma H-Bond com SER206D (2.63 Å) e uma π - π Stacked com PHE77C (5.19 Å). O complexo CDN-BrP-GABA di-insaturado (Figura 37C) é formado predominantemente por H-Bonds envolvendo os resíduos GLU189C (3.57 Å), SER205D (2.14 e 2.45 Å), THR207D (2.31 Å), apresentou também duas interações hidrofóbicas com os resíduos TYR58C (3.68 Å), ALA79C (4.90 Å) e duas π - π Stacked com TYR160D (5.38 Å), TYR210D (3.97 Å). O complexo CDN-BrP-GABA tri-insaturado é formado por três interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos ILE239D (5.42 Å), VAL243D (4.40 Å) e LEU297E (3.66 Å).

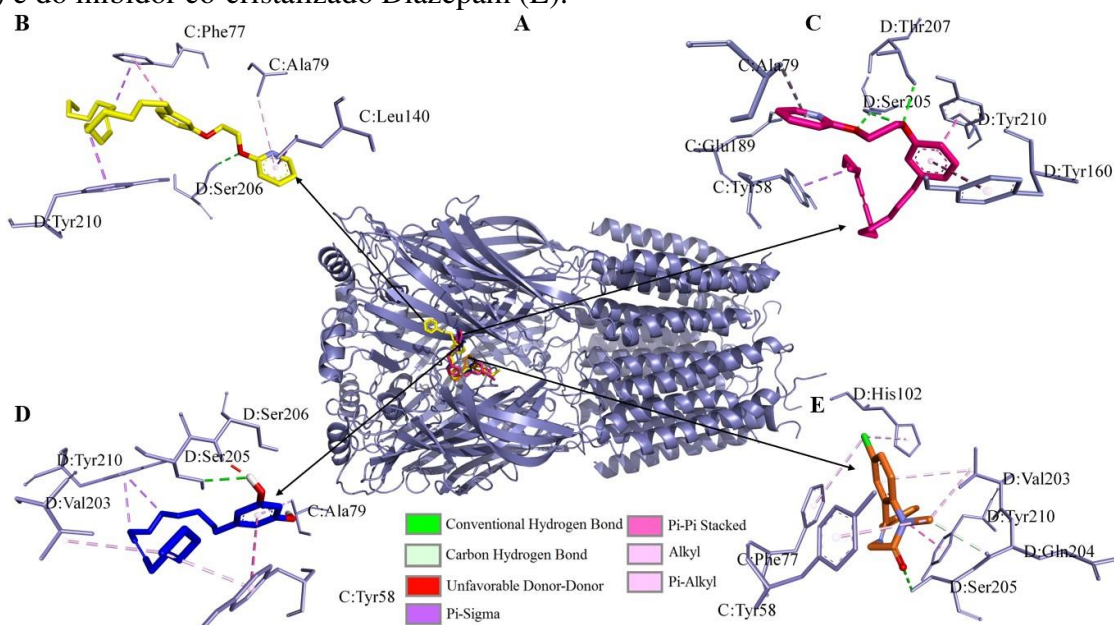
O complexo CD-dPS-GABA saturado apresentou quatro interações hidrofóbicas com os resíduos ALA79C (4.12 Å), LYS156D (4.57 Å), VAL203D (3.73 e 4.99 Å), três H-Bond com TYR58C (3.67 Å), ASN60C (3.57 Å), LYS156D (2.55 Å) e uma π - π Stacked com TYR58C (4.78 Å). O complexo CD-dPS-GABA mono-insaturado apresentou quatro interações hidrofóbicas com os resíduos TYR58C (4.53 e 5.45 Å), LYS156D (4.40 Å), VAL203D (3.91 Å), uma H-Bond LYS156D (3.09 Å) e uma π - π Stacked com TYR58C (4.59 Å). O complexo CD-dPS-GABA di-insaturado apresentou quatro interações hidrofóbicas com os resíduos ALA79C (4.05 Å), LYS156D (4.66 Å), VAL203D (3.87 Å), TYR210D (3.52 Å), duas H-Bond LYS156D (5.36 Å), HIS102D (4.18 Å) e uma π - π Stacked com TYR58C (4.49 Å). O complexo CD-dPS-GABA tri-insaturado é formado predominantemente por interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos TYR58C (5.28 e 5.32 Å), PHE77C (4.74 Å), ALA79C (3.72 Å), HIS102D (4.58 Å), VAL203D (4.97 Å), TYR210D (3.52 Å), o complexo também apresentou

três H-Bond com TYR58C (1.98 Å), LYS156D (5.81 Å), GLN204D (3.79 Å) e uma π - π Stacked com TYR58C (4.28 Å).

O complexo DZP-GABA (co-cristalizado) é formado predominantemente por interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos TYR58C (4.62 Å), PHE77C (5.10 Å), HIS102D (4.35 Å), VAL203D (4.88 e 5.15 Å), o complexo também apresentou duas H-Bond com SER205D (2.89Å), GLN204D (3.35 Å) e uma π - π Stacked com TYR210D (4.18 Å).

A análise da formação do complexo mais estável, com destaque para o CDN-BrP di-insaturado, mostrou que os ligantes se complexam na mesma região do inibidor co-cristalizado (DZP) entre as cadeias C e D do receptor GABA_A (Figura 42A).

Figura 42 - Complexo de interação do receptor GABA_A com os ligantes (A); Mapas de interação do CDN-BrP mono-insaturado (B), CDN-BrP di-insaturado (C), CD di-insaturado (D) e do inibidor co-cristalizado Diazepam (E).



Fonte: Próprio autor.

Portanto, a formação dos complexos supracitados é demonstrada *in silico*, do ponto de vista energético, espacial e químico, e a estabilidade conferida ao receptor GABA_A pela interação com os compostos estudados está diretamente relacionada com a atividade ansiolítica confirmada *in vivo*.

4 CONCLUSÃO

O trabalho relatou a síntese e caracterização de compostos pertencentes à classe dos organofosforados e piridínicos, derivados do LCC, além da microencapsulação, utilizando pectina cítrica, do CDN e CD. Os materiais obtidos foram avaliados quanto a atividade larvicida e quanto ao potencial ansiolítico em zebrafish.

As micropartículas de CDN e CD foram obtidas com elevados rendimentos (acima de 72%) e eficiência de microencapsulação acima de 65%. Os sistemas microencapsulados apresentaram microestruturas parecidas, formatos semiesféricos, sem poros, fissuras e imperfeições.

O larvicida CD-dPS apresentou $CL_{50} = 0,8$ ppm, quatro vezes mais eficiente que o larvicida comercial Temefos ($CL_{50} = 3,2$ ppm). No teste da atividade anticolinesterase, este derivado apresentou diâmetro do halo (1,1 cm) mais próximo do controle Eserina (1,5 cm), e, portanto, o mais eficiente tanto como larvicida, como inibidor da AChE. CD-dPS não apresentou toxicidade em células de macrófagos em nenhuma das concentrações testadas, assim como o CDN-BrP.

As modificações causadas na estrutura externa das larvas do *Aedes aegypti*, após exposição aos larvicidas, foram observadas por meio da análise em microscópio e MEV. Com base nessas análises, concluiu-se que todos os compostos avaliados causaram alterações na morfologia das larvas.

Nos testes com o zebrafish, CDN, CD, AA, CDN-BrP e CD-dPS, não foram tóxicos, alteraram o sistema locomotor do peixe e mostraram efeito ansiolítico mediados pelo sistema GABAérgico. As interações desses compostos com os receptores $GABA_A$ foram confirmadas por meio do estudo de docking molecular. Em relação à estrutura-atividade, o estudo mostrou que o CDN-BrP di-insaturado foi o mais eficaz, pois foi necessária uma menor concentração para inibir o receptor $GABA_A$. Além disso, o complexo CDN-BrP-GABA di-insaturado foi o mais estável, com menor valor de energia de afinidade comparado ao diazepam. A ausência de toxicidade e a ação dos compostos no sistema nervoso central do zebrafish comprovam o potencial farmacológico desses materiais.

Diante do exposto, os resultados obtidos permitem concluir que o uso de larvicidas naturais derivados do LCC em substituição aos larvicidas sintéticos, contribuem para o desenvolvimento sustentável, estimulando a criação de materiais ecológicos e de baixo custo. Além disso, os compostos estudados também podem atuar como drogas ansiolíticas no tratamento do transtorno de ansiedade.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; RICHARDSON, M. K. Exploratory Behaviour in the Open Field Test Adapted for Larval Zebrafish: Impact of Environmental Complexity. **Behavioural Processes**, v. 92, p. 88 - 98, 2013.
- ALMEIDA, M. O. *et al.* Cardol-Derived Organophosphorothioates as Inhibitors of Acetylcholinesterase for Dengue Vector Control. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 30, p. 2634-2641, 2019.
- ALMEIDA, M. O. *et al.* Development of Fully Bio-Based Lubricants from Agro-Industrial Residues under Environmentally Friendly Processes. **European Journal Lipid Science Technology**, v. 1, 2020.
- ALOMAR, A. A.; EASTMOND, B. H.; ALTO, B. W. The effects of exposure to pyriproxyfen and predation on Zika virus infection and transmission in *Aedes aegypti*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, 2020.
- AMALI, M. O. *et al.* Assessment of anxiolytic potential and acute toxicity study of combretum micranthum g. don. leaves (combretaceae) in mice. **IBRO Rep.**, v. 7, 2019.
- ARELLANO-AGUIAR, O. *et al.* Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal of Fisheriesciences.com.**, v. 9, 2015.
- BENAVIDES, S. *et al.* Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry**, v. 204, p. 77 - 83, 2016.
- BENNEH, C. K. *et al.* Maerua angolensis stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish involving GABAergic and 5-HT systems. **J. Ethnopharmacol**, v. 207, p. 129 - 145, 2017.
- BENTUÉ-FERRER, D. *et al.* Flumazenil. **CNS Drug Rev.**, v. 2, p. 390 - 414, 1996.
- BEZERRA, A. J. N. *et al.* Avaliação da segurança não clínica do triterpeno ácido acetil aleurítico (AAA) isolado de Croton zehntneri em zebrafish (*Danio rerio*) adulto. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 55932 - 55940, 2020.
- BEZERRA, T. T. *et al.* In vitro antileishmanial activity of sustainable anacardic acid and cardol based silver nanoparticles on *L. braziliensis*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 619, 2022.
- BHARATE, S. B. *et al.* Thionate versus Oxon: Comparison of Stability, Uptake, and Cell Toxicity of (¹⁴CH₃O)₂-Labeled Methyl Parathion and Methyl Paraoxon with SH-SY5Y Cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 8460 - 8466, 2010.
- BUXERAUD, J.; FAURE, S. Benzodiazepines. **Actual. Pharm.**, v. 591, p. 24-26, 2019.
- CABALLERO, M. V.; CANDIRACCI, M. Zebrafish as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy. **Journal of Unexplored Medical Data**, v. 3, p. 1 - 14, 2018.

