Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Campus São Paulo

Escola Paulista de Medicina – EPM

Curso Biomedicina

VICTORIA PERINI PEDERIVA

Bioprospecção de compostos inibidores das atividades catalíticas de homólogos das enzimas conversoras de angiotensina (ECA 1 e ECA 2) de insetos e de mamíferos

Estudo da *Cecropia glazioui*, Sneth (embaúba) e seus compostos químicos

São Paulo
2022

VICTORIA PERINI PEDERIVA

Bioprospecção de compostos inibidores da atividade catalítica de homólogos das enzimas conversoras de angiotensina (ECA 1 e ECA 2) de insetos e de mamíferos

Estudo da *Cecropia glazioui*, Sneth (embaúba) e seus compostos químicos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação na Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do grau de Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Lapa
Coorientadora: Profa. Dra. Mirtes Midori Tanae

São Paulo
2022

Perini Pederiva, Victoria

Bioprospecção de compostos inibidores da atividade catalítica de homólogos das enzimas conversoras de angiotensina (ECA 1 e ECA 2) de insetos e de mamíferos / Victoria Perini Pederiva. – São Paulo, 2022.
63 f

Orientador: Antonio José Lapa
Coorientador: Mirtes Midori Tanae

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina.

1. ECA-2. 2. Planta medicinal. 3. *Cecropia glazioui*. 4. *Aedes aegypti*. 5. Inseticida.

Dedico este trabalho à minha mãe, Elaine, ao meu pai de coração, Serafim, e ao meu pai, João, que levarei para sempre no meu coração e memória.

Obrigada por me apoiarem em todos os momentos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao professor Dr. Antonio Lapa, que aceitou ser o meu orientador e por todos os ensinamentos e conselhos que levarei para a vida. Agradeço também pelo incentivo, confiança e paciência.

À minha coorientadora, Dra. Mirtes Tanae, e à Dra. Daniela Myamoto, por me auxiliarem e me acompanharem em todos os momentos, me explicando desde as contas mais básicas até as técnicas mais complexas. Não conseguiria ter realizado este trabalho sem a ajuda de vocês.

À professora Dra. Vânia D'Almeida, por ter aceitado ser minha tutora, por estar disponível para me ouvir e por todas as conversas desde a Liga Acadêmica do Sono.

À professora Dra. Margareth Capurro, por fornecer os ovos de *Aedes aegypti*, essencial para o desenvolvimento deste projeto, e por disponibilizar um treinamento em seu laboratório sobre ensaios biológicos com insetos, da eclosão dos ovos à criação controlada de mosquitos. À técnica do laboratório, Ediane Saraiva Fernandes, por ter guiado esse treinamento.

À minha família, por todo o apoio imprescindível e por terem acreditado em mim e me incentivado a seguir a carreira dos meus sonhos de ser cientista.

Ao Filipe e aos meus amigos, tanto da faculdade como de fora, em especial ao "sexteto maravilha", por todo amor e carinho que me ajudaram a superar as dificuldades da graduação, tornando-a mais leve e divertida.

À turma 52 de Biomedicina, pelos surtos e momentos compartilhados durante a graduação, tanto dentro como fora da sala de aula.

Resumo

Mosquitos transmissores de arboviroses (dengue, zika, chikungunya, febre amarela), ou de malária e filariose, têm apresentado resistência progressiva aos inseticidas sintéticos clássicos de baixa toxicidade humana. A (quase) inexistência de vacinas eficazes e de medicamentos específicos contra essas enfermidades soma-se ao insucesso na pesquisa de novos inseticidas para prevenir surtos de doenças vetoriais. As enzimas conversoras de angiotensina (ECAs) de mamíferos têm importantes ações reguladoras da pressão arterial e foram encontrados homólogos dessas enzimas em insetos, cuja função ainda é pouco conhecida, porém vital. Esta pesquisa visa a obtenção de compostos naturais inibidores das ECAs de insetos que podem agir como inseticidas. A *Cecropia glazioui* foi a planta selecionada para este estudo.

As atividades enzimáticas das ECAs foram determinadas por fluorimetria utilizando o substrato FRET do tipo Abz-FRK(Dnp)P-OH para a ECA-1, e Mca-APK(Dnp) para a ECA-2. A atividade enzimática foi determinada incubando o homogenato de larvas (ou o plasma de ratos) com a fração butanólica (Fbut) (10-1000 μg/mL) ou com os compostos majoritários (0,1-100 μM) da *C. glazioui*. A Fbut inibiu não seletivamente as ECAs de plasma de rato e de homogenato de larvas, com valores de IC50 muito próximos. Apesar dos compostos serem menos ativos que a Fbut, o ácido clorogênico, as procianidinas B5, B3 e B2, a orientina, a isoorientina e a isovitexina (100 μM) reduziram significativamente a fluorescência emitida pelo substrato Abz para ECA-1 (p<0,0001)

Para a prova de conceito *in vivo*, foram testados a Fbut (0,3-30 mg/mL) e os compostos (0,03-0,3 mg/mL) que apresentaram maior atividade nos testes *in vitro*: orientina, isoorientina e isovitexina. Nesse ensaio, as larvas de *Aedes aegypti* foram expostas a diferentes concentrações desses compostos, registrando a mortalidade após 24, 48 e 72h. O desenvolvimento da larva até pupa foi avaliado por duas semanas. A letalidade para os primeiros estágios larvais foi maior e significativamente diferente da observada no estágio final de desenvolvimento da larva. Apesar dos flavonóides não terem mostrado uma ação inseticida in vivo, esses compostos inibiram significativamente o crescimento nos primeiros ínstares. O efeito foi persistente durante o tempo de exposição das larvas aos compostos. É possível que essa atividade esteja relacionada à inibição dos homólogos das ECAs em insetos, porém mecanismos adicionais ainda não foram estudados.

Palavras-chave: ECA-2, planta medicinal, *Cecropia glazioui, Aedes aegypti,* inseticida

Abstract

Mosquitoes that transmit arboviruses (dengue, zika, chikungunya, yellow fever), or malaria and filariasis, are becoming more resistant to insecticides of low human toxicity. The lack of vaccines and specific drugs against those vectorial diseases is aggravated by the low output in the search for new insecticides to prevent outbreaks of these diseases. Mammalian ACEs have important blood pressure-regulating actions and homologs of these enzymes have been found in insects, whose function is still not very well known, but vital. This research aims to obtain natural compounds that inhibit ACEs from insects that can act as insecticides. *Cecropia glazioui* was the plant selected for this study.

ACE activity was determined by the quenched fluorescence method (FRET) using the substrates: Abz-FRK (Dnp)P-OH for ACE-1 and Mca-APK(Dnp) for ACE-2. The enzymatic activity was determined by incubation of the larvae homogenate (or rat plasma) with the butanolic fraction (Fbut) (10-1000 μg/mL) or the major compounds (0,1-100 μM) of *C. glazioui*. Fbut inhibited non-selectively ACE activity of the rat plasma and larvae homogenate, with similar IC50 values. Although less active than Fbut, chlorogenic acid, procyanidins B5, B3 and B2, orientin, isoorientin and isovitexin (100 μM) reduced significantly the fluorescence emitted by the substrate Abz for ACE-1(p<0,0001).

For the *in vivo* test, it was tested Fbut (0,3-30 mg/mL) and the compounds (0,03-0,3 mg/mL) that showed higher activity in the *in vitro* ACE activity: orientin, isoorientin and isovitexin. For the larvicidal test, *Aedes aegypti* larvae were exposed to different concentrations of these compounds and lethality was recorded after 24, 48 and 72h. The larvae development into pupae was followed up for 2 weeks. The lethality for the first larval stages was higher and significantly different from that observed in the final stage of larval development. Although the flavonoids did not show an insecticidal activity *in vivo*, these compounds significantly inhibited the growth in the first instars. The effect was persistent during the time of exposure of the larvae to the compounds. It is possible that this activity is related to the inhibition of ACE homologs in insects, but additional mechanisms have not yet been studied.

Keywords: ACE-2, medicinal plants, *Cecropia glazioui, Aedes aegypti,* insecticide

Lista de Ilustrações, figuras

Figura 1 – Imagem ilustrativa da árvore da *Cecropia glazioui* Sneth

Figura 2 – Esquema de hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH

Figura 3 - Ciclo de vida do *Aedes aegypti*

Figura 4 – Influência da concentração do Abz-FRK(Dnp)P-OH na fluorescência emitida pela hidrólise do substrato pela ECA-1

Figura 5A – Efeito do captopril na atividade da enzima conversora da angiotensina do plasma de rato após incubação com Abz-FRK(Dnp)P-OH

Figura 5B - Efeito do captopril (10^{-8} a 10^{-6} M) na atividade da ECA-2 plasmática

Figura 6A – Influência da concentração enzimática (volume de plasma) na fluorescência emitida pela hidrólise do Mca-APK(Dnp) pela ECA-2.

Figura 6B – Influência da concentração do Mca-APK(Dnp) na fluorescência emitida pela hidrólise do substrato pela ECA-2

Figura 7A - Efeito do DX600 na atividade da ECA-2 do plasma de rato

Figura 7B - Efeito do DX600 (3 a 30 μM) na atividade da ECA-1 do plasma de rato

Figura 8 - Efeito da Fbut (10^{-5} a 3.10^{-4} g/mL) da *C. glazioui* e do Captopril ($2{,}2.\ 10^{-10}$ a $2{,}2.10^{-9}$ g/mL) na atividade da ECA-1 do plasma de rato

Figura 9A - Efeito dos compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-1 do plasma de rato

Figura 9B - Efeito dos compostos isolados da *C. glazioui* na fluorescência induzida pela hidrólise do Abz pela ECA-1 do plasma de rato

Figura 10 - Efeitos da Fbut da *C. glazioui* (3.10^{-5} a 10^{-3} g/mL) e do DX600 ($9{,}2.10^{-6}$ a $9{,}2.10^{-5}$ g/mL) na atividade da ECA-2 do plasma de rato

Figura 11 - Comparação do efeito da Fbut da *C. glazioui* (10^{-5} a 10^{-3} g/mL) nas atividades da ECA-1 e da ECA-2 plasmática

Figura 12A - Efeito dos compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-2 do plasma de rato

Figura 12B - Efeito dos compostos isolados da *C. glazioui* na fluorescência induzida pela hidrólise do Mca-APK(Dnp) pela ECA-2 do plasma de rato

Figura 13 - Efeito do captopril na atividade da ECA-1 do homogenato de larvas

Figura 14 - Efeito da Fbut da *C. glazioui* (3.10^{-5} a 10^{-3} g/mL) e do Captopril ($6,9.10^{-10}$ a $2,2.10^{-8}$ g/mL) na atividade da ECA-1 do homogenato de larvas

Figura 15 - Efeito do DX600 na atividade da ECA-2 do homogenato de larvas

Figura 16 - Efeito da Fbut da *C. glazioui* e do DX600 na atividade das ECA-2 de homogenato de larvas

Figura 17 - Efeito da Fbut da *C. glazioui* (3.10^{-5} a 10^{-3} g/mL) nas atividades da ECA-1 e da ECA-2 do homogenato de larvas

Figura 18A - Efeitos dos compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-2 do homogenato de larvas.

Figura 18B - Efeito dos compostos isolados da *C. glazioui* na fluorescência induzida pela hidrólise do Mca-APK(Dnp) pela ECA-2 do homogenato de larvas.

Figura 19 - Atividade larvicida da Fbut da *C. glazioui* (0,3 a 30 mg/mL) sobre as larvas de *A. aegypti*

Figura 20 - Comparação dos tamanhos das larvas de *A. aegypti* em ínstar L1 em condições controle e 72h após exposição à Fbut (0,3 - 30 mg/mL)

Figura 21 - Efeito dos flavonóides (0,03-0,3 mg/mL) na sobrevivência das larvas do ínstar L1 (à esquerda) e L2 (à direita) de *A. aegypti*.

Figura 22 - Efeito dos flavonóides (0,03-0,3 mg/mL) de *C. glazioui* no desenvolvimento de larvas do ínstar L1 de *A. aegypti* relativamente ao controle.

Figura 23 - Efeito dos flavonóides (0,03-0,3 mg/mL) de *C. glazioui* no desenvolvimento de larvas do ínstar L2 de *A. aegypti* relativamente ao controle

Figura 24 - Comparação dos tamanhos das larvas de *A. aegypti* em ínstar L1 em condições controle e 72h após exposição à orientina (0,03 - 0,3 mg/mL)

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Valores de DL50 calculados para os ínstares L1 a L4 após 24h de exposição à Fbut (0,3 a 30 mg/mL)

Lista de Abreviaturas e Siglas

Abz - ácido amino benzóico

Abz - substrato Abz-FRK(Dnp)OH

Ang I - angiotensina I

Ang II - angiotensina II

Ang 1-9 - angiotensina 1-9

Ang 1-7 - angiotensina 1-7

APK - alanina, fenilalanina, lisina

BPF - fator potenciador da bradicinina (“bradykinin potentiating factor”)

BK - bradicinina ("bradykinin”)

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Dnp - dinitrofenol

DTN - Doenças Tropicais Negligenciadas

ECA - Enzima Conversora de Angiotensina

Fbut - fração butanólica

FRET - “Fluorescence Resonance Energy Transfer”

FRK - fenilalanina. arginina, lisina

HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

Mca - 7-metoxycoumarin-2-acetic acid

Mca - substrato Mca-APK(Dnp)

SUMÁRIO

Dedicatória……4

Agradecimentos……...5

Resumo……6

Abstract……..8

Lista de Ilustrações, figuras……9

Lista de Tabelas……11

Lista de Abreviaturas e Siglas……12

Sumário……...13

1. Introdução……...16
   1.1. Doenças vetoriais e inseticidas……..16
   1.2. Plantas medicinais……18
      1.2.1. Cecropia……..18
   1.3. Enzima Conversora de Angiotensina ……20
      1.3.1. Inibidores da ECA-1 de mamíferos……21
      1.3.2. Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA-2).....21
2. Justificativa……23
3. Objetivos……24
   3.1. Objetivo geral……24
   3.2. Objetivos específicos……24
4. Materiais……25
   4.1. Material botânico……...25
   4.2. Compostos isolados da *Cecropia glazioui*……....25
   4.3. Animais……...26
   4.4. Ovos de mosquito……26
   4.5. Solventes, sais e reagentes……26
   4.6. Tampões……27
5. Métodos……..28