- CACHAT, J. *et al.* Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. **PLoS One**, v. 6, 2011.
- CARVALHO, G. H. F. *et al.* Larvicidal and pupicidal activities of eco-friendly phenolic lipid products from *Anacardium occidentale* nutshell against arbovirus vectors. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 26, p. 5514 - 5523, 2019.
- CARVALHO, G. H. F. *et al.* Ovicidal and Deleterious Effects of Cashew (*Anacardium occidentale*) Nut Shell Oil and Its Fractions on *Musca domestica*, *Chrysomya megacephala*, *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*. **Chem. Biodivers**, v. 16, 2019.
- CASTILLO-JUAREZ, I.; RIVERO-CRUZ, F.; CELIS, H.; ROMERO, I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. **J. Ethnopharmacol**, v. 114, p. 72 - 77, 2007.
- CAVALCANTI, T. Y. V. L. *et al.* A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. **Viruses**, v. 14, 2022.
- CHAN, S. Y. *et al.* Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, comercial production and rheology. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 118 - 139, 2017.
- CHANSANG, A. *et al.* Synergy in the adulticidal efficacy of essential oils for the improvement of permethrin toxicity against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Parasites Vectors**, v. 11, p. 417, 2018.
- CHO, H. *et al.* Anxiolytic effects of an acetylcholinesterase inhibitor, physostigmine, in the adult zebrafish. **Animal Cells and Systems**, v. 16, p. 198 - 206, 2012.
- CLEMENTE, C. S. *et al.* Porphyrin synthesized from cashew nut shell liquid as part of a novel superparamagnetic fluorescence nanosystem. **J. Nanopart. Res.**, v. 15, p.1739 - 1749, 2013.
- CONAB (Companhia Nacional de Abasteciemnto). **Histórico Mensal Castanha de Caju**. 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuaria-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-castanha-de-caju>>. Acessado em: 12 de agosto de 2022.
- CORNETT, E. M. *et al.* New benzodiazepines for sedation. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, 2018.
- CSIZMADIA, P. MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web, 2019.
- DALPASQUALE, M. *et al.* Citrus pectin as a template for synthesis of colorful aluminates. **Dyes and Pigments**, v. 125, p. 124 - 131, 2016.
- DANIEL, J. F. S. *et al.* Larvicidal Activity of Beauveria bassiana Extracts against *Aedes aegypti* and Identification of Beauvericins. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 28, p. 1003 - 1013, 2017.

- DE, S. *et al.* Seeking heterocyclic scaffolds as antivirals against dengue virus. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 240, 2022.
- DEVI, U.; BORA, D. Growth inhibitory effect of phenolic extracts of *Ziziphus jujuba* Mill. in dengue vector *Aedes aegypti* (L) in parent and F1 generation. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 10, p. 787 - 791, 2017.
- DOS SANTOS, V. R. F. *et al.* Relationship between galactomannan structure and physicochemical properties of films produced thereof. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 8292 - 8299, 2015.
- DUONG, T-H. *et al.* Synthesis, α -glucosidase inhibition, and molecular docking studies of novel N-substituted hydrazide derivatives of atranorin as antidiabetic agents. **Bioorganic Med. Chem. Lett.**, v. 30, 2020.
- ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88 - 95, 1961.
- ENGELS, D.; ELPHICK-POOLEY, D. The potential of conditional cash transfers for the control of neglected tropical diseases. **Comment**, v.10, 2022.
- ERTL, P.; ALTMANN, E.; MCKENNA, J. M. The most common functional groups in bioactive molecules and how their popularity has evolved over time. **Journal of Med. Chem.**, v. 63, p. 8408 - 8418, 2020.
- FACCIOL, A.; TRAN, S.; GERLAI, R. Re-examining the factors affecting choice in the light – dark preference test in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 327, p. 21 - 28, 2017.
- FARIAS, S. S. *et al.* Microencapsulation of riboflavin with galactomannan biopolymer and F127: Physico-chemical characterization, antifungal activity and controlled release. **Industrial Crops and Products**, v. 118, p. 271 - 281, 2018.
- FERREIRA, M. K. A. *et al.* Anxiolytic-like effect of chalcone N- $\{(4\text{'-}[(E)\text{-}3\text{-}(4\text{-fluorophenyl})\text{-}1\text{-}(\text{phenyl})\text{prop-}2\text{-en-}1\text{-one}]\})\}$ acetamide on adult zebrafish (*Danio rerio*): involvement of the GABAergic system. **Behav. Brain Res.**, v. 374, p. 3 - 8, 2019.
- FERREIRA, M. K. A. *et al.* Anxiolytic-like effect of chalcone N- $\{4\text{'-}[(2E)\text{-}3\text{-}(3\text{-nitrophenyl})\text{-}1\text{-}(\text{phenyl})\text{prop-}2\text{-en-}1\text{-one}]\})\}$ acetamide on adult zebrafish (*Danio rerio*): involvement of the 5-HT system. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 526, p. 505 - 511, 2020.
- FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). **Vírus Zika: perguntas e respostas**. 2019. Disponível em: < <https://portal.fiocruz.br/pergunta/como-e-o-ciclo-de-vida-do-mosquito-aedes-aegypti>>. Acessado em: 14 de agosto de 2022.
- GAWEL, K. *et al.* Seizing the moment: zebrafish epilepsy models. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 116, p. 1 - 20, 2020a.
- GEBAUER, D. L. *et al.* Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, 2011.

- GRASSINO, A. N. *et al.* Ultrasound assisted extraction and characterization of pectin from tomato waste. **Food Chemistry**, v. 198, p. 93 - 100, 2016.
- 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, 2014.
- GUZMAN, M. G. *et al.* Dengue infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, 2016.
- HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, p. 490-519, 1996.
- HANWELL, M. D. *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **J. Cheminf.**, p. 4, p. 1 - 17, 2012.
- HIGGS, J. *et al.* Chalcone derivatives: synthesis, in vitro and in vivo evaluation of their anti-anxiety, anti-depression and analgesic effects. **Heliyon**, v. 5, 2019.
- HORN, G. *et al.* Interactions between acetylcholinesterase, toxic organophosphorus compounds and a short series of structurally related non-oxime reactivators: Analysis of reactivation and inhibition kinetics in vitro. **Toxicol. Lett.**, v. 299, p. 218 - 225, 2018.
- HOSSEINI, S. S.; KHODAIYAN, F.; YARMAND, M. S. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from sour orange peel and its physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 140, p. 59 - 65, 2016.
- HOWE, D. *et al.* The Zebrafish Model Organism Database: new support for human disease models, mutation details, gene expression phenotypes and searching. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. 758 - 768, 2017.
- HSIEH, C.-C.; HERNANDEZ-LEDESMA, B.; LUMEN, B.O. Cell proliferation inhibitory and apoptosis-inducing properties of anacardic acid and lunasin in human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Food Chem.**, v. 125, p. 630 - 636, 2011.
- HU, W.; TU, Z. J. Functional analysis of the promoter of an early zygotic gene KLC2 in *Aedes aegypti*. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 41 - 48, 2018.
- HUANG, Y. *et al.* The use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, p. 3650 - 3660, 2014.
- HUSTEDT, J. C. *et al.* Use of pyriproxyfen in control of *Aedes* mosquitoes: A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, 2020.
- JHA, M. *et al.* Recent advancement in the discovery and development of anti-epileptic biomolecules: an insight into structure activity relationship and Docking. **Eur. J. Pharmaceut. Sci.**, v. 153, 2010.
- JOHARGY, A. K. Zika Virus Infection: A Global Health Emergency. **Egyptian Journal of Medical Microbiology**, v. 31, p. 121 - 124, 2022.