5.1. Extração e isolamento de compostos de plantas medicinais……28
5.1.1. Obtenção do extrato aquoso (EA) e fração butanólica (FBut)...28
5.1.2. Purificação da fração butanólica (FBut) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAE-Prep).....28
5.1.3. Análises complementares do extrato e frações……28
5.2. Dosagem da atividade enzimática da ECA-1 e ECA-2 de mamíferos..28
5.2.1. Obtenção de amostras de sangue para determinação da atividade da ECA-1 plasmática ……..28
5.2.2. Determinação da atividade da ECA-1 plasmática……29
5.2.3. Ensaio da atividade enzimática da ECA-2 de mamífero…….30
5.3. Dosagem da atividade enzimática da ECA-1 e ECA-2 de insetos……30
5.3.1. Preparação da enzima de mosquitos……30
5.3.2. Ensaio da atividade enzimática das ECAs de insetos……30
5.4. Prova de conceito da atividade inseticida……..30
5.5. Análise estatística ……31
6. Resultados……..32
6.1. Padronização do ensaio para determinação da atividade enzimática no plasma……32
6.1.1. Atividade da ECA-1……..32
6.1.2. Caracterização da atividade da ECA-2 do plasma de rato…….34
6.2. Avaliação do efeito da Fbut e dos compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-1 plasmática……35
6.2.1. Efeito da Fbut na atividade da ECA-1 em plasma de rato……..35
6.2.2. Efeitos dos compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-1 em plasma de rato……36
6.3. Avaliação do efeito da FBut e dos compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-2 plasmática..……38
6.3.1. Efeito da Fbut na atividade da ECA-2 de plasma de rato……...38
6.3.2. Comparação dos efeitos inibitórios da Fbut nas atividades das ECA-1 e ECA-2 do plasma de rato……39
6.3.3. Efeitos dos Compostos isolados da *C.glazioui* na atividade da ECA-2 em plasma de rato……39
6.4. Avaliação do efeito da Fbut e dos compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-1 de homogenato de larvas de *A. aegypti* ……41

6.4.1. Efeito da Fbut da *C. glazioui* na atividade da ECA-1 em homogenato de larva…….42
6.5. Avaliação do efeito da Fbut e dos compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-2 de homogenato de larvas de *A. aegypti*…….42
6.5.1. Efeito da Fbut da *C. glazioui* na atividade da ECA-2 em homogenato de larva…….43
6.5.2. Comparação dos efeitos inibitórios da Fbut nas atividades das ECA-1 e ECA-2 do homogenato de larvas……44
6.5.3. Efeitos dos Compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-2 em homogenato de larva…….44
7. Prova de conceito in vivo da atividade inseticida da *C. glazioui*……..46
7.1. Avaliação do efeito da Fbut de *C. glazioui* na letalidade das larvas de *A. aegypti*……46
7.2. Avaliação do efeito dos flavonóides isolados da Fbut da *C. glazioui* sobre a letalidade das larvas de *A. aegypti*……...49
7.3. Avaliação do efeito dos flavonóides isolados da Fbut da *C. glazioui* no desenvolvimento de larvas de *A. aegypti*……...50
8. Discussão……52
9. Conclusão……...55
10. Colaborações científicas, dificuldades na pesquisa e limitações……..56
11. Referências bibliográficas……57

1. Introdução

1.1. Doenças vetoriais e inseticidas

Os insetos representam a classe animal com maior diversidade no planeta, estimada em mais de 5 milhões de espécies (Gaston et al., 1991; Stork et al., 2015), sendo imprescindíveis à manutenção das interações ecológicas e ao equilíbrio do ecossistema por atuarem como predadores, detritívoros, parasitas e polinizadores. Esta última função também impacta positivamente a economia, já que está diretamente ligada à produção de alimentos, resultantes da polinização de espécies de plantas cultivadas na agricultura (Nichols et al., 2008; Jankielsohn et al., 2018). Entretanto, há espécies que atuam como pragas nas lavouras e outras, de importância na saúde pública, atuam como vetores de doenças humanas como a malária, a zika, a dengue, a chikungunya, a febre amarela, a doença de Chagas, a filaríose e outras doenças negligenciadas (DTNs).

As doenças vetoriais são aquelas causadas por um patógeno transmitido por um artrópode, como mosquitos, triatomíneos e moscas. Mais de 80% da população mundial está sob risco de doenças transmitidas por vetores, usualmente em zonas tropicais e subtropicais de países subdesenvolvidos, ou em desenvolvimento (Golding et al., 2015). Dentre elas, a malária e as arboviroses, como a zika e a dengue, foram causas de endemias regionais preocupantes há apenas alguns anos.

A malária é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium,* sendo as espécies *P. falciparum* e *P. vivax* as responsáveis pelo maior número de casos. Em 2020, a malária afetou aproximadamente 241 milhões de pessoas, provocando a morte de 627.000 (OMS 2021). A transmissão da doença ocorre, exclusivamente, pela picada de mosquitos do gênero *Anopheles* quando infectados pelo protozoário.

A Zika é uma arbovirose causada pelo vírus zika, sendo declarada emergência de saúde pública internacional em 2016 pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Essa enfermidade está presente em 85 países do mundo (Leta et al., 2018) e de janeiro a maio de 2022, foram notificados 5.699 casos prováveis de zika no Brasil (Ministério da Saúde, 2022). Ainda que 80% dos infectados não desenvolvam manifestações clínicas, podem ocorrer complicações graves como a microcefalia (Johansson et al., 2016), anomalias congênitas e a síndrome de Guillain-Barré, uma desmielinização poli-radicular progressiva. A zika é transmitida principalmente pela picada de mosquitos dos gêneros *Aedes* (Diagne et al., 2015) e

Culex (Guedes et al., 2017). Há outros modos de transmissão, como a sexual, a sanguínea e a vertical (da mãe para o feto).

A dengue, arbovirose transmitida pelo mosquito do gênero *Aedes,* foi responsável pela notificação de mais de 1 milhão de casos suspeitos no Brasil, no primeiro semestre de 2022, concentrando-se principalmente na região Centro-Oeste, com 960 casos de dengue grave e 12.158 casos de dengue com sinais de alarme (Ministério da Saúde, 2022). Uma vacina contra a dengue vem sendo desenvolvida pelo Instituto Butantan e pelo Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos (NIAID) há mais de 10 anos. Resultados da fase 1 do ensaio clínico mostraram que a vacina induziu a formação de anticorpos em 100% dos indivíduos que já tiveram dengue e em mais de 90% naqueles que nunca tinham tido contato com o vírus. Atualmente, o ensaio clínico encontra-se na fase 3 (Instituto Butantan, 2022).

Essas arboviroses têm se espalhado globalmente de forma rápida devido à adaptação do mosquito do gênero *Aedes* às condições urbanas, crescimento intensivo dos sistemas de transporte globais, alterações em fatores ambientais e medidas ineficazes de combate ao vetor (Gould et al., 2017), levando a impactos econômico e social. Em 2016, foram destinados R$ 1,5 bilhão para combate ao vetor, além de serem gastos R$ 374 milhões para custos médicos e R$ 431 milhões para custos indiretos decorrentes da perda de produtividade por afastamentos em virtude da doença (Teich et al., 2017).

Dado que essas doenças são transmitidas principalmente por vetores da classe Insecta, é de grande interesse na área da saúde o controle deles como medida profilática. Vale ressaltar que não há medicamentos específicos para as arboviroses, os medicamentos existentes para as doenças vetoriais estão perdendo eficácia, não há vacina eficiente para nenhuma DTN, além delas serem subestimadas pela população. Conforme estudo publicado pela revista The Lancet em 2019, dos 256 fármacos aprovados para o mercado entre janeiro de 2012 e setembro de 2018, apenas 3,1% deles foram direcionados para o tratamento de DTNs.

A resistência a inseticidas também é um dos maiores obstáculos para o controle dos artrópodes causadores de doenças. A resistência resulta em um aumento das frequências de aplicação e das dosagens, queda do rendimento, danos ambientais e surtos de doenças humanas e animais quando os vetores não podem

ser controlados. Evidências epidemiológicas mostram que os insetos domiciliares já desenvolveram resistência aos piretróides, inseticida suave que age sobre os canais de cálcio. Outros compostos mais potentes disponíveis como inibidores da enzima colinesterase têm uso restrito à lavoura, não podendo ter uso domiciliar prolongado. Os análogos sintéticos não têm tido êxito e o combate epidemiológico aos mosquitos domiciliares transmissores das arboviroses e da malária endêmicas não conta com novos inseticidas atóxicos (Brogdon et al., 1998; Scott et al., 2021). Por estes motivos, a pesquisa de novos repelentes e inseticidas inovadores e pouco tóxicos encabeça a lista de prioridades farmacológicas em Saúde Pública (APPMS 2018).

1.2. Plantas Medicinais

Estima-se que o Brasil seja o detentor da maior diversidade vegetal do planeta, representando mais de 20% da biodiversidade global (Bolzani et al., 2010), o que pode facilitar a obtenção de novos fitomedicamentos. Muitas plantas da região amazônica têm sido utilizadas por residentes locais como remédios naturais para doenças tropicais, incluindo malária, infecções fúngicas e bacterianas (Rates et al., 2005; Assolini et al., 2006).

1.2.1. Cecropia

O gênero *Cecropia* foi a primeira escolha para o presente estudo. Este gênero neotropical se distribui desde o sul do México até o norte da Argentina, crescendo principalmente em áreas úmidas entre o nível do mar e 2.600 m de altitude. As Cecropias incluem mais de 60 espécies de árvores dióicas, pouco ramificadas, com tronco oco e folhas peltadas (Franco-Rosselli et al., 1997).

No Brasil, a grande maioria das espécies de Cecropia encontra-se na Amazônia, onde são conhecidas popularmente como embaúba, imbaúba e outras variações do termo “ambaíba”, que no tupi significa "árvore com orifício", remetendo aos caules ocos dessas espécies (Coimbra, 1958; Pott & Pott, 1994; Berg et al., 2005). As Cecropias são importantes para a ecologia regional por serem árvores pioneiras em regiões úmidas, ou neotrópicas semi-úmidas, auxiliando na regeneração espontânea de locais degradados, ou que foram desmatados (Monro et al., 2009) Acredita-se que isso ocorra devido à sua alta taxa de proliferação que fornece sombreamento para futuras plantas. Contudo, por esse motivo, elas podem se tornar espécies invasoras em regiões não nativas (Conn et al., 2012).

Algumas espécies de Cecropia são mirmecófilas, ou seja, estabelecem relação de mutualismo com formigas, especialmente do gênero Azteca. Nessa relação, a Cecropia oferece abrigo, espaço e possível nutrição para as formigas, que em troca fornecem proteção contra inimigos naturais (Oliveira et al., 2015).

As cecropias também são reconhecidas como medicinais por toda a América Latina, o que impulsionou estudos farmacológicos para confirmar os usos na medicina popular. Existem indicações de efeitos anti-hipertensivo (Lima-Landman et al., 2007), hipoglicemiante (Andrade-Cetto et al., 2007), anti-inflamatório (Müller et al., 2016), analgésico (Pérez-Guerrero et al., 2001), antimicrobiano (Rojas et al., 2006), antiviral (Caldas dos Santos et al., 2017), ansiolítico (Rocha et al., 2002) e antidepressivo (Rocha et al., 2007). Foram também estudados os seus efeitos para o tratamento de asma e broncoespasmo (Delarcina et al., 2007) e úlceras gástricas (Souccar et al., 2008).

Os principais constituintes químicos deste gênero são: glicosídeos, lipídeos, procianidinas, flavonóides, taninos, catequinas, terpenóides, esteróides, ácido clorogênico e resinas (Tanae et al., 2007; Costa et al., 2011) estruturalmente identificados, mas de atividades farmacológicas pouco conhecidas.

A *Cecropia glazioui* Sneth, encontrada na Serra do Mar, foi a espécie selecionada para esta abordagem científica inicial, porque grande parte dos efeitos apontados acima foram obtidos com os extratos da *C. glazioui* padronizados quimicamente por Tanae et al. (2007)

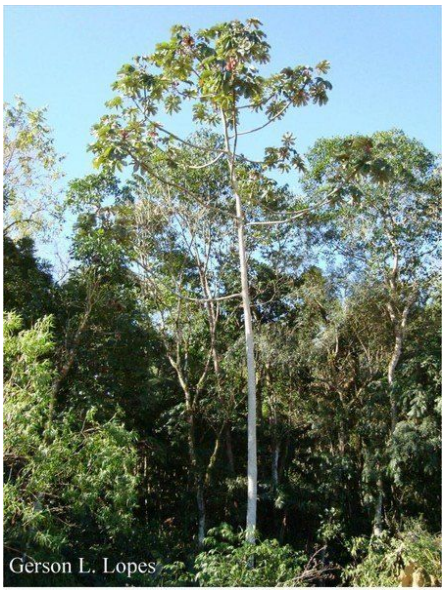


Figura 1: Imagem ilustrativada árvore da *Cecropia glazioui* Sneth, disponível em: https://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/10418-2/

1.3. Enzima Conversora de Angiotensina

A enzima conversora da angiotensina de mamíferos (ECA, neste projeto grafada como ECA-1), foi isolada em 1956 por Skeggs e identificada como uma metalopeptidase transmembranar dependente de zinco. A ECA-1 é essencial para a regulação da pressão arterial de mamíferos, uma vez que modula o Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) (Turner et al., 2002).

Duas isoformas de ECA-1 foram identificadas em mamíferos: uma somática (sECA), abundante e dispersa, e outra testicular (tECA), expressa somente nas espermátides em desenvolvimento (Soubrier et al., 1988; Langford et al., 1993). As duas são enzimas dipeptidilcarboxipeptidases transmembranares expressas do mesmo gene. Diferenciam-se porque a sECA tem 2 domínios e centros catalíticos *in tandem*, enquanto a tECA apresenta apenas 1 domínio e centro catalítico. A sECA em humanos é expressa em muitos tipos de células endoteliais, principalmente nos vasos capilares pulmonares, como também nas células epiteliais do rim, intestino delgado e epidídimo (Caldwell et al., 1976; Ryan et al., 1976; Riordan, 2003). A sECA apresenta massa de 150-180 kDa e consiste de um domínio intracelular, um domínio transmembrana e dois domínios extracelulares similares com um sítio catalítico cada: o domínio amino (N) e o domínio carboxi-terminal (C). A tECA é uma isoforma menor (90-110 kDa) com um único sítio ativo que corresponde ao domínio C da sECA (Turner et al., 2002).