- JOSINO, M. A. A. *et al.* Development and *in vitro* evaluation of microparticles of fluoxetine in galactomannan against biofilms of *S. aureus* methicilin resistant. **Carbohydrate Polymers**, v. 252, 2021.
- JÚNIOR, A. L. G. *et al.* Anxiolytic Effect of Anacardic Acids from Cashew (*Anacardium occidentale*) Nutshell in Mice. **Research Communication**, v. 70, p. 420 - 431, 2018.
- KADELA-TOMANEK, M. *et al.* Lipophilicity, Pharmacokinetic Properties, and Molecular Docking Study on SARS-CoV-2 Target for Betulin Triazole Derivatives with Attached 1,4-Quinone. **Pharmaceutics**, v. 13, p. 1 - 21, 2021.
- KANIS, L. B. *et al.* *Piper ovatum* (Piperaceae) extract/starch-cellulose films to control *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Ind. Crops Prod.**, v. 122, p. 148 - 155, 2018.
- KANYABOON, P. *et al.* Cardol triene inhibits dengue infectivity by targeting kl loops and preventing envelope fusion. **Sci. Rep.**, v. 8, p. 1 - 14, 2018.
- KATOCH, S.; PATIAL, V. Zebrafish: An emerging model system to study liver diseases and related drug discovery. **Journal of Applied Toxicology**, v. 41, p. 33 - 51, 2021.
- KIM, M. J. *et al.* Effects of amidation and/or methylesterification of pectin on aroma release at different calcium concentration. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 343 - 349, 2016.
- KOUAME, K. J. E-P. *et al.* Novel trends and opportunities for microencapsulation of flaxseed oil in foods: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 87, 2021.
- KREWSKI, D. *et al.* Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev.**, v. 13, p. 51 - 138, 2010.
- KRZYZANIAK, L. M. *et al.* Larvicidal Activity against *Aedes aegypti* and Chemical Characterization of the Inflorescences of *Tagetes patula*. **Evidence-Based Complementary Altern. Med.**, 2017.
- KYOMUGASHO, C. *et al.* FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit- and vegetable-based matrices. **Food Chemistry**, v. 176, p. 82 - 90, 2015.
- LEE, H. *et al.* Encapsulation and enhanced retention of fragrance in polymer microcapsules. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, p. 4007 - 4013, 2016.
- LI, H-M. *et al.* Potential Capacity of China's development assistance for health on neglected tropical diseases. **Acta Tropica**, v. 226, 2022.
- LIU, Y. *et al.* Citrus pectin research advances: Derived as a biomaterial in the construction and applications of micro/nano-delivery systems. **Food Hydrocolloids**, v. 133, 2022.
- LIU, A. *et al.* Comparison of characterization and antioxidant activity of different citrus peel pectins. **Food Chemistry**, v. 386, 2022.

LOMONACO, D. *et al.* Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. **Green Chem.**, v. 11, p. 31 - 33, 2009.

LOMONACO, D.; CANGANE, F. Y.; MAZZETTO, S. E. Thiophosphate esters of cashew nutshell liquid derivatives as new antioxidants for poly(methyl methacrylate). **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 104, p. 1177 - 1183, 2011.

LOMONACO, D. *et al.* Thermal studies of new biodiesel antioxidants synthesized from a natural occurring phenolic lipid. **Fuel**, v. 97, p. 552 - 559, 2012.

LOMONACO, D.; MAIA, F. J. N.; MAZZETTO, S. E. Thermal evaluation of cashew nutshell liquid as new bioadditives for poly(methyl methacrylate). **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 111, p. 619 - 626, 2013.

LOMONACO, D.; MELE, G.; MAZZETTO, S. E. Cashew Nutshell Liquid (CNSL): From an Agro-industrial Waste to a Sustainable Alternative to Petrochemical Resources. **In: Cashew Nutshell Liquid**. [s.l: s.n.]. p. 19 - 38, 2017.

LOPEZ, O.; FERNANDEZ-BOLANOS, J. G. Green Trends in Insect Control. eds.; **RSC: Cambridge**, 2011.

MAIA, F. J. N. *et al.* Electrochemical and computational studies of phenolic antioxidants from cashew nut shell liquid. **Electrochimica Acta**, v. 79, p. 67-73, 2012.

MAES, C.; BOUQUILLON, S.; FAUCONNIER, M-L. Encapsulation of Essential Oils for the Development of Biosourced Pesticides with Controlled Release: A Review. **Molecules**, v. 24, 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.

MAGALHÃES, F. E. A. *et al.* Orofacial antinociceptive effect of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. **Biomed. Pharmacother**, v. 97, p. 1575 - 1585, 2018.

MAXIMINO, C. *et al.* Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. **Behavioural Brain Research**, v. 210, n. 1, p. 1 - 7, 2010.

MAZZETTO, S. E. *et al.* Óleo Da Castanha De Caju: Oportunidades E Desafios No Contexto Do Desenvolvimento E Sustentabilidade Industrial. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 732-741, 2009.

MELO, M. *et al.* Polymeric Microparticles of Calcium Pectinate Containing Urea for Slow Release in Ruminant Diet. **Polymers**, v. 13, 2021.

MENDES, F. R. S. *et al.* GABA_A receptor participation in anxiolytic and anticonvulsant effects of (*E*)-3-(furan-2-yl)-1-(2hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one in adult zebrafish. **Neurochemistry International**, v. 155, 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico**, v. 53, n. 24, 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Orientações técnicas para a utilização do larvicida pyriproxyfen (0,5 G) no controle do *Aedes aegypti***, 2019.

MOLINA, V. *et al.* Multicriteria optimal design of emamectin benzoate microparticles obtained by spray drying and ionic gelation. **Aquaculture**, v. 561, 2022.

MOTA, J. P. F. *et al.* Developing eco-friendly methods for purification of compounds derived from hydrogenated cardanol. **Sep. Sci. Technol.**, v. 51, p. 2473 - 2483, 2016.

NOH, J. *et al.* Microencapsulation by pectin for multi-components carriers bearing both hydrophobic and hydrophilic active agents. **Carbohydrate Polymers**, v. 15, p. 172 - 179, 2018.

NOWICKI, M. *et al.* Serotonin antagonists induce anxiolytic and anxiogenic-like behavior in zebrafish in a receptor-subtype dependent manner. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 126, p. 170 - 180, 2014.

OFORI-KWAKYE, K. *et al.* Development and evaluation of natural gum-based extended release matrix tablets of two model drugs of different water solubilities by direct compression. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, p. 82 - 91, 2016.

OLIVEIRA, M. S. C. *et al.* Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nutshell liquid constituents. **Acta Trop.**, v. 117, p. 165 - 170, 2011.

OLIVEIRA, O. V. *et al.* Theoretical investigations of human acetylcholinesterase inhibition efficiency by neurotoxic organophosphorus compounds. **Chem. Phys. Lett.**, v. 706, p. 82 - 86, 2018.

PAIVA, D. R. *et al.* A potent larvicidal agent against *Aedes aegypti* mosquito from cardanol. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 89, p. 373 - 382, 2017.

PARK, J.; KIM, J.; JANG, Y-S. Current status and perspectives on vaccine development against dengue virus infection. **Journal of Microbiology**, v. 60, p. 247 - 254, 2022.

PENNINGA, E. I. *et al.* Adverse Events Associated with Flumazenil Treatment for the Management of Suspected Benzodiazepine Intoxication - A Systematic Review with Meta-Analyses of Randomised Trials. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, v. 118, p. 37 - 44, 2016.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comput. Chem.**, v. 25, p. 1605 - 1612, 2004.

PINHEIRO, N. A. P. *et al.* Citrus Fruit Pectins: Isolation, Amidation, Characterization and Adsorbing Capacity of lead ions. **Research, Society and Development**, v. 11, 2022.

RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações. **São Paulo: Blucher**, 622 p, 2015.

RHEE, I. K. *et al.* Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**, v. 915, p. 217 - 223, 2001.

RIBEIRO, V. G. P. *et al.* Magnetic nanoparticles coated with anacardic acid derived from cashew nutshell liquid. **Journal of Materials Science**, v. 48, p. 7875 - 7882, 2013.

RIBEIRO, A. C. B. *et al.* Cashew apple pectin as a carrier matrix for mangiferin: Physicochemical characterization, in vitro release and biological evaluation in human neutrophils. **International of Biological Macromolecules**, v. 171, p. 275 - 287, 2021.

RO, J. *et al.* Pectin micro- and nano- capsules of retinyl palmitate as cosmeceutical carriers for stabilized skin transport. **Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 19, p. 59 - 64, 2015.

ROCHA, D. K. *et al.* Larvicidal Activity Against *Aedes aegypti* of *Foeniculum vulgare* Essential Oils from Portugal and Cape Verde. **Nat. Prod. Commun.**, v. 10, p. 677 - 682, 2015.

SANTOS, S. R. L. *et al.* Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. **Chemosphere**, v. 84, p. 150 - 153, 2011.

SANTOMAURO, D. F. *et al.* Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. **The Lancet**, v. 398, p. 1700 - 1712, 2021.

SEELHAMMER, T. G. *et al.* The use of flumazenil for benzodiazepine associated respiratory depression in postanesthesia recovery: risks and outcomes. **Braz. J. Anesthesiol.**, v. 68, p. 329 - 335, 2018.

SESA (Secretaria Estadual da Saúde do Ceará). **Boletim Epidemiológico / Arboviroses Urbanas**, n. 7, 2022.

SESLIJA, S. *et al.* Physico-chemical evaluation of hydrophobically modified pectin derivatives: Step toward application. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 113, p. 924 - 932, 2018.

SHITYAKOV, S.; FÖRSTER, C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. **Adv. Appl. Bioinforma. Chem.**, v. 7, p. 23 - 36, 2014.

SILVA, F. C. O. *et al.* Antinociceptive activity of 3b-6b-16b-trihydroxylup-20 (29)-ene triterpene isolated from *Combretum leprosum* leaves in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 533, p. 362 -367, 2020.

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. **Research Square**, 2021.

SIMONETTI, R. B. *et al.* Zebrafish (*Danio rerio*): The future of animal model in biomedical research. **Journal of Fisheries Sciences.com**, v. 9, n. 3, p. 39 - 45, 2015.

SIS (Síntese de indicadores Sociais). **Uma análise das condições de vida da população brasileira**, 2021.

SOMACAL, S. *et al.* Strategy to increase the lipid stability of the microbial oil produced by *Umbelopsis isabellina* for food purposes: Use of microencapsulation by external ionic gelation. **Food Research International**, v.152, 2022.

SRIPA, B. *et al.* Status and perspective of asian neglected tropical diseases. **Acta Tropica**, v. 225, 2022.

STEWART, A. *et al.* Neuropharmacology Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 135 - 43, 2012.

STREISINGER, G. *et al.* Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**, v. 291, n. 5813, p. 293 - 296, 1981.