Dentre suas funções, a ECA-1 é responsável por converter o decapeptídeo biologicamente inativo angiotensina I (Ang I) em angiotensina II (Ang II), um octapeptídeo vasoconstritor potente. A Ang II afeta a maioria das funções biológicas da RAAS atuando em dois receptores, AT1 e AT2, acoplados à proteína G. Os efeitos deletérios da Ang II, como a vasoconstrição que causa a hipertrofia cardíaca e vascular, são mediados pelo receptor AT1, enquanto o receptor AT2 medeia efeitos opostos como a vasodilatação, inibição do crescimento celular, diferenciação celular e apoptose (Turner et al., 2002; Zaman et al., 2002). Além de atuar no sistema cardiovascular, a Ang II também age no sistema nervoso central e periférico, estimulando a sede, a síntese e a liberação de aldosterona e retenção de sódio e fluidos pelo rim (Zaman et al., 2002). A ECA-1 também modula a pressão sanguínea inativando a bradicinina (BK), um peptídeo vasodilatador (Yang et al., 1970).

1.3.1. Inibidores da ECA-1 de mamíferos

A literatura descreve inibidores da ECA-1 provenientes de animais, como o Fator Potenciador da Bradicinina (BPF) isolado da cascavel por Ferreira (1965), com atividade hipotensora. O BPF foi a base para a modelagem molecular dos sítios ativos da carboxipeptidase e da síntese de inibidores da ECA-1 ativos por via oral (Ondetti et al., 1977).

Os inibidores da ECA-1 ligam-se ao sítio ativo da enzima impedindo a clivagem de seus substratos: a angiotensina I e a bradicinina (Cushman et al., 1991). O captopril, primeiro inibidor ativo a ser sintetizado, tem uma estrutura espacial que mimetiza a afinidade dos substratos peptídicos pela ECA-1 e inibe a atividade enzimática (Kim et al., 2003).

Já foi também demonstrada a obtenção de inibidores da ECA-1 de plantas medicinais, porém a ação hipotensora atribuída a uma atividade inibidora da ECA-1 demonstrada *in vitro* pela Cecropia (Lacaille-Dubois et al., 2001) foi questionada em outras experiências *in vivo* (Ninahuaman et al., 2007).

1.4. Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA-2)

Quase 50 anos após a descoberta da ECA-1, Tipnis (2000) e Donoghue (2000) identificaram o primeiro homólogo humano da ECA-1, denominado ECA-2, com 33% de similaridade estrutural. A ECA-2 também é uma proteína integral de membrana com um único domínio catalítico zinco-dependente e está localizada principalmente no coração, nos rins e nos testículos. Durante a pandemia de SARS-CoV em 2002-2003, a ECA-2 humana foi identificada como o receptor do coronavírus, ao qual se liga por meio da proteína *spike* antes da internalização (Li et al., 2003). Essa interação também foi confirmada para o novo coronavírus SARS-CoV-2 durante a pandemia de COVID-19 atual (Zhou et al., 2020).

Diferentemente da ECA-1, que cliva dipeptídeos na porção carboxi-terminal, a ECA-2 remove um único resíduo de seus substratos, como as angiotensinas I e II, a neurotensina e a cinetensina. A ECA-2 cliva a angiotensina I em angiotensina 1-9 que tem um papel anti-hipertrófico em cardiomiócitos, e a angiotensina II em angiotensina 1-7, com atividades vasodilatadora e anti-inflamatória. A ECA-2 não age sobre a bradicinina e não é sensível aos inibidores da ECA-1 como captopril, lisinopril e enalaprilato (Lamango et al., 1994; Donoghue et al., 2000; Harisson et al., 2014).

Por muito tempo, pensou-se que as ECAs eram restritas aos mamíferos. Entretanto, homólogos dessas enzimas, que compartilham mais de 30% dos aminoácidos com a enzima humana, foram encontrados na hemolinfa de insetos e em seus tecidos reprodutivos (Lamango et al., 1994; Isaac et al., 2007). O genoma do *Anopheles gambiae* já foi previamente sequenciado (Holt et al., 2002) e foram encontrados alguns homólogos da ECA-1, como o AnoACE9, que possui dois domínios catalíticos dispostos em tandem, como a sECA (Burnham et al., 2005). A Ang II já foi descrita com atividade antiplasmódica (Silva et al., 2014).

Como os insetos possuem circulação aberta e não possuem a maior parte dos componentes do sistema RAAS, como os peptídeos Ang I e II, postula-se que essa enzima tenha funções em outros processos fisiológicos, sobretudo no desenvolvimento e na reprodução, mas nenhum desses mecanismos foi elucidado (Harisson et al., 2014; Isaac et al., 2007; Siviter et al., 2002). Demonstrou-se, no entanto, que *knockout* de ECAs em *D. melanogaster* são inviáveis (Harisson et al., 2014; Isaac et al., 2007) e que o captopril também é letal às larvas de *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae* (Abu Hasan et al., 2017).

2. Justificativa deste estudo

Estudos indicaram que a expressão de muitos homólogos da ECA-1 foi preservada durante a evolução biológica. Inicialmente, as funções dessas enzimas foram relacionadas à fisiologia dos órgãos onde se acumulam e também são importantes para o desenvolvimento dos insetos, mas ainda pouco se sabe.

O controle de insetos é de extrema importância para o combate às doenças vetoriais. Excetuando-se a febre amarela, essas doenças ainda não possuem uma vacina e os medicamentos estão ficando cada vez menos eficazes. O uso prolongado de inseticidas pode selecionar linhagens resistentes de vetores, além de causar efeitos adversos em organismos não-alvos e potencial químico residual no meio ambiente. Dessa forma, o controle dos vetores por meio de novos inseticidas de origem natural seria uma ótima forma profilática de impedir o avanço dessas doenças e novos surtos.

Estudos mostraram que a Cecropia foi capaz de inibir a ECA *in vitro*. Tendo em vista que a ECA é uma enzima essencial para a sobrevivência de mosquitos, um composto capaz de inibi-la agiria como inseticida. Assim, o estudo atual visa a obtenção fitoquímica de compostos inibidores da ECA-1 e da ECA-2 primeiramente com atividade inseticida, mas potencialmente como novos anti-hipertensivos e ainda, como precursores do anti-*docking* de coronavírus.

A busca e o desenvolvimento de novos compostos inibidores da ECA-1 humana mais seletivos e menos tóxicos são prioridade em Saúde Pública, assim como é necessária a descoberta de moduladores da enzima ECA-2 que, até o momento, não conta com inibidores específicos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo realizar a triagem de novos compostos de origem natural em alvos de insetos homólogos às enzimas ECA-1 e ECA-2 humanas que, por serem mais conhecidas, foram os padrões comparativos da ação farmacológica investigada.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Padronizar as dosagens das atividades das ECA-1 e ECA-2 em sangue de roedores utilizando o método da fluorescência apagada

3.2.2. Idem na presença do inibidor padrão captopril. Determinar os parâmetros de inibição e a IC_{50}

3.2.3. Realizar as dosagens na presença dos compostos isolados da *Cecropia glazioui* da Mata Atlântica. Obter as curvas de inibição e as IC_{50} da fração semi-purificada (FBut) e dos 10 compostos majoritários dela isolados (orientina, isoorientina e isovitexina; catequina e epicatequina; procianidinas B2, B3, B5 e C1; e ácido clorogênico);

3.2.4. Extrair e dosar as atividades de homólogos de ECA-1 e ECA-2 de larvas (ínstar 3) de mosquitos (*Aedes aegypti*). Dosar as atividades dos homólogos de ECA-1 e ECA-2 de larvas e insetos adultos na presença dos compostos isolados da *C. glazioui*

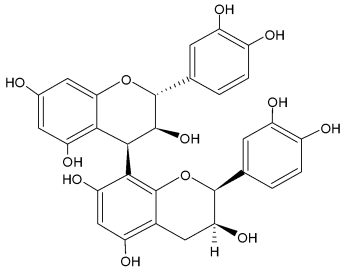
3.2.5. Realizar a Prova de Conceito *in vivo* da atividade inseticida dos compostos mais ativos dispersos na água de crescimento das larvas

4. Materiais

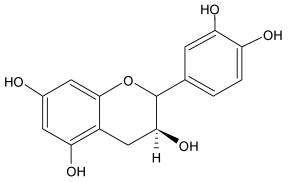
4.1. Material Botânico

A *Cecropia glazioui* utilizada neste trabalho foi cultivada no Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agronômicas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Uma exsicata da planta encontra-se depositada no CPQBA sob número 78.

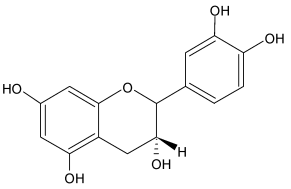
4.2. Compostos isolados da *Cecropia glazioui*



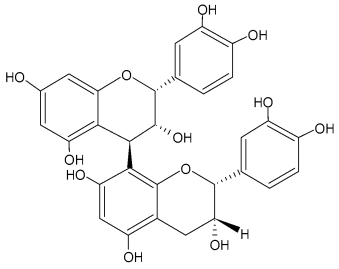
catequina-(4α → 8)-*ent*-catequina
(isômero da procianidina B3) (PM 578)



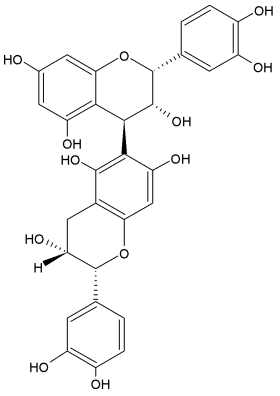
catequina
(PM 289)



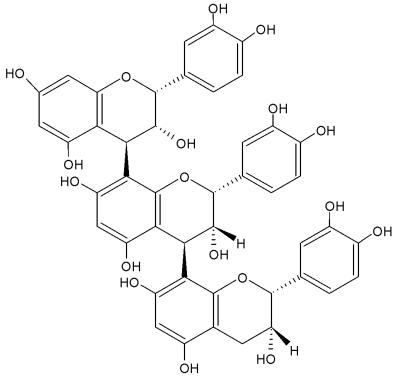
epicatequina
(PM 289)



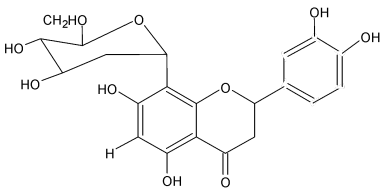
epicatequina-(4β→ 8) -epicatequina
(procianidina B2) (PM 578)



epicatequina-(4β → 6)-epicatequina
(procianidina B5) (PM 578)

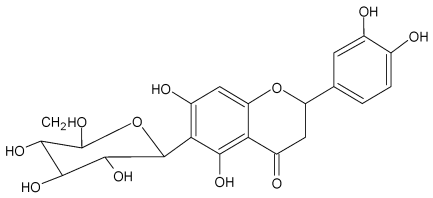


epicatequina-(4β→ 8)-epicatequina-(4β → 8)-epicatequina



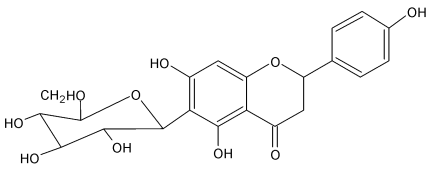
orientina

(procianidina C1) (PM 867)

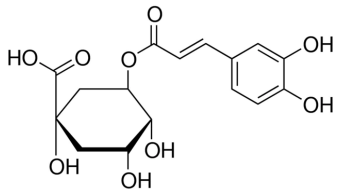


isoorientina
(PM 448)

(PM 448)



isovitexina



ácido cafeoilquínico
(ácido clorogênico) (PM 354.31)

4.3. Animais

Ratos Wistar albinos (*Rattus novergicus*) adultos, pesando entre 300-350g, mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e iluminação, com livre acesso a água e ração, fornecidos pelo biotério do CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina).

4.4. Ovos de mosquito

Ovos da linhagem Rockfeller do mosquito do gênero *Aedes* foram gentilmente fornecidos pela professora Margareth Capurro do Departamento de Parasitologia - USP.

4.5. Solventes, sais e reagentes

- Abz-FRK(Dnp)P-OH (Aminotech, Brasil)
- Acetonitrila grau HPLC (VETEC Química Fina LTDA, Brasil)
- Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico - HEPES (Sigma Chemical, USA)
- Álcool butílico (Labsynth, Brasil)
- Angiotensina I (Sigma, USA)
- Angiotensina II (Sigma, USA)

- Captopril (Sigma, USA)
- Cloreto de Sódio (Merck S.A., Indústrias Químicas do Brasil)
- Cloreto de Zinco (Labsynth,Brasil)
- DMSO (Merck S.A., Indústrias Químicas do Brasil)
- DX600 (Aminotech, Brasil)
- Mca-APK(Dnp) (Aminotech, Brasil)
- Tris-HCl (Sigma, USA)

4.6. Tampões

- Tampão de ensaio da atividade enzimática da ECA-1 (mM): Tris-HCl (100), NaCl (50), $ZnCl_2$ (0,01), pH 7,0.
- Tampão de ensaio da atividade enzimática da ECA-2 (mM): Tris–HCl (75), NaCl (1000), $ZnCl_2$ (0,5), pH 6,5.

5. Métodos

5.1. Extração e isolamento de compostos de plantas medicinais

Os extratos e frações purificadas foram obtidos por Tanae et al. (2007). Em resumo:

5.1.1. Obtenção do extrato aquoso (EA) e fração butanólica (FBut)

O pó de partes aéreas da planta foi pesado (20g) e extraído com água quente (1L) a 73º C, com agitação a cada 10 min (3x). Após filtração, o extrato aquoso (EA) foi concentrado a vácuo a 1/5 do volume inicial. O extrato concentrado obtido de 5 extrações foi extraído com álcool butílico em funil de separação, dando origem à fração aquosa (FA) e à fração butanólica (FBut), que foram concentradas a vácuo e liofilizadas.