TAYLOR, J. C. *et al.* A novel zebrafish-based model of nociception. **Physiology & Behavior**, v. 17, p.83 - 88, 2017.

TIRABOSCHI, E. *et al.* New insights into the early mechanisms of epileptogenesis in a zebrafish model of Dravet syndrome. **Epilepsia**, v. 61, p. 549 - 560, 2020.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J. Comput. Chem.**, v. 31, p. 455 - 461, 2009.

VERHEYEN, J.; STOKS, R. Current and future daily temperature fluctuations make a pesticide more toxic: Contrasting effects on life history and physiology. **Environ. Pollut.**, v. 248, p. 209 - 218, 2019.

VIDAL, M. F. Cajucultura nordestina continua em declínio. **Caderno Setorial ETENE**, v. 2, n. 22, p. 1 - 11, 2017.

YAN, J. *et al.* α -Glucosidase inhibition by luteolin: kinetics, interaction, and molecular docking. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 64, p. 213 - 223, 2014.

YUSUF, D. *et al.* An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 48, p. 1411 - 1422, 2008.

WHO (World Health Organization). **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acessado em: 13 de agosto de 2022.

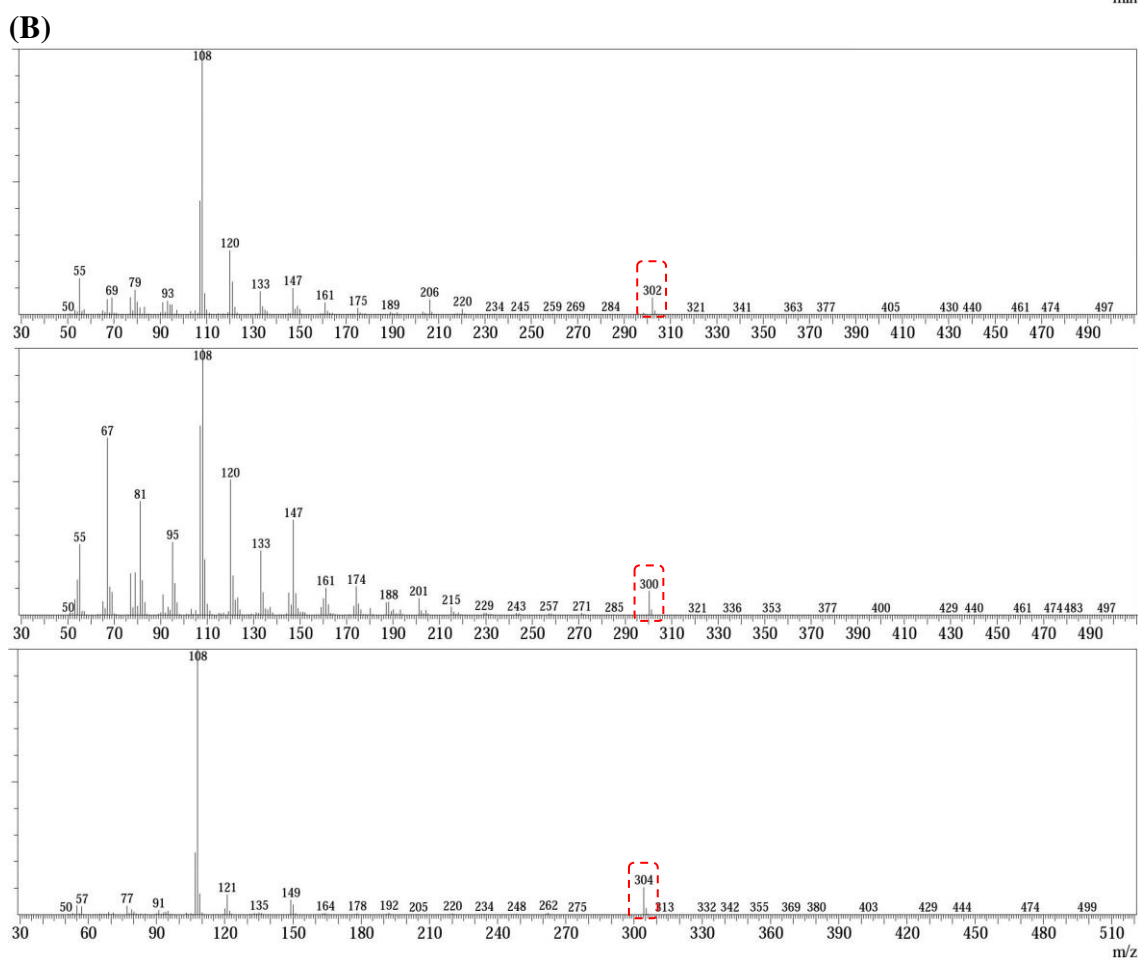
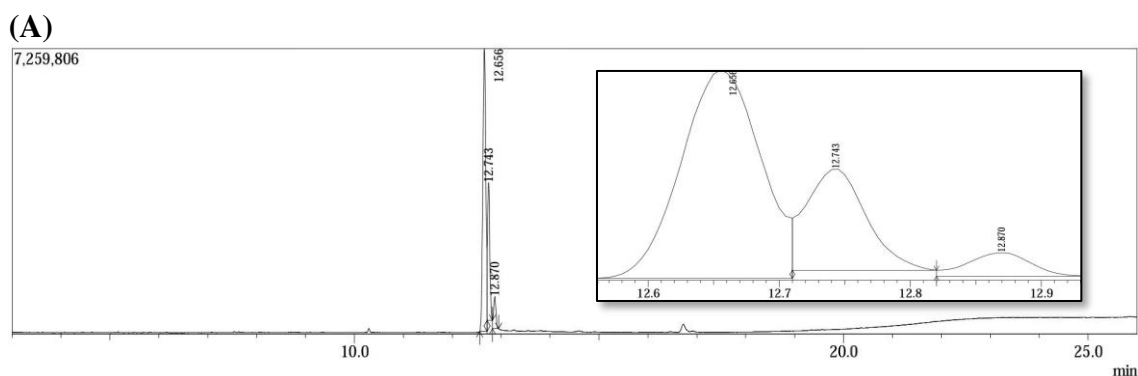
WHO (World Health Organization). Neglected tropical diseases. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1>. Acessado em: 13 de agosto de 2022.

ZARA, A. L. S. A. *et al.* Estratégias de controle do *Aedes*: uma revisão. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 25, p. 391 - 404, 2016.

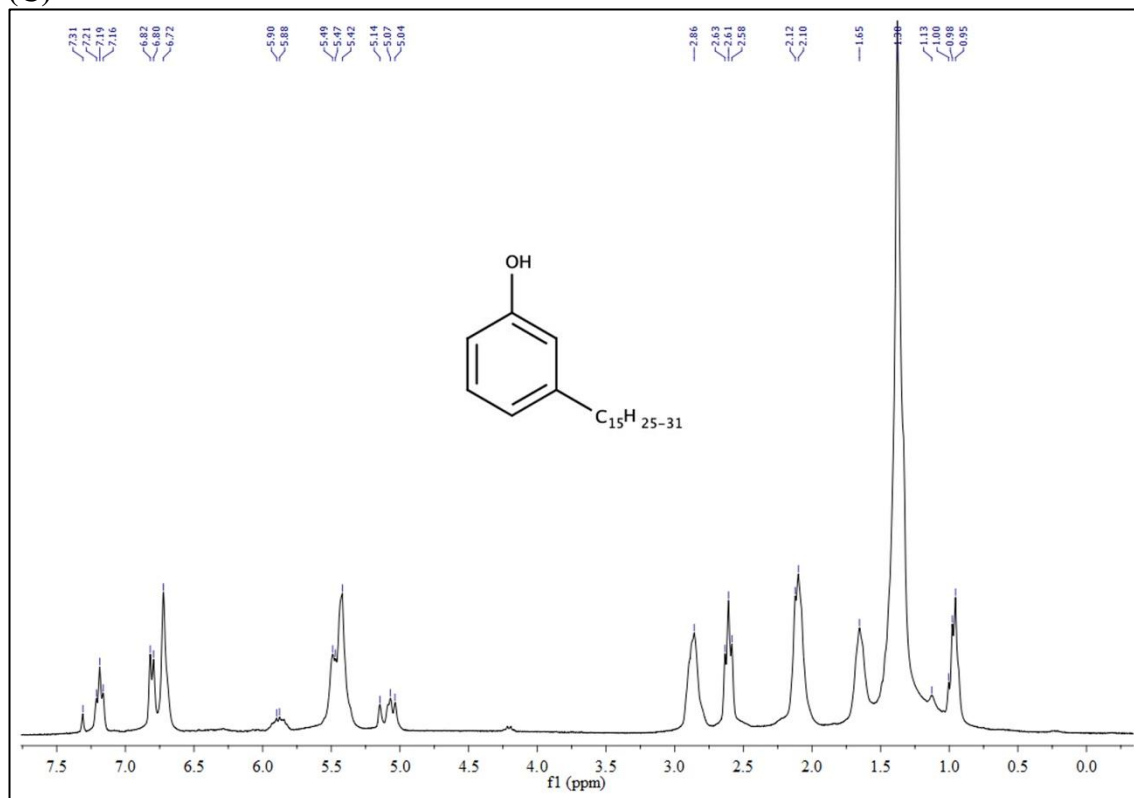
ZHANG, Y. *et al.* Encapsulation of honokiol into self-assembled pectin nanoparticles for drug delivery to HepG2 cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 31 - 38, 2015.

ZHOU, M. *et al.* Low density lipoprotein/pectin complex nanogels as potential oral delivery vehicles for curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 20 - 29, 2016.

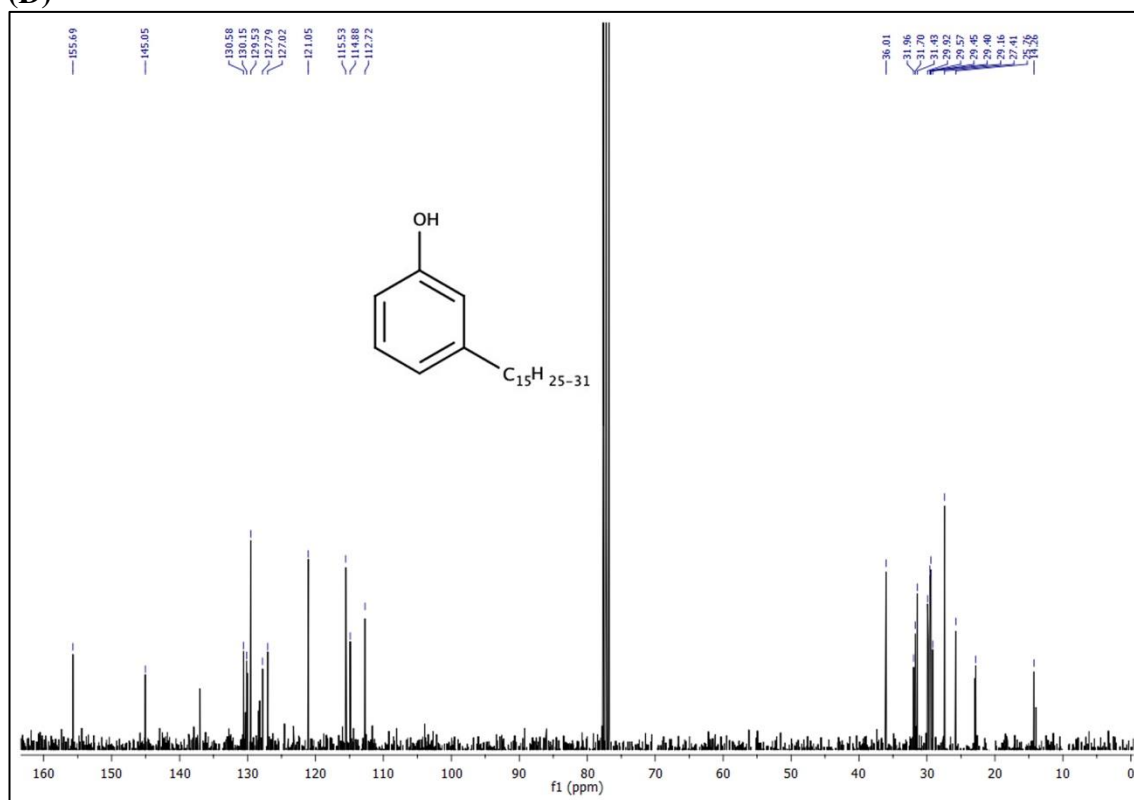
APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO DO CDN: (A) CROMATOGRAMA, (B)
ESPECTROS DE MASSA, (C) RMN ^1H , (D) RMN ^{13}C E (E) FT-IR.



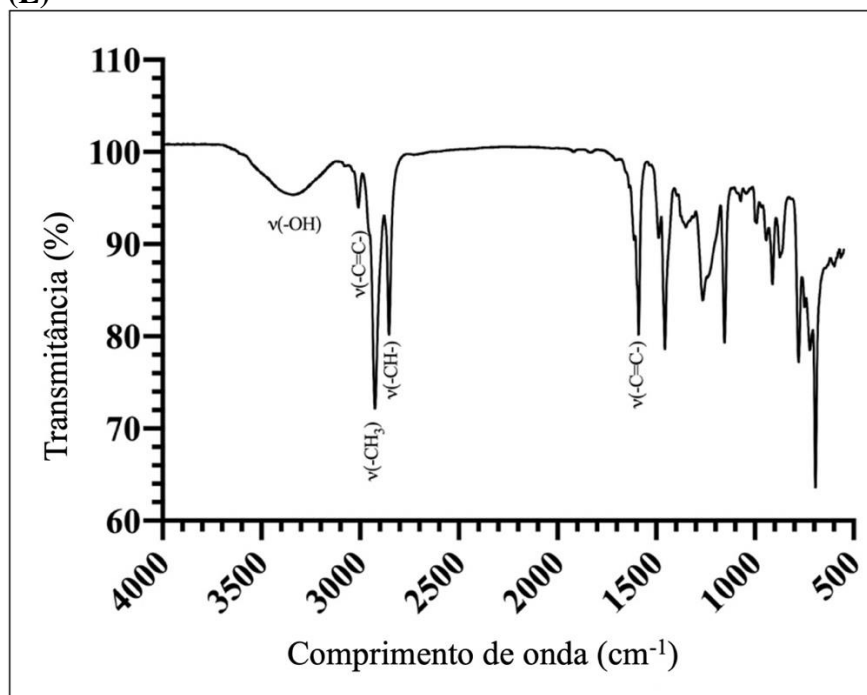
(C)



(D)

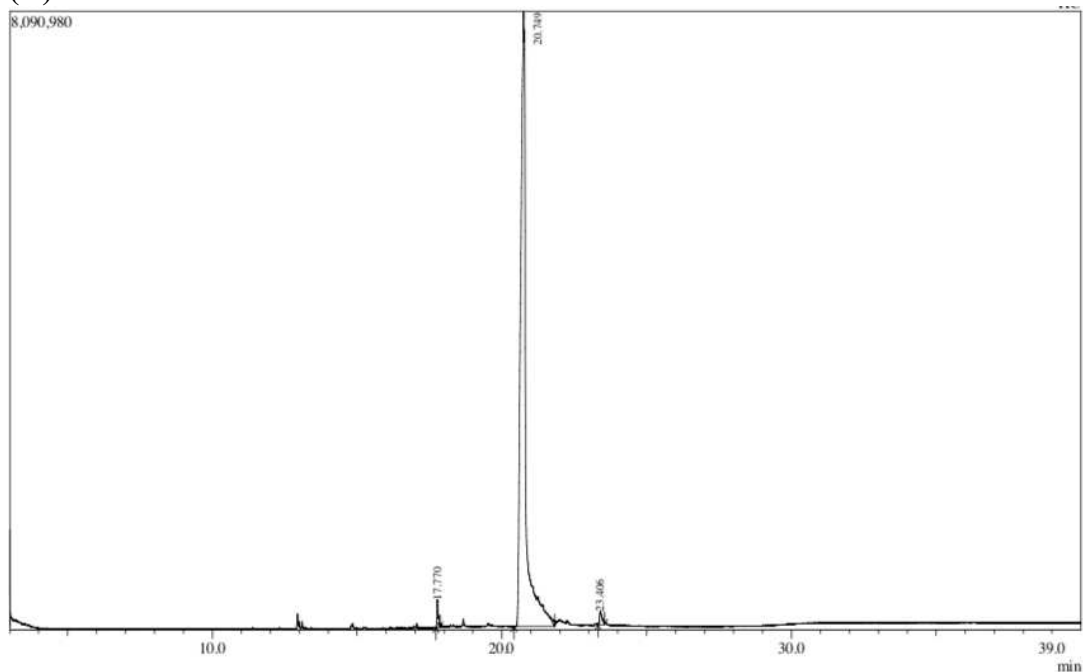


(E)

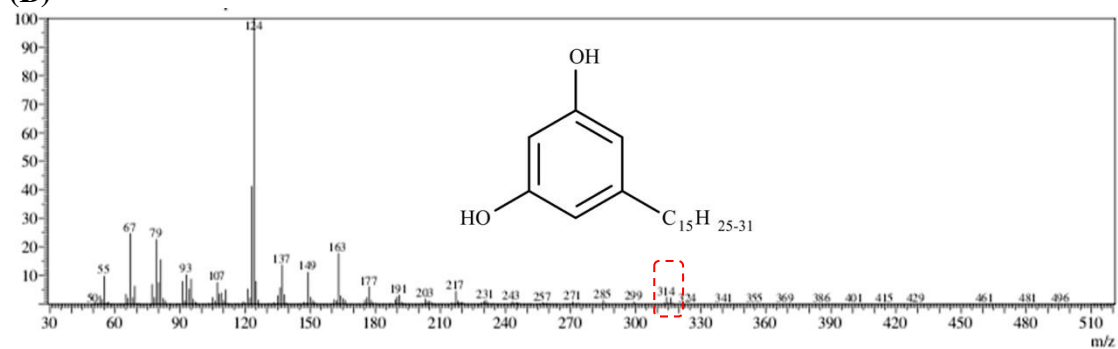


APÊNDICE B – CARACTERIZAÇÃO DO CD: (A) CROMATOGRAMA, (B) ESPECTRO DE MASSA, (C) RMN ^1H , (D) RMN ^{13}C E (E) FT-IR.