5.1.2. Purificação da fração butanólica (FBut) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAE-Prep)

A FBut foi purificada em um sistema CLAE-Prep (Shimadzu-Japão) composto por 2 bombas injetoras (LC-8A), controlador (SCL-8A), integrador (CR4A), coletor de frações (FCV-100B) e detector espectrofotométrico, operando a 210 nm. A fase móvel foi composta por gradiente linear de água/acetonitrila em coluna Shimpack Prep-ODS (25 x 2 cm), empacotada com partículas esféricas de 5 μm, em fluxo constante de 10 mL/min. A FBut foi dissolvida em água de alto grau de pureza (Milli-Q) e injetada no cromatógrafo em alíquotas de 1 mL, coletando-se as frações referentes aos picos majoritários com área > 1% da área total do cromatograma.

5.1.3. Análises complementares do extrato e frações

O EA, a FA, a FBut e os compostos obtidos da purificação em CLAE-Prep foram analisados por CLAE analítica. As frações com grau de pureza maior que 80% foram submetidas às análises de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (1H-RMN), de carbono (13C-RMN) e espectrometria de massas (Central Analítica - USP-SP).

5.2. Dosagem da atividade enzimática da ECA-1 e ECA-2 de mamíferos

5.2.1. Obtenção de amostras de sangue para determinação da atividade da ECA-1 plasmática

O sangue foi obtido por punção da aorta abdominal de ratos anestesiados com isoflurano. O sangue foi centrifugado (2500 rpm, 20 min) e o plasma separado foi estocado a -20º C.

5.2.2. Determinação da atividade da ECA-1 plasmática

A atividade da ECA-1 plasmática foi analisada pelo método da fluorescência apagada (Carmona et al., 2006) utilizando o Abz-FRK(Dnp)P-OH (AminoTech, Brasil) como substrato, onde Abz é o ácido aminobenzóico (grupo fluorescente), Dnp é o 2,4 dinitrofenol (grupo apagador - supressor de fluorescência) e FRK são os aminoácidos fenilalanina, arginina e lisina, respectivamente. A ECA-1 hidrolisa o substrato, dissociando o grupo apagador com dois aminoácidos (R e K), do grupo fluorescente com o aminoácido (F) remanescente, responsável pela emissão da fluorescência detectada em 420 nm (Fig. 2).

A determinação da atividade enzimática da ECA-1 plasmática foi realizada em microplacas de 96 poços, adicionando-se 2 μL de plasma em 278 μL de tampão de reação. Após incubação a 37ºC por 10 minutos, foram adicionados 4 μM (20 μL) de Abz-FRK(Dnp)P-OH diluído em DMSO, dando início à reação no volume final de 300 μL por poço. A fluorescência foi monitorada de forma contínua em espectrofluorímetro SPECTRAMAX M2 (Molecular Devices, USA) ajustado para λ_{ex} = 320 nm e λ_{em} = 420 nm, a 37ºC sob agitação constante, resultando em uma curva de fluorescência *vs* tempo de incubação. Nos ensaios com inibidores, a enzima foi pré-incubada a 37ºC durante 10 min e com diferentes concentrações da fração purificada (FBut) ou dos compostos isolados da *C. glazioui,* antes da adição do substrato. Os efeitos foram comparados aos do captopril (0,1 a 10 nM).

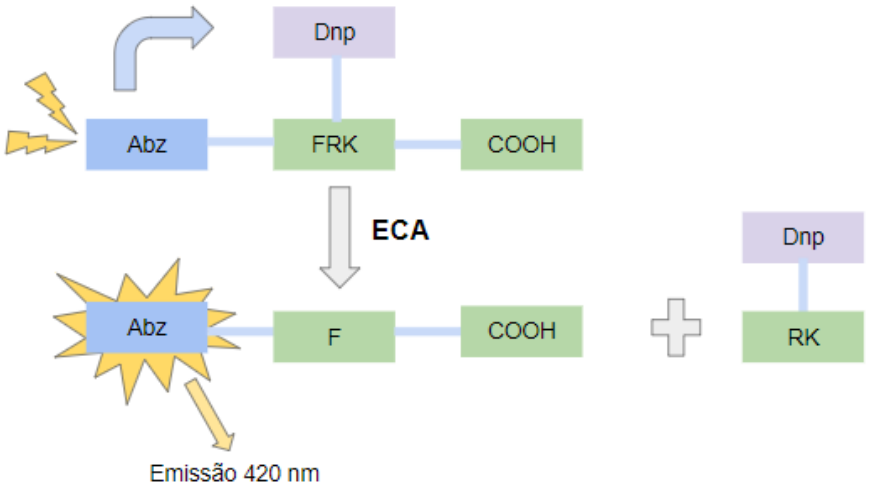


Figura 2: Esquema de hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)OH onde Abz é o grupo fluorescente, o Dnp é o grupo apagador incorporado ao grupo de aminoácidos (FRK - fenilalanina, arginina e lisina, respectivamente) (adaptado de Carmona et al., 2006)

5.2.3. Ensaio da atividade enzimática da ECA-2 de mamífero

Para esse ensaio, o método da fluorescência apagada foi adaptado de Sriramula et al. (2017), utilizando o substrato Mca-APK(Dnp) (AminoTech, Brasil) e comprimentos de onda de λ_{ex} = 320 nm e λ_{em} 405 nm. Nesse ensaio, foram adicionados 16 μL de plasma em 132 μL de tampão de reação. Após incubação a 37ºC por 10 min, 12 μL do substrato fluorogênico [30 μM] diluído em DMSO foram adicionados, dando início à reação no volume final de 160 μL por poço. Nos ensaios com inibidores, a enzima foi pré-incubada com os compostos a 37ºC durante 10 min antes da adição do substrato. Os efeitos foram comparados aos do inibidor padrão DX600 (AminoTech, Brasil), seletivo para a ECA-2.

5.3. Dosagem da atividade enzimática da ECA-1 e ECA-2 de insetos

5.3.1. Preparação da enzima de mosquitos

Para a preparação das enzimas de mosquitos, foi utilizado o método descrito por Abu Hasan et al. (2017) . Primeiramente, as larvas (n=150 e 300, 3º ínstar) foram lavadas (5x) com água destilada em tubo Falcon por movimentos de inversão suave do tubo. Os homogenatos foram preparados utilizando homogeneizador de vidro, contendo 5 mL de tampão Tris-HCl (pH 7,0), fazendo movimentos para cima e para baixo com o pistilo. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas durante 1 h a 55.000*g* a 4ºC e estocadas a -20° C.

5.3.2. Ensaio da atividade enzimática das ECAs de insetos

Para estes ensaios, o protocolo foi o mesmo descrito para avaliar as ECAs de mamíferos (Carmona et al., 2006; Sriramula et al., 2017).

5.4. Prova de conceito da atividade inseticida

O ciclo de vida do *Aedes aegypti* se divide em três estágios: larval (subdividido em L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto. Para esta prova, também foi utilizado o protocolo adaptado de Abu Hasan et al. (2017). Este teste foi realizado em placas transparentes de 24 poços, expondo as larvas (ínstares L1 a L4) de *Aedes aegypti* da linhagem Rockfeller à Fbut (0.3-30 mg/mL) ou flavonóides (0.03-0.3 mg/mL), sendo eles a orientina, a isoorientina e a isovitexina. As placas foram mantidas a 29ºC com comida (TetraMin®) disponível durante todo o ensaio.

A letalidade foi registrada após 24, 48 e 72h, comparativamente ao grupo controle (água destilada). O captopril 0.5-5.0 mM foi usado como controle positivo e o desenvolvimento das larvas até o estágio de pupa foi avaliado por 2 semanas.

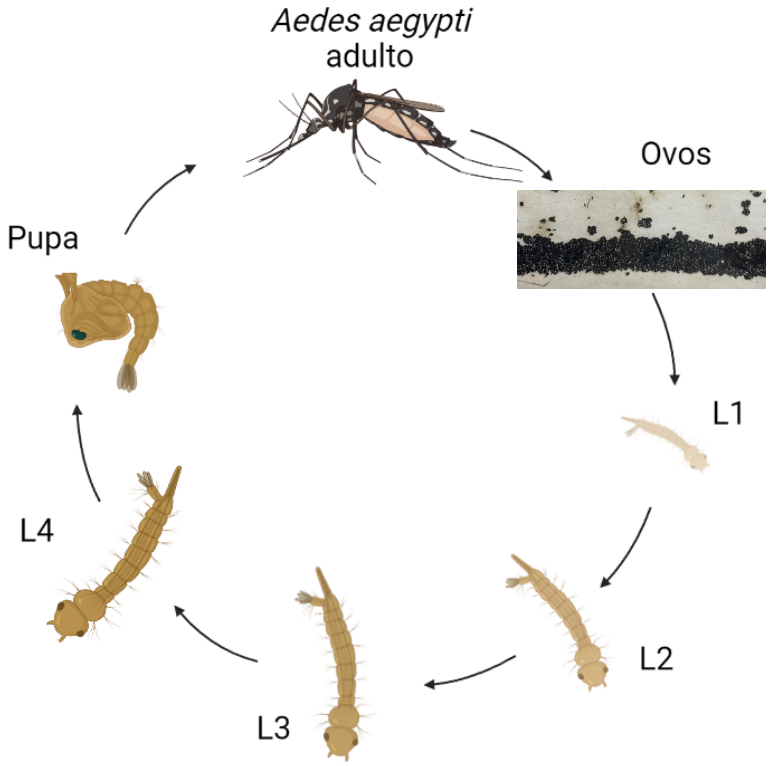


Figura 3: Ciclo de vida do *Aedes aegypti*
Fonte: Autora (2022), criado com Biorender.com

5.5. Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias ± erros padrão das médias e analisados utilizando-se o *software* GraphPad Prism®. A significância estatística relativamente ao controle foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida de teste pós-ensaio de Dunnett ou Tukey para as comparações múltiplas a nível de significância de 5%.

6. Resultados

6.1. Padronização do ensaio para determinação da atividade enzimática no plasma

6.1.1. Atividade da ECA-1

A atividade da ECA-1 no plasma de rato foi determinada pela incubação do "Abz" [Abz-FRK(Dnp)P-OH], descrito como substrato específico para essa enzima (Carmona et al., 2006) e com a ação do Captopril descrito como inibidor específico da ECA-1 de mamíferos (Ondetti et al., 1977).

Com a ECA contida em 2 µL de plasma e volume total de 300 µL de reação, as velocidades de desenvolvimento de fluorescência com as concentrações de Abz 4, 8 e 16 µM foram iguais e constantes até 20 min na presença da concentração menor (4 µM) e mantidas constantes pelo menos até 30 min de incubação com as concentrações 8 e 16 uM de substrato (Fig. 4). Estes resultados permitiram otimizar as experiências mantendo-se a proporcionalidade dos parâmetros: 2 µL de plasma / 4 µM de Abz / 300 µL de volume final e 15 min de reação.

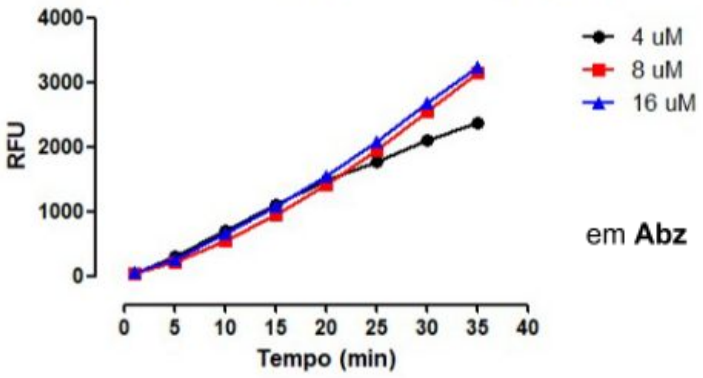


Figura 4: Influência da concentração do Abz-FRK(Dnp)P-OH na fluorescência emitida pela hidrólise do substrato pela ECA-1. A fluorescência foi medida em unidades arbitrárias de fluorescência (RFU), com excitação a λ_{ex} 320 nm e emissão a λ_{em} 420 nm a 37ºC. Notar que na concentração de 4 µM de substrato, 2 µL de plasma e 300 µL de volume final, a velocidade máxima de hidrólise do substrato foi constante até os 20 minutos de reação. Os pontos representam a média dos valores de fluorescência obtidos em triplicata.

O captopril (10^{-9} a 10^{-8} M), incubado 10 min antes do substrato Abz inibiu de 15 a 80% o desenvolvimento de fluorescência induzida pela enzima do plasma. Nesse intervalo de concentrações, o efeito do captopril foi proporcional à concentração. Os parâmetros da reta obtida com a regressão não-linear das % de

inibição da atividade enzimática foram: R2=0,97; slope 66,0±3,9; IC50 calculada de 3,3x10 $^{-9}$ M (3,3 nM) (Fig. 5 A - detalhe).