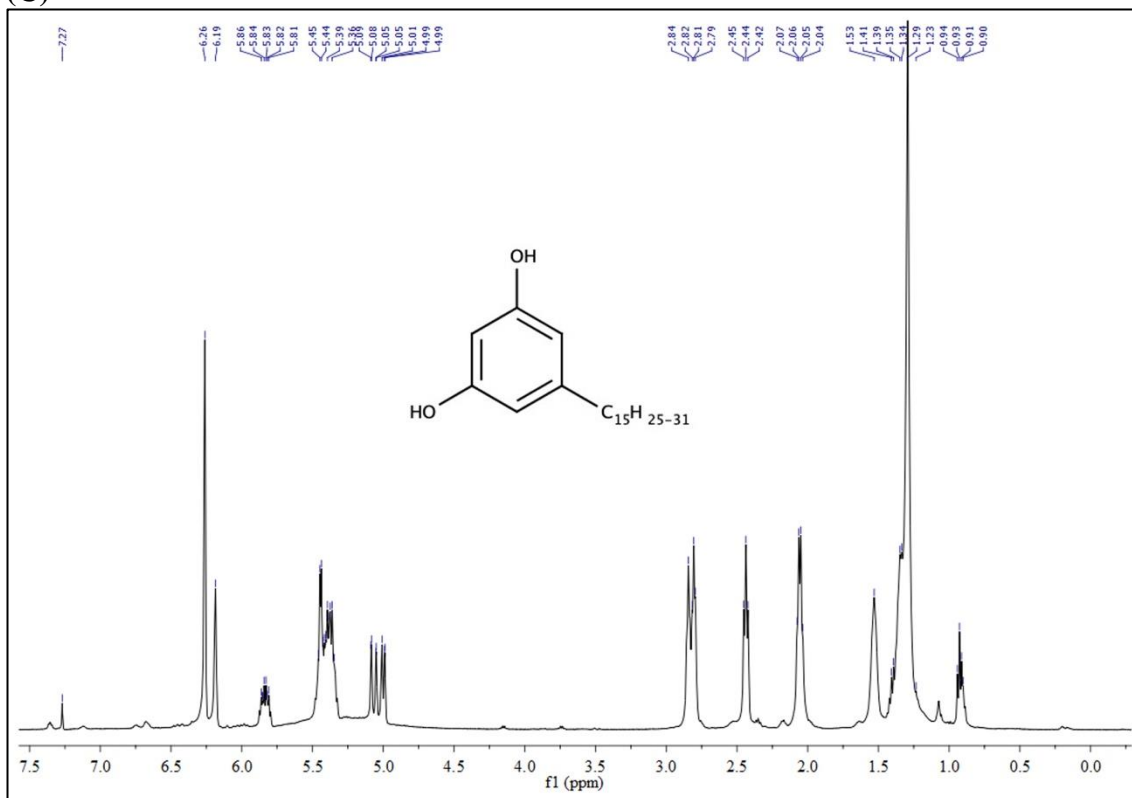
(A)



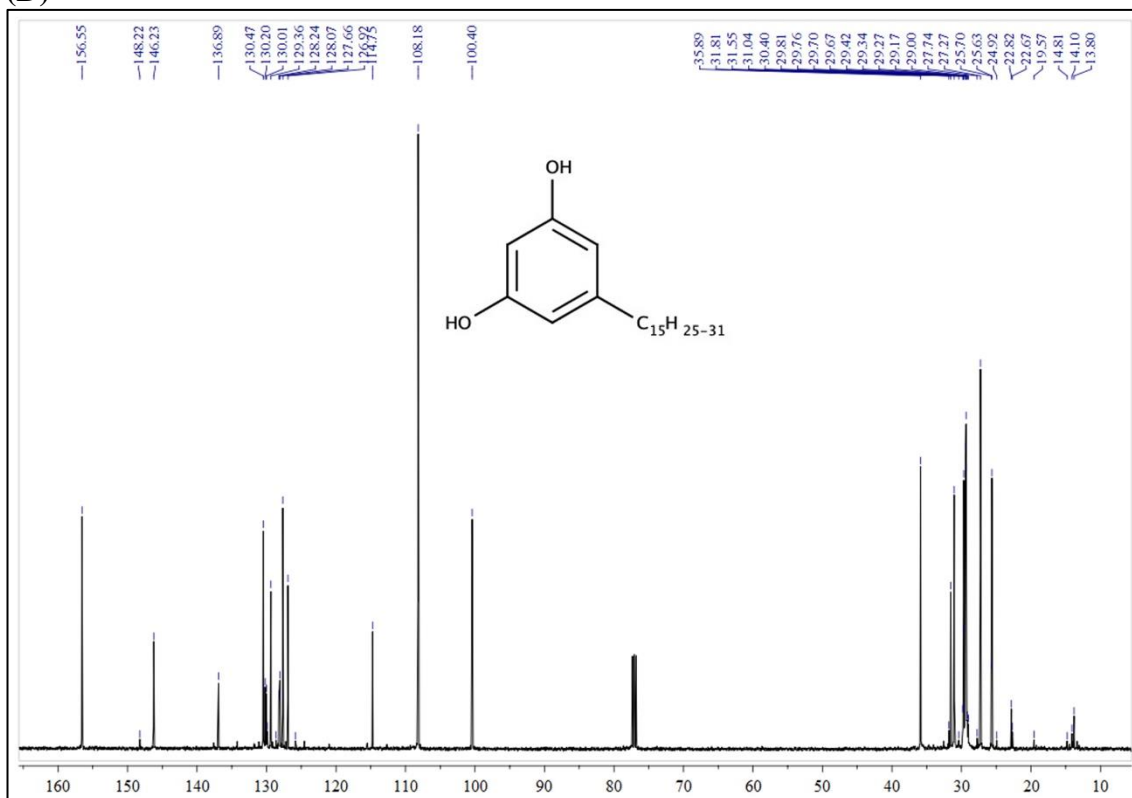
(B)



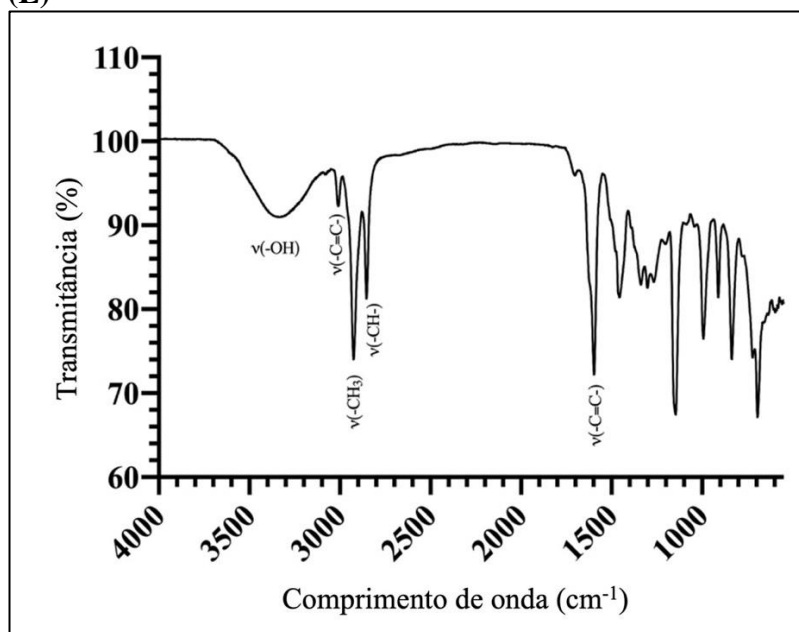
(C)



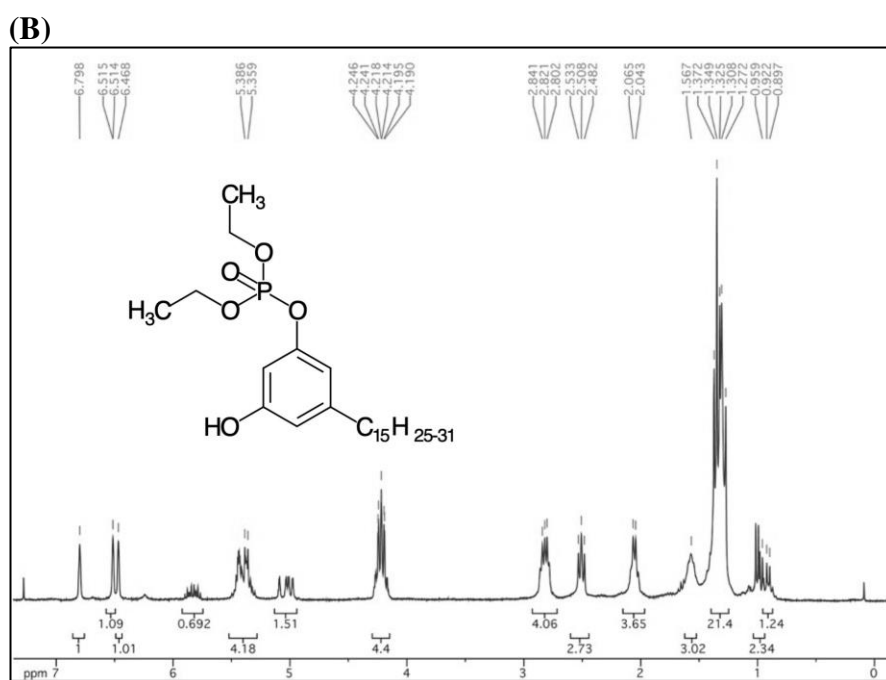
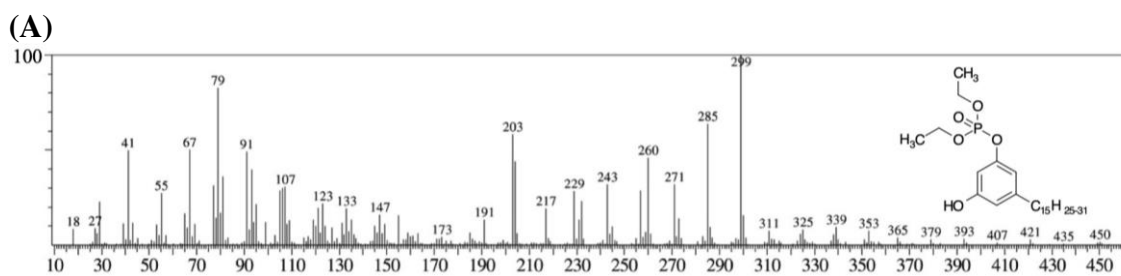
(D)