Esses parâmetros não foram possíveis de serem calculados para a ECA-2, uma vez que o captopril não teve um efeito inibidor (Fig. 5B)

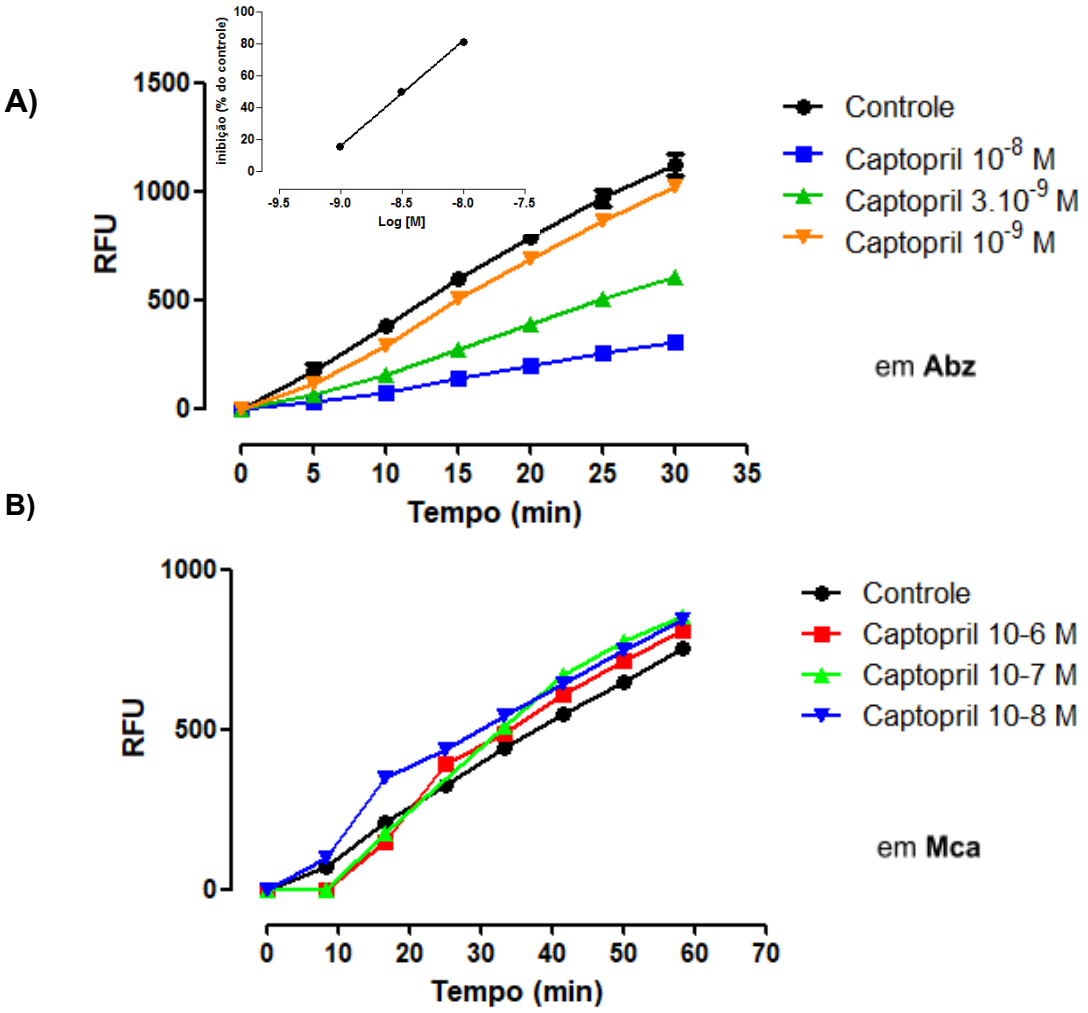
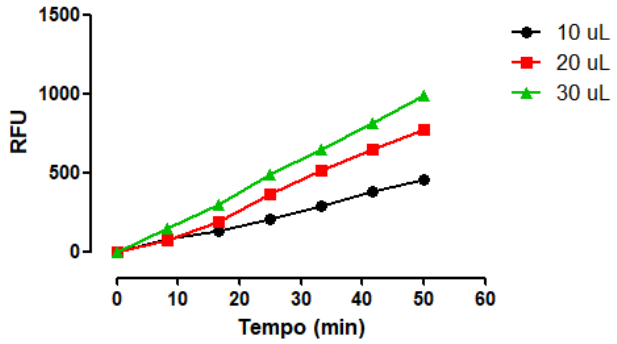


Figura 5:
A) Efeito do captopril na atividade da enzima conversora da angiotensina do plasma de rato após incubação com Abz-FRK(Dnp)P-OH. A fluorescência com a hidrólise do Abz foi medida em unidades arbitrárias de fluorescência (RFU), com excitação a λ ex 320 nm e emissão a λ em 420 nm a 37ºC. O plasma foi incubado com captopril (10 $^{-8}$ a 10 $^{-9}$ M) por 10 minutos antes da adição do substrato Abz (4 µM). *Detalhe*: regressão não-linear da inibição da atividade da ECA-1 plasmática pelo captopril (10 $^{-8}$ a 10 $^{-9}$ M) em percentagem da atividade controle da enzima (fluorescência aos 15 min = 100%). Os pontos representam a média dos dados obtidos em triplicata (n=2).
B) Efeito do captopril (10^{-8} a 10^{-6} M) na atividade da ECA-2 plasmática. Fluorescência emitida após hidrólise do Mca-APK(Dnp) (30 µM) pela ECA-2 do plasma de rato, a 37ºC. Notar que o captopril não inibiu a ECA-2 em concentrações capazes de bloquear a ECA-1. Os pontos representam a média dos dados obtidos em triplicata.

6.1.2. Caracterização da atividade da ECA-2 do plasma de rato

A atividade da ECA-2 do plasma de rato foi determinada com incubação do "Mca" [Mca-APK(Dnp)], descrito como substrato específico para essa enzima (Sriramula et al., 2017). Na padronização da atividade, foram utilizados três volumes de plasma (10, 20 e 30 µL) e 3 concentrações do substrato (3, 10 e 30 µM). Comparativamente à ECA-1, a atividade da ECA-2 foi baixa e lenta, exigindo maiores quantidades de enzima (plasma) (Fig.6 A) e maiores concentrações de substrato nas dosagens (Fig.6 B). Os parâmetros utilizados nos testes definitivos foram: 16 µL de plasma / 30 µM de Mca-APK(Dnp) / 160 µL de volume final da reação por poço.

A) plasma



B) substrato

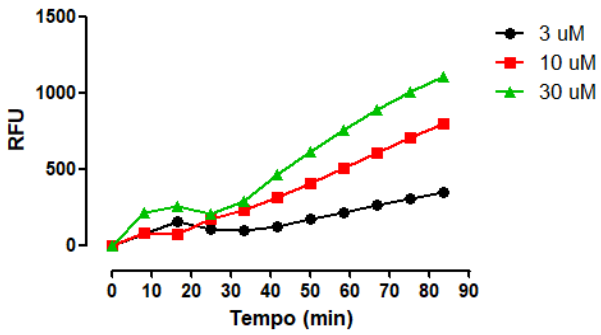


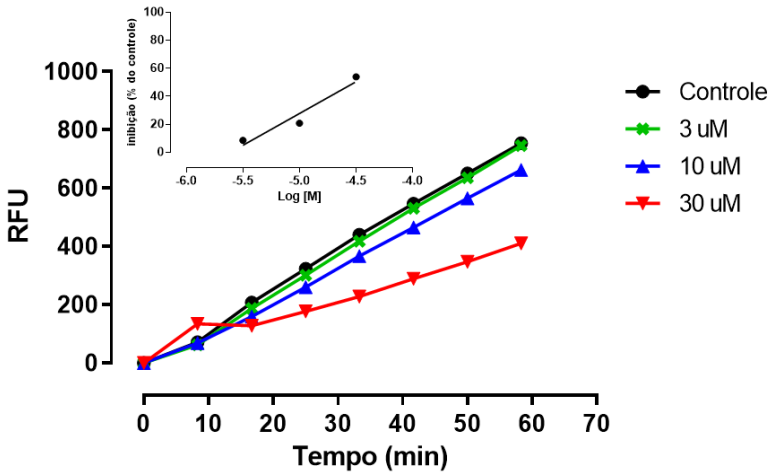
Figura 6:
A) Influência da concentração enzimática (volume de plasma) na fluorescência emitida pela hidrólise do Mca-APK(Dnp) pela ECA-2. O Mca-APK(Dnp (10 µM) foi incubado com diferentes volumes (10, 20 e 30 µL) de plasma de rato, a 37ºC, registrando-se continuamente a fluorescência emitida com λ_{ex} = 320 nm e λ_{em} = 405 nm. Notar a baixa fluorescência e a baixa velocidade de hidrólise do substrato, pouco modificadas com maiores concentrações de enzima. Os pontos são médias de triplicata.
B) Influência da concentração do Mca-APK(Dnp) na fluorescência emitida pela hidrólise do substrato pela ECA-2. O Mca (3, 10 e 30 µM) foi incubado com plasma de rato a 37ºC, registrando-se continuamente a fluorescência emitida com λ_{ex} = 320 nm e λ_{em} = 405 nm.. Notar a diferente cinética de hidrólise do substrato nas maiores concentrações. Os pontos representam a média dos valores de fluorescência obtidos em triplicata.

O DX600, descrito como inibidor seletivo da ECA-2 (Huang et al., 2003) , foi utilizado como controle positivo. A inibição da hidrólise do Mca-APK(Dnp) produzida por diferentes concentrações do DX600 (3 a 30 uM) está representada na figura 7. O efeito do DX600 foi proporcional à concentração, Os parâmetros da reta obtida com

a regressão não-linear das % de inibição da atividade enzimática foram: R2=0,93; slope 45,4 ± 6,4; com IC_{50} calculada de 3,1 x 10^{-5} M (31 µM) (Fig. 7A - detalhe).

Comparativamente, a figura 7B mostra o efeito do DX600 na atividade da ECA-1

A)



B)

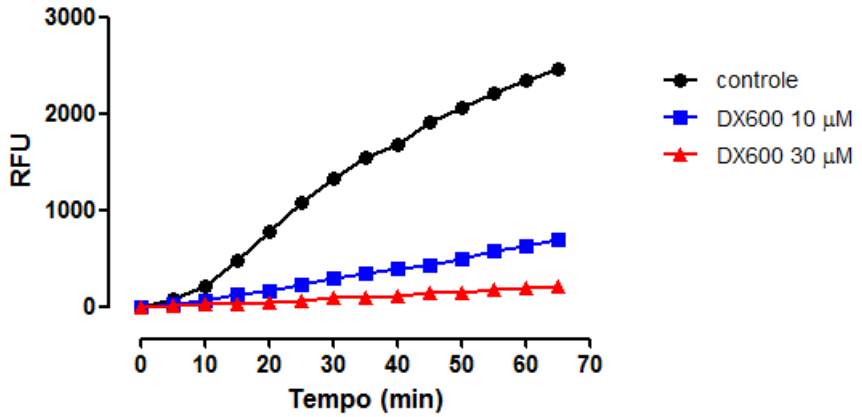


Figura 7:
A) Efeito do DX600 na atividade da ECA-2 do plasma de rato. O plasma de rato foi incubado com DX600 (3 a 30 µM) por 10 minutos antes da adição do substrato Mca-APK(Dnp) (30 µM). *Detalhe:* Regressão não-linear da inibição da atividade da ECA-2 plasmática pelo DX600 (3.10^{-5} a 3.10^{-4} M)
B) Efeito do DX600 (3 a 30 µM) na atividade da ECA-1 do plasma de rato. Fluorescência emitida após hidrólise do Abz-FRK(Dnp)P-OH (4 µM) pela ECA-1 do plasma de rato, a 37ºC. Notar a inibição da ECA-1 pelo DX600, em concentrações quase mil vezes maiores que a do captopril, mas necessárias para inibir a atividade da ECA-2.
Os pontos representam a média dos dados obtidos em triplicata.

6.2. Avaliação do efeito da Fbut e dos compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-1 plasmática

6.2.1. Efeito da Fbut na atividade da ECA-1 em plasma de rato

A fração butanólica (Fbut) da *C. glazioui* foi testada em diferentes concentrações (10^{-5} a 3.10^{-4} g/mL). Os resultados mostraram que a Fbut inibiu a atividade da ECA-1 de maneira concentração-dependente nos 15 minutos de reação. Os parâmetros da reta obtida com a regressão não-linear das % de inibição da atividade enzimática com a Fbut foram: R2=0,90; slope 50,3±4,0. A IC_{50} calculada para a Fbut foi de $4,6.10^{-5}$ g/mL.

A Figura 8 compara os efeitos inibidores da Fbut (10^{-5} a 3.10^{-4} g/mL) e do Captopril ($2,2.10^{-10}$ a $2,2.10^{-9}$ g/mL) na atividade da ECA-1 em plasma de rato com substrato Abz-FRK(Dnp-OH) (4 μM). Os parâmetros da reta obtida com a regressão não-linear das % de inibição da atividade enzimática com o Captopril foram: R2=0,97; slope 45,4± 6,4 e a IC_{50} calculada $7,2.10^{-10}$ g/mL.

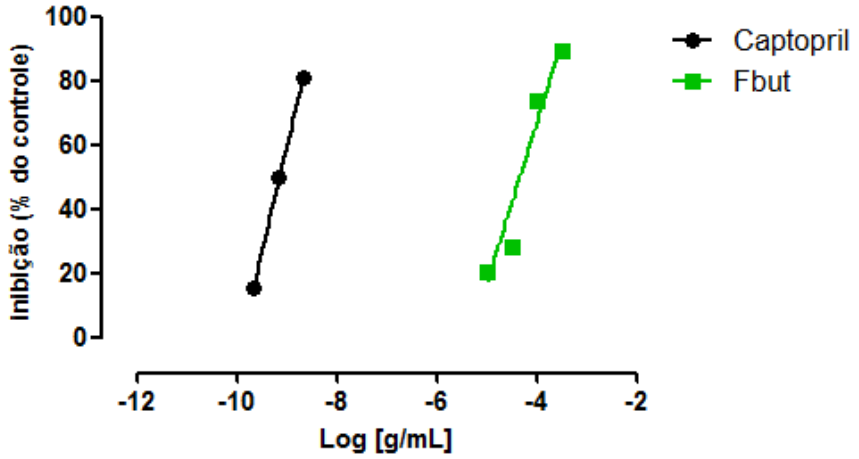


Figura 8: Efeito da Fbut (10^{-5} a 3.10^{-4} g/mL) da *C. glazioui* e do Captopril ($2,2.10^{-10}$ a $2,2.10^{-9}$ g/mL) na atividade da ECA-1 do plasma de rato. O plasma foi incubado com 4 μM de Abz-FRK(Dnp)P-OH. Os dados foram expressos em percentagem, relativamente à atividade controle da enzima (100%). Os pontos representam dados obtidos em triplicata aos 15 min de reação (n=3). Notar que nesta figura as concentrações de captopril estão expressas em g/mL.

6.2.2. Efeitos dos compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-1 em plasma de rato

Após os testes com a Fbut da *C. glazioui,* foram testados os 10 compostos majoritários isolados com a purificação da Fbut. Em ordem decrescente de polaridade foram identificados: ácido clorogênico, procianidina B5, procianidina B3, catequina, procianidina B2, epicatequina, procianidina C1, orientina, isoorientina e isovitexina. Os resultados estão representados na Fig. 9.

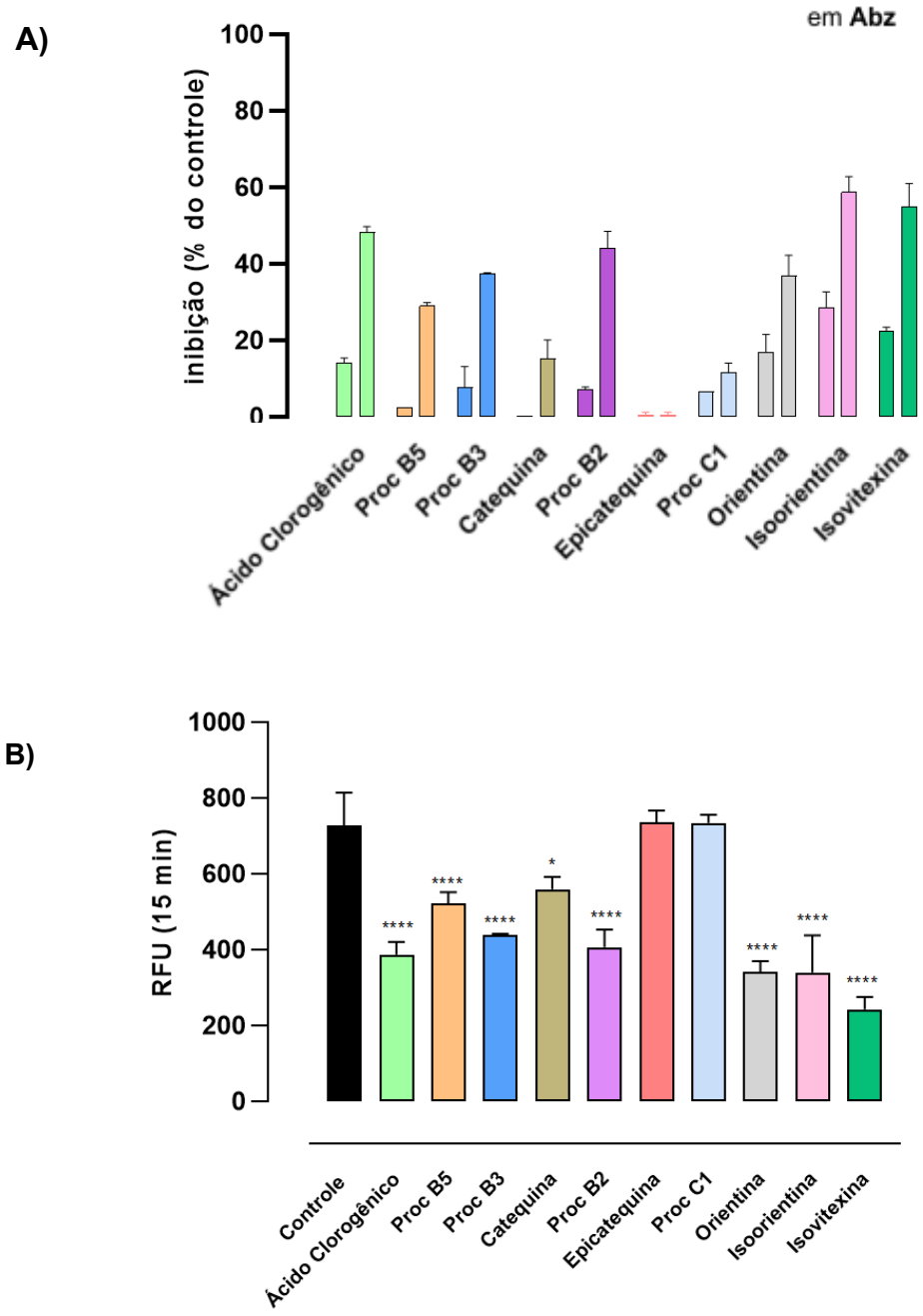


Figura 9:

A) Efeito dos compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-1 do plasma de rato. Percentagem de inibição produzida pelo ácido clorogênico, procianidinas, epicatequina, catequina e flavonóides da *C. glazioui* (30 e 100 μM) na atividade enzimática do plasma de rato incubado com 4 μM de Abz-FRK(Dnp)P-OH. A percentagem de inibição foi calculada relativamente à fluorescência máxima (100%) produzida pela enzima em condições controle e medida aos 15 min de reação. As barras representam as médias e os desvios padrão dos dados obtidos em duplicata (n=3).

B) Efeito dos compostos isolados da *C. glazioui* na fluorescência induzida pela hidrólise do Abz pela ECA-1 do plasma de rato. O plasma de rato foi incubado com 4 μM de Abz-FRK(Dnp)P-OH na presença de ácido clorogênico, procianidinas, epicatequina,

catequina e flavonóides (100 μM) e a fluorescência medida em relação ao controle (n=100) aos 15 min de reação.. As barras representam os valores obtidos em duplicata (n=3). Diferenças estatísticas determinadas por one-way Anova seguida pelo teste de Dunnet, sendo * p<0.05 / ** p<0.005 / *** p<0.001 / ****p<0.0001

6.3. Avaliação do efeito da FBut e dos compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-2 plasmática

6.3.1. Efeito da Fbut na atividade da ECA-2 de plasma de rato

A Fbut da *C. glazioui* inibiu a atividade da ECA-2 do plasma de rato de maneira concentração-dependente no intervalo de 3.10^{-5} a 10^{-3} g/mL (Fig. 10). Os parâmetros da reta obtida com a regressão não-linear das % de inibição da atividade enzimática com a Fbut foram: R2=0,97; slope 51,0 ± 2,5 e a IC_{50} calculada $2,0.10^{-4}$ g/mL. Comparativamente, a regressão não-linear da inibição da atividade enzimática com o DX600 foram : R2=0,91; slope 45.0 ± 7.0 e a IC_{50} calculada $9,3.10^{-5}$ g/mL

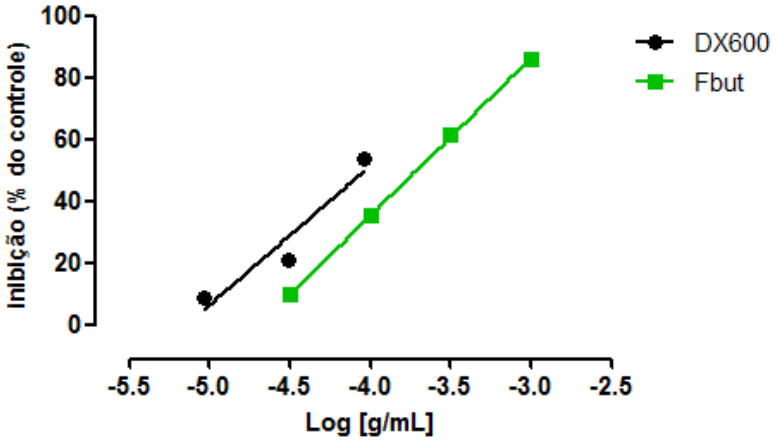


Figura 10: Efeitos da Fbut da *C. glazioui* (3.10^{-5} a 10^{-3} g/mL) e do DX600 ($9,2.10^{-6}$ a $9,2.10^{-5}$ g/mL) na atividade da ECA-2 do plasma de rato. O plasma foi incubado com 30 μM de Mca-APK(Dnp). Os dados foram expressos em percentagem, relativamente à atividade controle da enzima (100%) aos 15 min de reação. Os pontos representam dados obtidos em triplicata (n=3). Notar que nesta figura as concentrações de DX600 estão expressas em g/mL

6.3.2. Comparação dos efeitos inibitórios da Fbut nas atividades das ECA-1 e ECA-2 do plasma de rato

A Fbut da *C. glazioui* inibiu a atividade da ECA-1 e ECA-2 do plasma de rato de maneira concentração-dependente no intervalo de 10^{-5} a 3.10^{-4} g/mL e 3.10^{-5} a 10^{-3} g/mL, respectivamente (Fig. 10). Os parâmetros da reta obtida com a regressão não-linear das % de inibição da atividade enzimática com a Fbut para ECA-1 foram: R2=0,90; slope 50.3 ± 4.0 e a IC_{50} calculada $4,6.10^{-5}$ g/mL. Já para a ECA-2, os parâmetros calculados foram R2=0,97; slope 51.0 ± 2.5 e a IC_{50} calculada $2,0.10^{-4}$ g/mL.

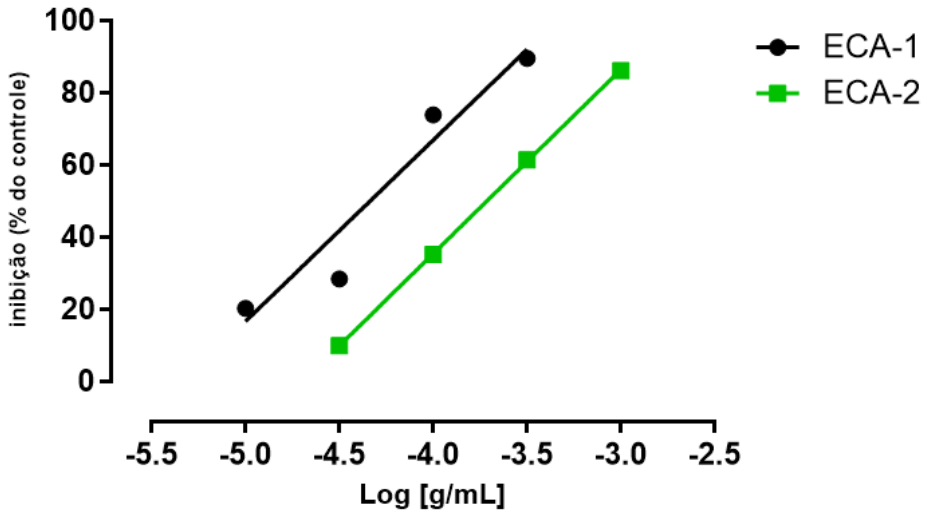
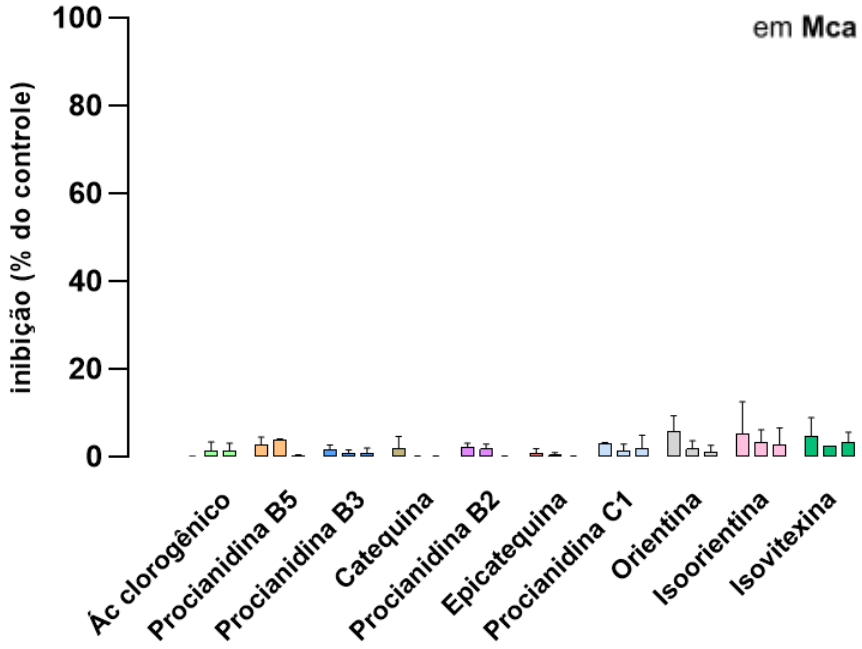


Figura 11: Comparação do efeito da Fbut da *C. glazioui* (10^{-5} a 10^{-3} g/mL) nas atividades da ECA-1 e da ECA-2 plasmática. Os dados foram expressos em percentagem relativamente à atividade controle da enzima (100%) aos 15 min de reação. Os pontos representam dados obtidos em triplicata (n=3)

6.3.3. Efeitos dos Compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-2 em plasma de rato

Os compostos isolados da Fbut de *C. glazioui* não inibiram significativamente a atividade da ECA-2 do plasma de ratos até a concentração de 10 μM (Fig. 11).

A)



B)

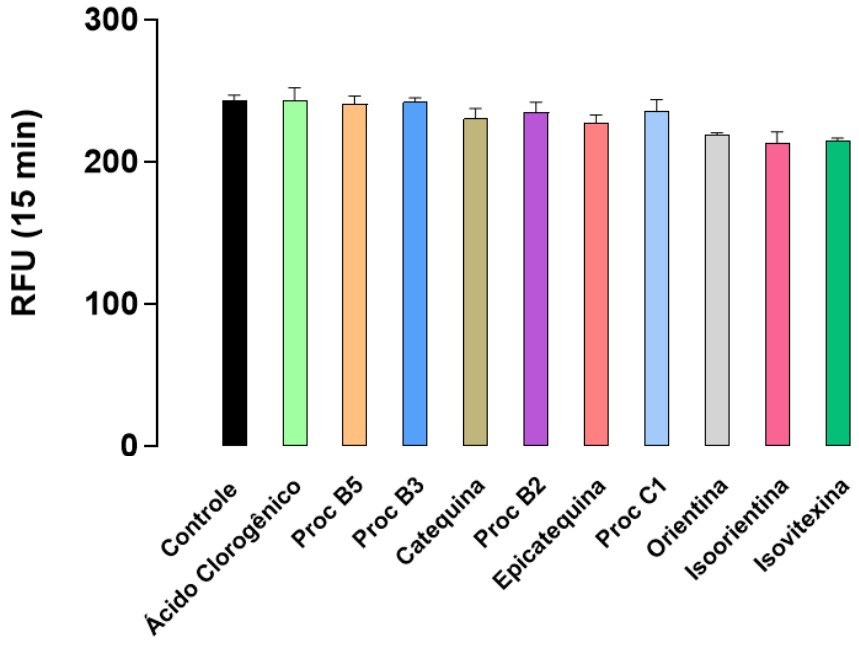


Figura 12:
A) Efeito dos compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-2 do plasma de rato. Percentagem de inibição produzida pelo ácido clorogênico, procianidinas, epicatequina, catequina e flavonóides da *C. glazioui* (0,1, 1 e 10 μM) na atividade enzimática do plasma de rato incubado com 30 μM de Mca-APK(Dnp). A percentagem de inibição foi calculada relativamente à fluorescência máxima (100%) produzida pela enzima

em condições controle aos 15 min de reação. As barras representam os valores obtidos em triplicata (n=3).