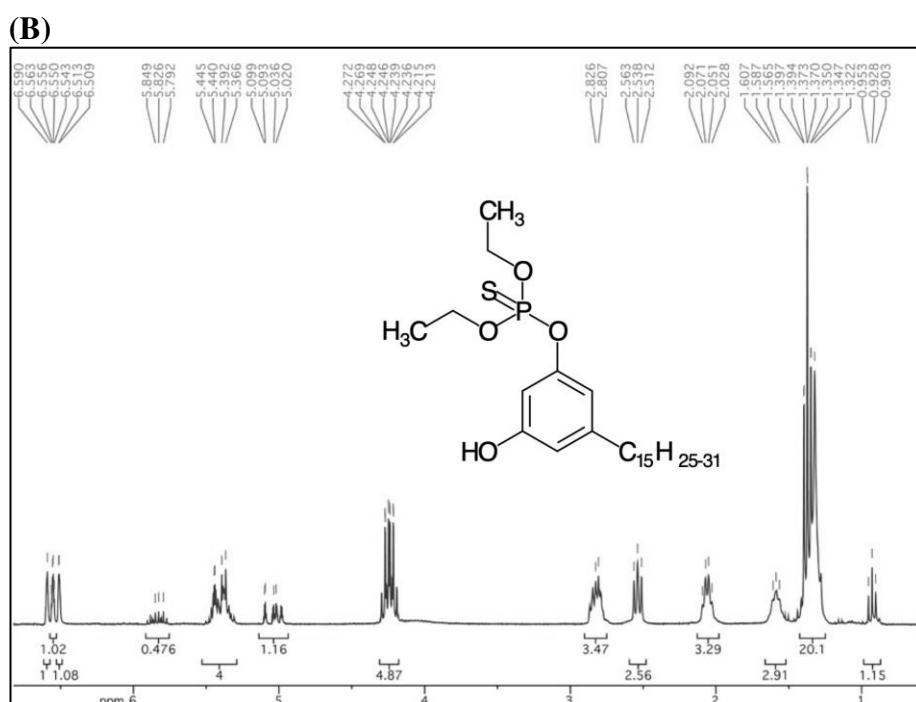
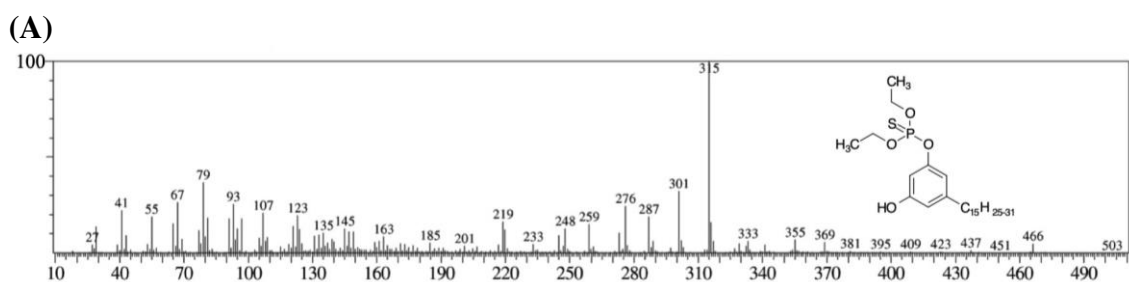
(E)



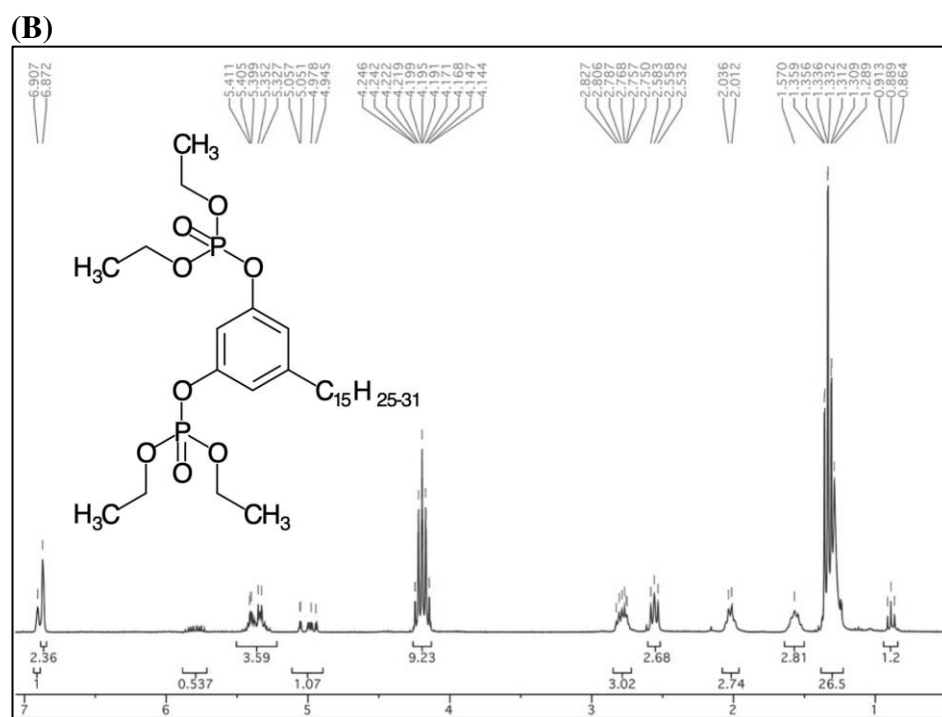
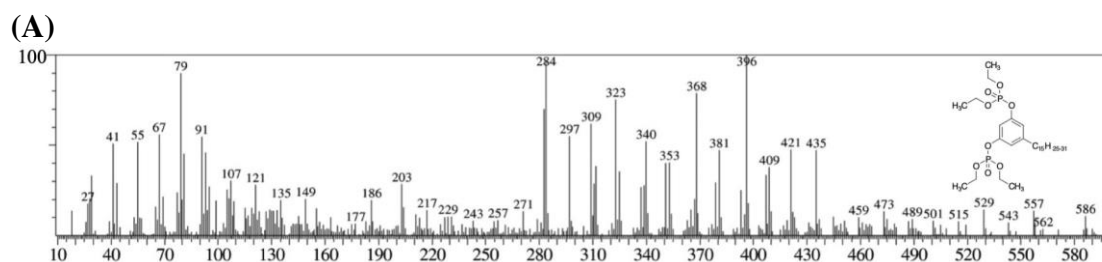
APÊNDICE C – CARACTERIZAÇÃO DO CD-MP: (A) ESPECTRO DE MASSA E (B)
RMN ^1H .



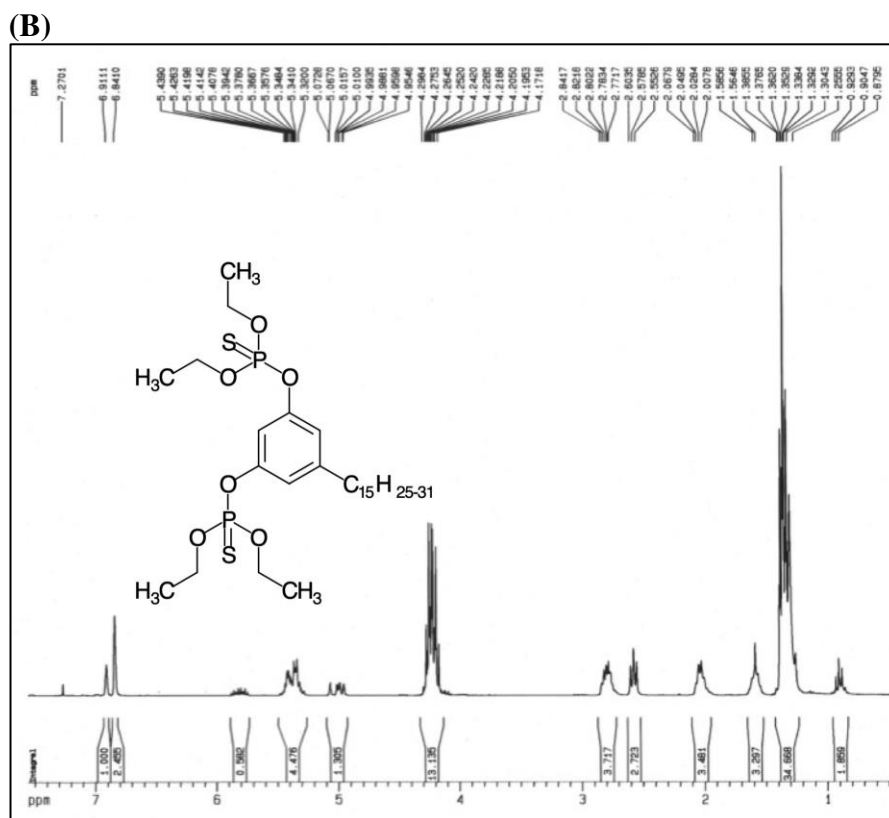
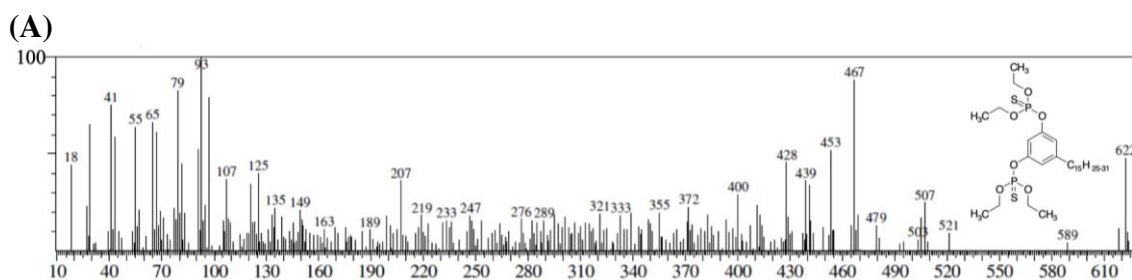
APÊNDICE D – CARACTERIZAÇÃO DO CD-MPS: (A) ESPECTRO DE MASSA E
(B) RMN ^1H .