B) Efeito dos compostos isolados da *C. glazioui* na fluorescência induzida pela hidrólise do Mca-APK(Dnp) pela ECA-2 plasmática. O plasma de rato foi incubado com 30 µM de Mca-APK(Dnp) na presença de ácido clorogênico, procianidinas, epicatequina, catequina e flavonóides (10 µM) e a fluorescência medida em relação ao controle (n=10) aos 15 min de reação. As barras representam os valores obtidos em duplicata (n=3). Diferenças estatísticas determinadas por one-way Anova seguida pelo teste de Dunnet. Não houve redução significativa da fluorescência na presença dos compostos.

6.4. Avaliação do efeito da Fbut e dos compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-1 de homogenato de larvas de *A. aegypti*

A atividade da ECA-1 de homogenato de larvas foi determinada com a incubação do Abz-FRK(Dnp)P-OH. Foi possível notar que o padrão de fluorescência diferiu do observado em mamífero, porque uma cinética inicial rápida de desenvolvimento de fluorescência atingiu um platô máximo em 5 min, estável e duradouro, não relacionado ao esgotamento de substrato. (Fig 13).

Na padronização dessa atividade enzimática para avaliação dos inibidores foram testados diferentes volumes (5 a 50 µL) do homogenato de larvas preparado com 300 larvas/5 mL de tampão e concentrações crescentes de substrato variando de 2 a 8 µM. Os parâmetros de reação utilizados nos testes definitivos foram: 10 µL de homogenato / 4 µM de Abz-FRK(Dnp)P-OH / 160 µL de volume final/poço.

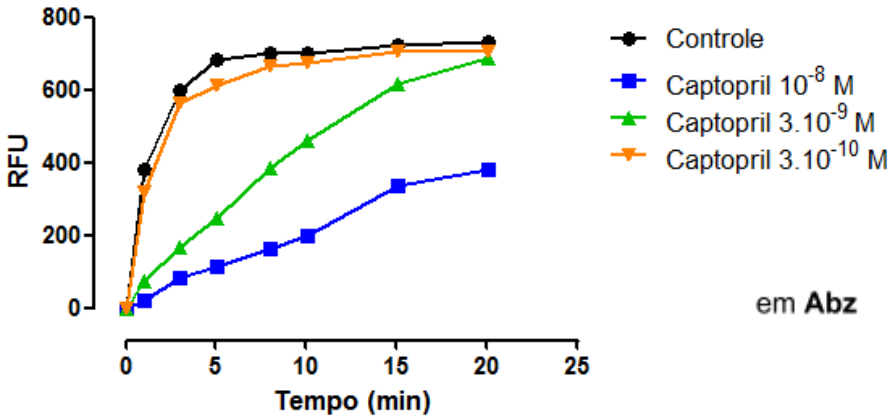


Figura 13: Efeito do captopril na atividade da ECA-1 do homogenato de larvas. O homogenato foi incubado com captopril (3.10^{-10} a 10^{-8} M) por 10 minutos antes da adição do substrato de Abz-FRK(Dnp)P-OH (4 µM). As experiências foram em triplicata (n=2)

6.4.1. Efeito da Fbut da *C. glazioui* na atividade da ECA-1 em homogenato de larva

A incubação da Fbut da *C. glazioui* inibiu a atividade da ECA-1 do homogenato de larvas de maneira concentração-dependente no intervalo de 3.10^{-5} a 10^{-3} g/mL. Os parâmetros da reta obtida com a regressão não-linear das % de inibição da atividade enzimática com a Fbut para ECA-1 foram: R2=0,97; slope 54.6 ± 3.9 e a IC_{50} calculada $2,1.10^{-4}$ g/mL. Já o captopril também inibiu a atividade da ECA-1 de homogenato de larvas nas concentrações $6,9.10^{-10}$ a $2,2.10^{-8}$ g/mL e os parâmetros calculados foram R2=1,0; slope 49.5 ± 2.8 e a IC_{50} calculada $2,1.10^{-4}$ g/mL. (Fig. 14)

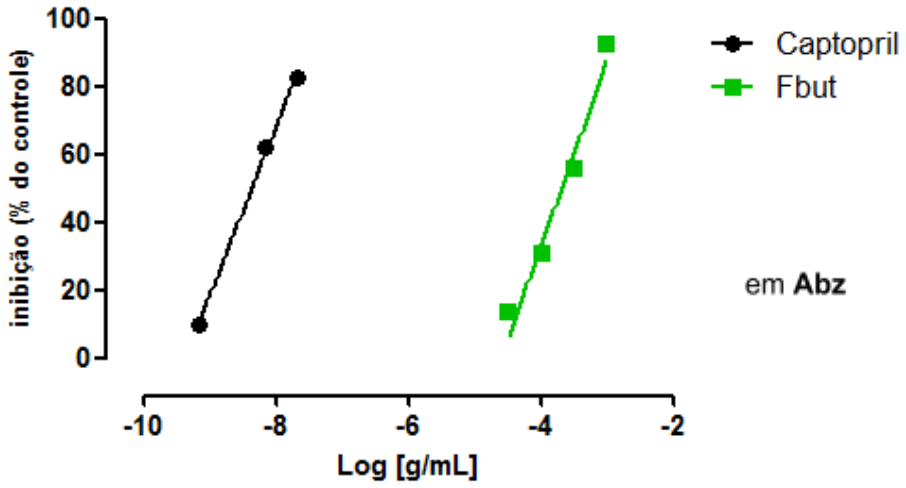


Figura 14: Efeito da Fbut da *C. glazioui* (3.10^{-5} a 10^{-3} g/mL) e do Captopril ($6,9.10^{-10}$ a $2,2.10^{-8}$ g/mL) na atividade da ECA-1 do homogenato de larvas. O homogenato de larvas foi incubado com 4 µM de Abz-FRK(Dnp)P-OH. Os dados foram expressos em percentagem, relativa à atividade controle da enzima (100%) aos 5 min de reação. Os pontos representam as médias dos dados obtidos em triplicata . (n=3)

6.5. Avaliação do efeito da Fbut e dos compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-2 de homogenato de larvas de *A. aegypti*

A atividade da ECA-2 de homogenato de larvas foi determinada com a incubação do Mca-APK(Dnp), descrito como substrato específico para essa enzima.

Para padronizar a dosagem utilizando a ECA-2, foram realizados testes com diferentes volumes de homogenato de larvas. Nas experiências subsequentes, a

concentração do Mca-APK(Dnp) foi de 12,5 μM e o volume de homogenato foi de 10 μL. O volume final da reação foi de 160 μL por poço (Fig. 15).

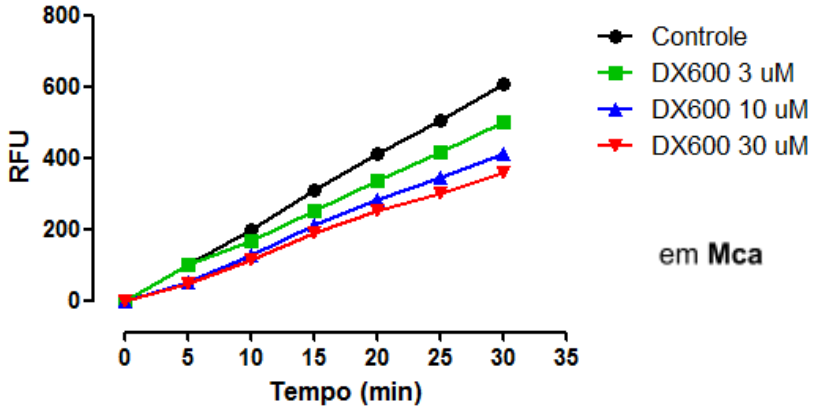


Figura 15: Efeito do DX600 na atividade da ECA-2 do homogenato de larvas. O homogenato foi incubado com DX600 (3 a 30 μM) por 10 minutos antes da adição do substrato de Mca-APK(Dnp) (12,5 μM). As experiências foram em triplicata (n=2)

6.5.1. Efeito da Fbut da *C. glazioui* na atividade da ECA-2 em homogenato de larva

A Fbut da *C. glazioui* inibiu a atividade da ECA-2 do homogenato de larvas de maneira concentração-dependente no intervalo de 3.10^{-5} a 10^{-3} g/mL (Fig. 16). Os parâmetros da reta obtida com a regressão não linear das % de inibição da atividade enzimática com a Fbut para ECA-2 foram: R2=0,96; slope 53.7 ± 3.2 e a IC50 calculada $1,1.10^{-4}$ g/mL. O DX600 também inibiu a atividade da ECA-2, porém de forma menos intensa. Os parâmetros calculados da regressão foram: R2=0,90; slope 24.66 ± 3.0 e a IC_{50} calculada $1,8.10^{-4}$ g/mL.

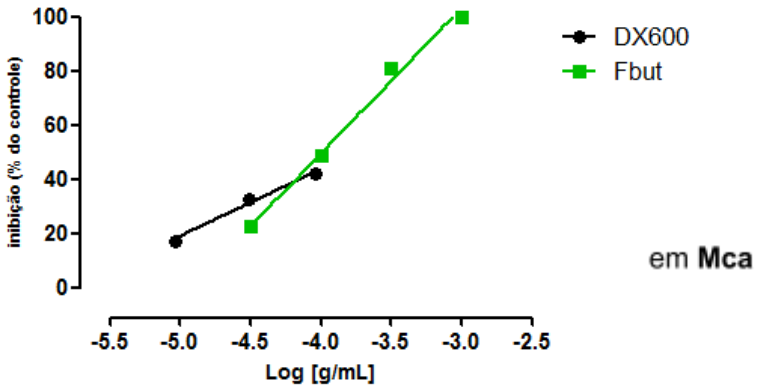


Figura 16: Efeito da Fbut de *C. glazioui* e do DX600 na atividade das ECA-2 de homogenato de larvas. Percentagem de inibição produzida pela Fbut da *C. glazioui* (3.10^{-5}

a 10^{-3} g/mL) e DX600 ($9{,}2.10^{-6}$ a $9{,}2.10^{-5}$ g/mL) na atividade enzimática da ECA-2 do homogenato de larvas, relativamente à atividade controle da enzima (100%) aos 10 min de reação. Os pontos representam a média dos dados obtidos em triplicata (n=3)

6.5.2. Comparação dos efeitos inibitórios da Fbut nas atividades das ECA-1 e ECA-2 do homogenato de larvas

A Fbut da *C. glazioui,* no intervalo de 3.10^{-5} a 10^{-3} μg/mL, inibiu a atividade da ECA-1 e ECA-2 do homogenato de larvas de maneira concentração-dependente (Fig. 17). Os parâmetros da reta obtida com a regressão não-linear das % de inibição da atividade enzimática com a Fbut para ECA-1 foram: R2=0,97; slope 54.6 ± 3.9 e a IC50 calculada $2{,}1.10^{-4}$ g/mL. Já para a ECA-2, os parâmetros calculados foram: R2=0,96; slope 53.7 ± 3.2 e a IC50 calculada $1{,}1.10^{-4}$ g/mL.

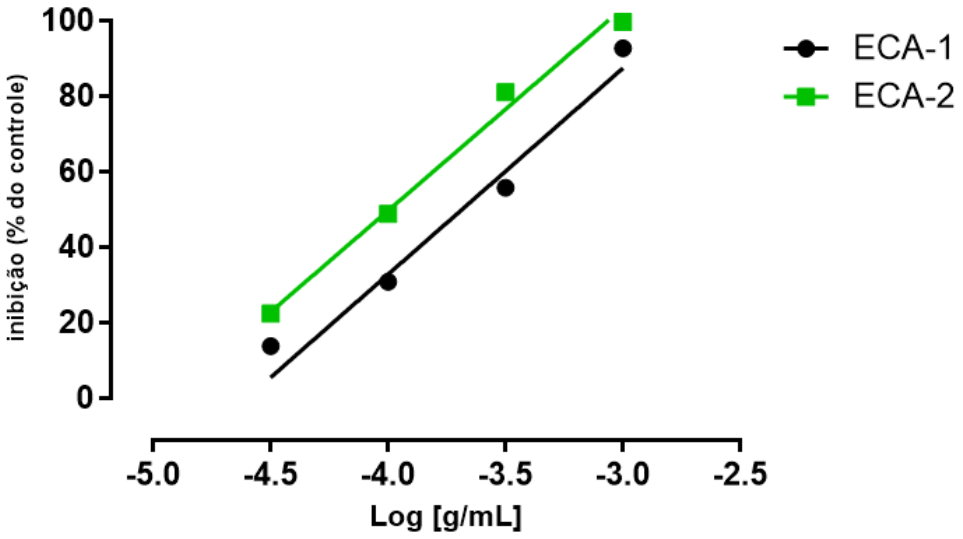


Figura 17: Efeito da Fbut da *C. glazioui* (3.10^{-5} a 10^{-3} μg/mL) nas atividades da ECA-1 e da ECA-2 do homogenato de larvas. Os dados foram expressos em percentagem relativamente à atividade controle da enzima (100%) aos 10 min de reação. Os pontos representam a média dos dados obtidos em duplicata (n=3)

6.5.3. Efeitos dos Compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-2 em homogenato de larva

A atividade dos compostos isolados (10 a 100 μM) da Fbut de *C. glazioui* também foi menor que a do extrato total, sendo que comparativamente ao DX600 as frações menos polares foram mais ativas mas ainda assim até 30% (Fig. 18).