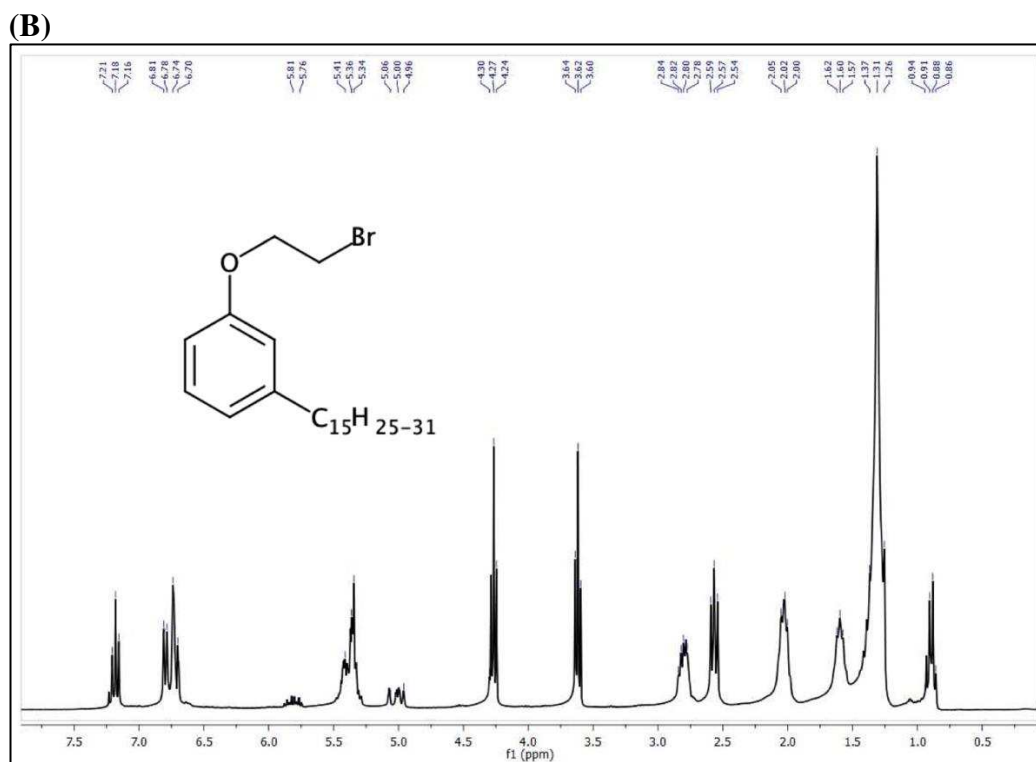
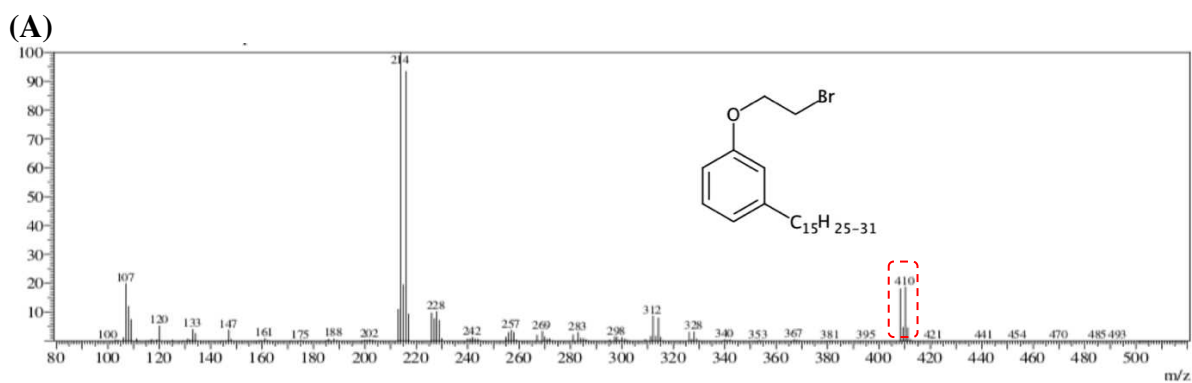
APÊNDICE E – CARACTERIZAÇÃO DO CD-DP: (A) ESPECTRO DE MASSA E (B) RMN ^1H .



APÊNDICE F – CARACTERIZAÇÃO DO CD-DPS: (A) ESPECTRO DE MASSA E
(B) RMN ^1H .

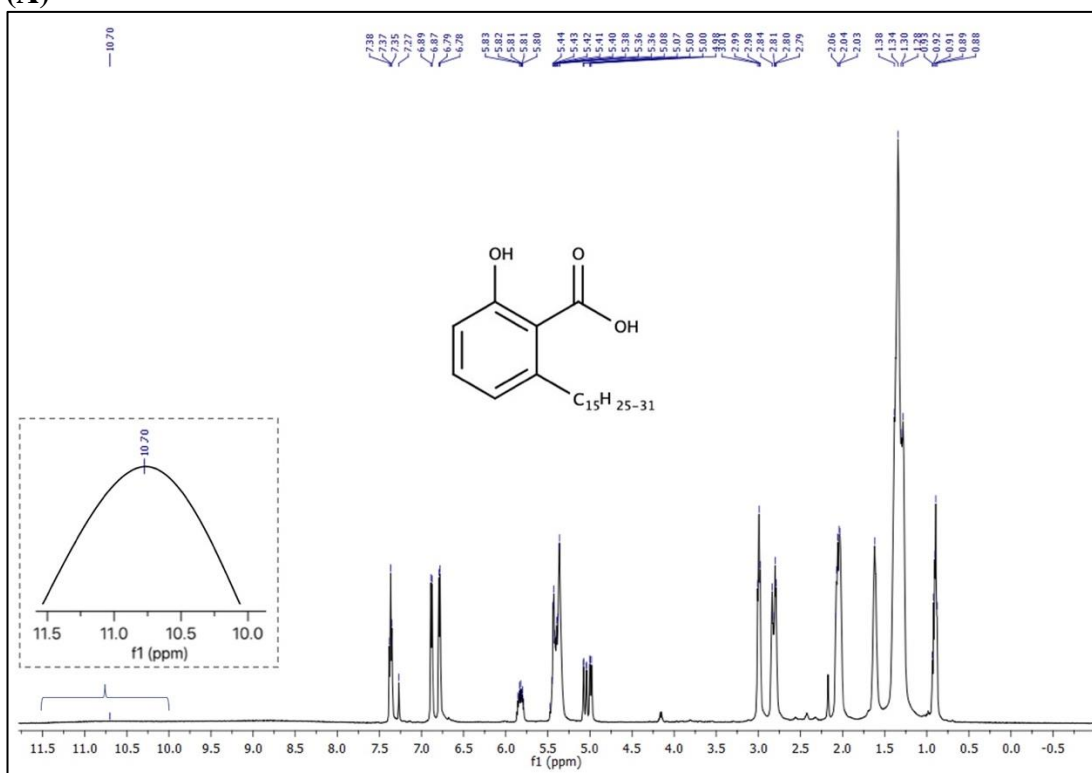


APÊNDICE G – CARACTERIZAÇÃO DO CDN-BR: (A) ESPECTRO DE MASSA E
(B) RMN ^1H .

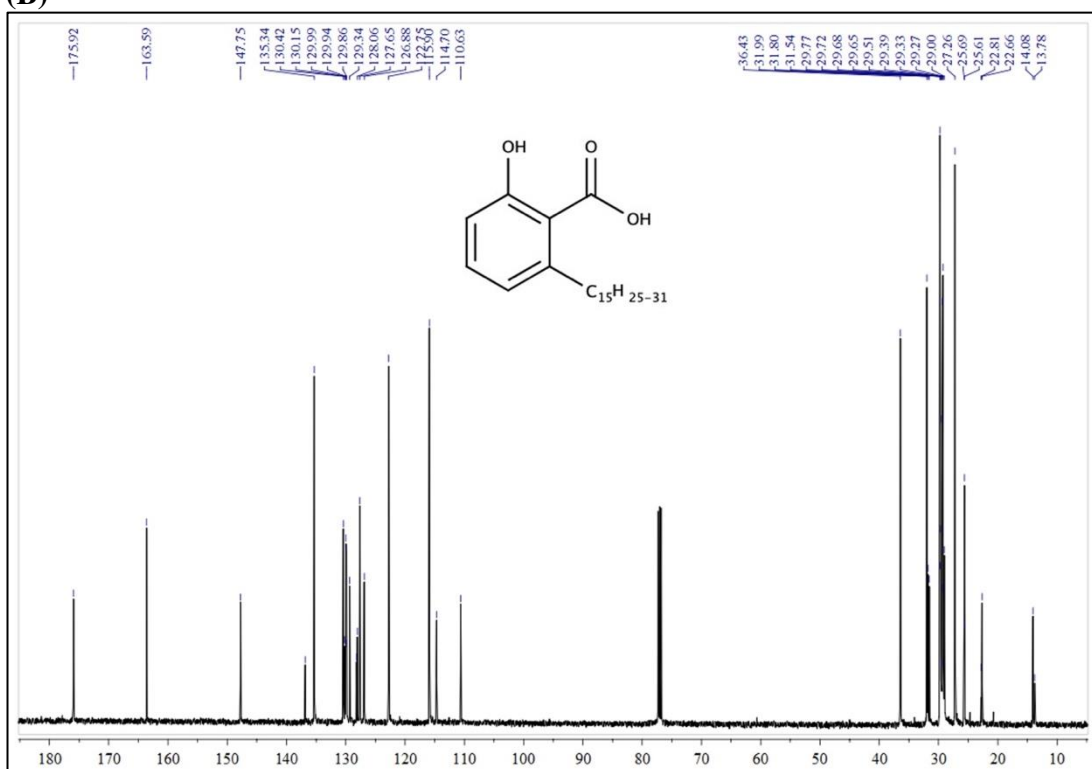


APÊNDICE H – CARACTERIZAÇÃO DO AA: (A) RMN ^1H , (B) RMN ^{13}C E (C) FT-IR.

(A)



(B)



(C)