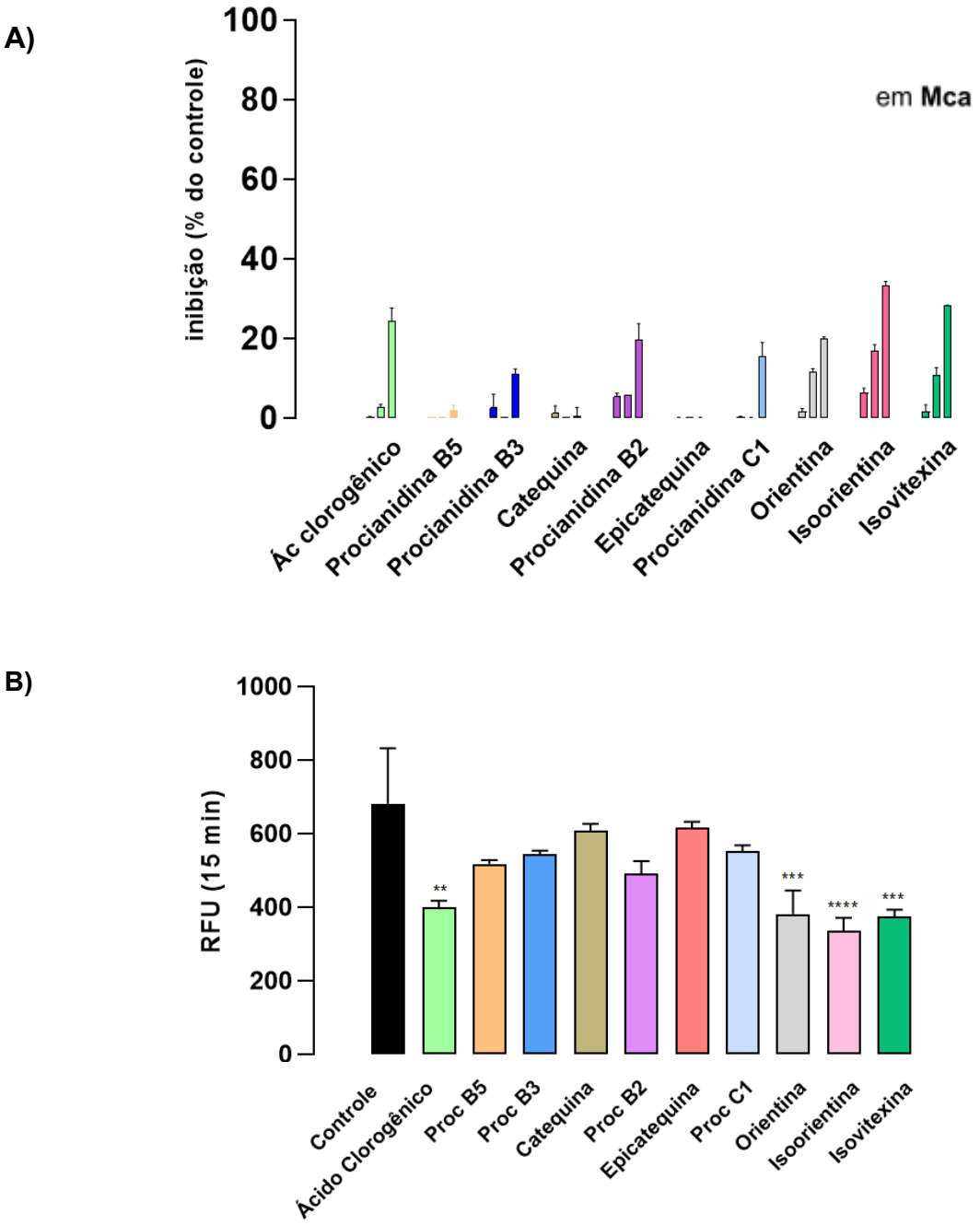


Figura 18:

A) Efeitos dos compostos isolados da *C. glazioui* na atividade da ECA-2 do homogenato de larvas. Percentagem de inibição produzida pelo ácido clorogênico, procianidinas, epicatequina, catequina e flavonóides da *C. glazioui* (10 a 100 µM) e na atividade enzimática do homogenato de larvas incubado com 12,5 µM de Mca-APK(Dnp). A percentagem de inibição foi calculada relativamente à atividade controle da enzima (100%) aos 15 min de reação. As colunas e barras representam as médias e os desvios padrão dos dados obtidos em duplicata (n=2).

B) Efeito dos compostos isolados da C. glazioui na fluorescência induzida pela hidrólise do Mca-APK(Dnp) pela ECA-2 do homogenato de larvas. O homogenato de larvas foi incubado com

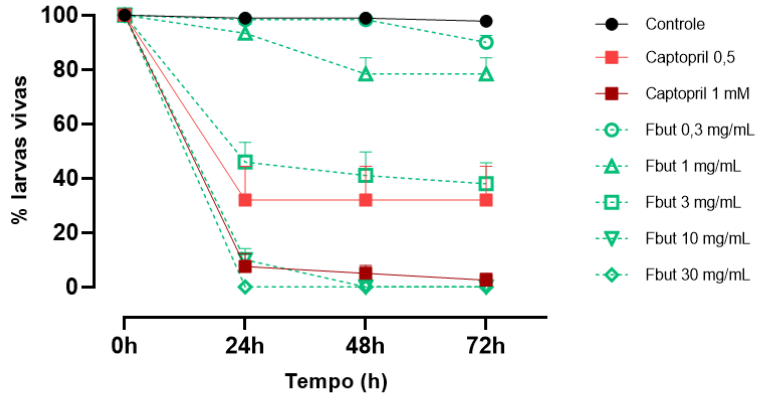
12,5 µM de Mca-APK(Dnp) na presença de ácido clorogênico, procianidinas, epicatequina, catequina e flavonóides da *C. glazioui* (100 µM) e a fluorescência medida em relação ao controle (n=10) aos 15 min de reação. As barras representam média dos valores obtidos em duplicata (n=2).
Diferenças estatísticas determinadas por one-way Anova seguida pelo teste de Dunnet, sendo * p<0.05 / ** p<0.005 / *** p<0.001 / ****p<0.0001

7. Prova de conceito *in vivo* da atividade inseticida da *C. glazioui*

7.1. Avaliação do efeito da Fbut de *C. glazioui* na letalidade das larvas de *A. aegypti*

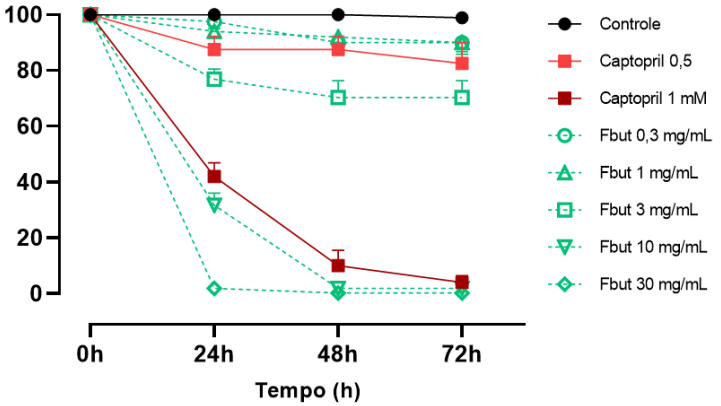
Para os ínstares L1 e L2, com 10 e 9 larvas por poço, respectivamente, a Fbut foi testada nas concentrações de 0,3 a 30 mg/mL e o captopril nas concentrações de 0,5 a 1 mM. Para os ínstares L3 e L4 foram utilizadas 6 larvas por poço, com diferentes concentrações da Fbut (1 a 30 mg/mL) ou com captopril (5 mM). Os resultados da sobrevivência das larvas L1 a L4 estão mostrados na Fig 19.

A) L1



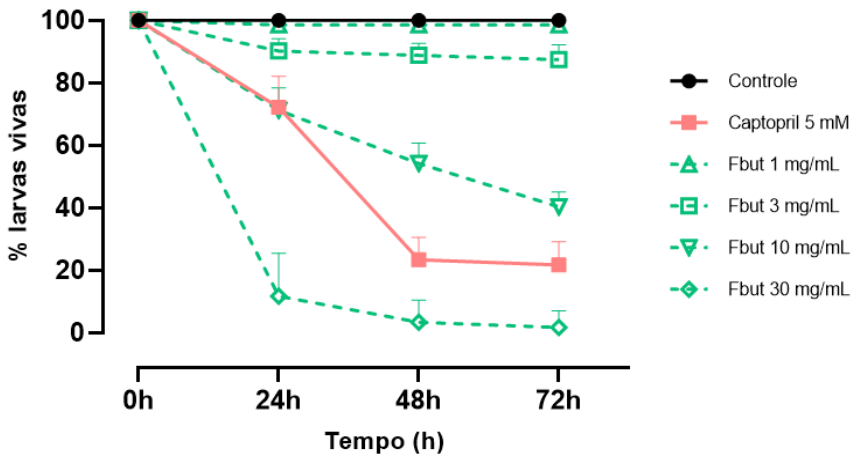
24 h: *captopril 0.5 mM; **captopril 1 mM; ***Fbut 3 e 10 mg/mL; ****Fbut 30 mg/mL
48 h: *captopril 0.5 mM; **Fbut 3 mg/mL; ***captopril 1 mM; ****Fbut 10 e 30 mg/mL
72 h: *captopril 0.5 mM; ***Fbut 3 mg/mL; ****captopril 1 mM, Fbut 10 e 30 mg/mL

B) L2



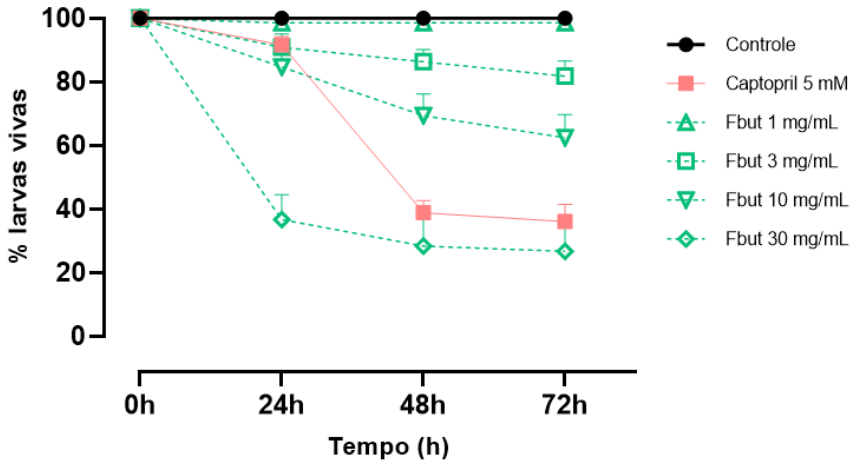
24h: ** captopril 1 mM e Fbut 3 mg/mL; ***Fbut 10 mg/mL; ****Fbut 30 mg/mL
48h: *Fbut 3 mg/mL; ***captopril 1 mM; ****Fbut 10 e 30 mg/mL
72h: *Fbut 3 mg/mL; ****captopril 1 mM, Fbut 10 e 30 mg/mL

C) L3



24h: *Fbut 10 mg/mL; ****Fbut 30 mg/mL
48h: ***Fbut 10 mg/mL; **** captopril 5 mM e Fbut 30 mg/mL
72h: ****captopril 5 mM, Fbut 10 mg/mL e 30 mg/mL

D) L4



24h: *Fbut 10 mg/mL; ****Fbut 30 mg/mL
48h: ***Fbut 10 mg/mL; **** captopril 5 mM e Fbut 30 mg/mL
72h: **** captopril 5 mM, Fbut 10 mg/mL e 30 mg/mL

Figura 19: Atividade larvicida da Fbut da *C. glazioui* (0,3 a 30 mg/mL) sobre as larvas de *A. aegypti* em **A)** estágio L1, **B)** em estágio L2, **C)** em estágio L3, **D)** em estágio L4, relativamente ao controle em água. A letalidade foi avaliada a cada 24h. Os pontos representam os dados obtidos da média de duas duplicatas (n=3) para L1 e L2 e da média de duas triplicatas (n=2) para L3 e L4.

Diferenças estatísticas determinadas por two-way Anova seguida pelo teste de Tukey, sendo * $p<0.05$ / ** $p<0.005$ / *** $p<0.001$ / ****$p<0.0001$

Tabela 1: Valores de DL50 calculados para os ínstares L1 a L4 após 24h de exposição à Fbut (0,3 a 30 mg/mL)

	DL50 (mg/mL)	Ls (mg/mL)	Li (mg/mL)
L1	3,2[a]	4	2,5
L2	6,3[a]	7,9	4
L3	13[a]	16	10
L4	32[b]	79	20

Legenda: Ls - limite superior / Li - limite inferior

Diferenças estatísticas determinadas por one-way Anova seguida pelo teste de Tukey, sendo *a* significativamente diferente de *b* (p<0.05)

A figura 20 demonstra os diferentes tamanhos das larvas L1 quando expostas à Fbut. Na imagem, é possível observar que a larva controle é maior e mais escura em relação às tratadas com o extrato da *C. glazioui.*

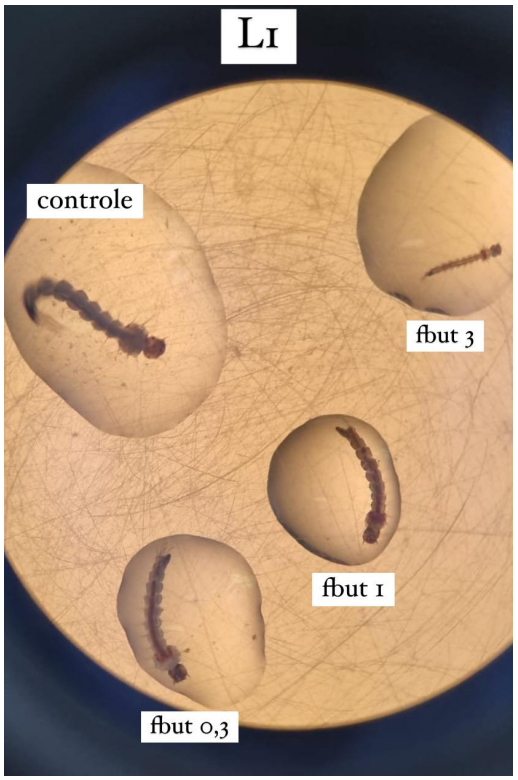


Figura 20: Comparação dos tamanhos das larvas de *A. aegypti* em ínstar L1 em condições controle e 72h após exposição à Fbut (0,3 - 3 mg/mL)

7.2. Avaliação do efeito dos flavonóides isolados da Fbut da *C. glazioui* sobre a letalidade das larvas de *A. aegypti*

Considerando que a atividade da Fbut foi maior nos estágios larvais L1 e L2, os flavonóides orientina, isoorientina e isovitexina (0,03 a 0,3 mg/mL) foram testados apenas nesses estágios. A figura 21 mostra os efeitos desses flavonóides na sobrevivência das larvas L1 e L2, que não foram significantes.

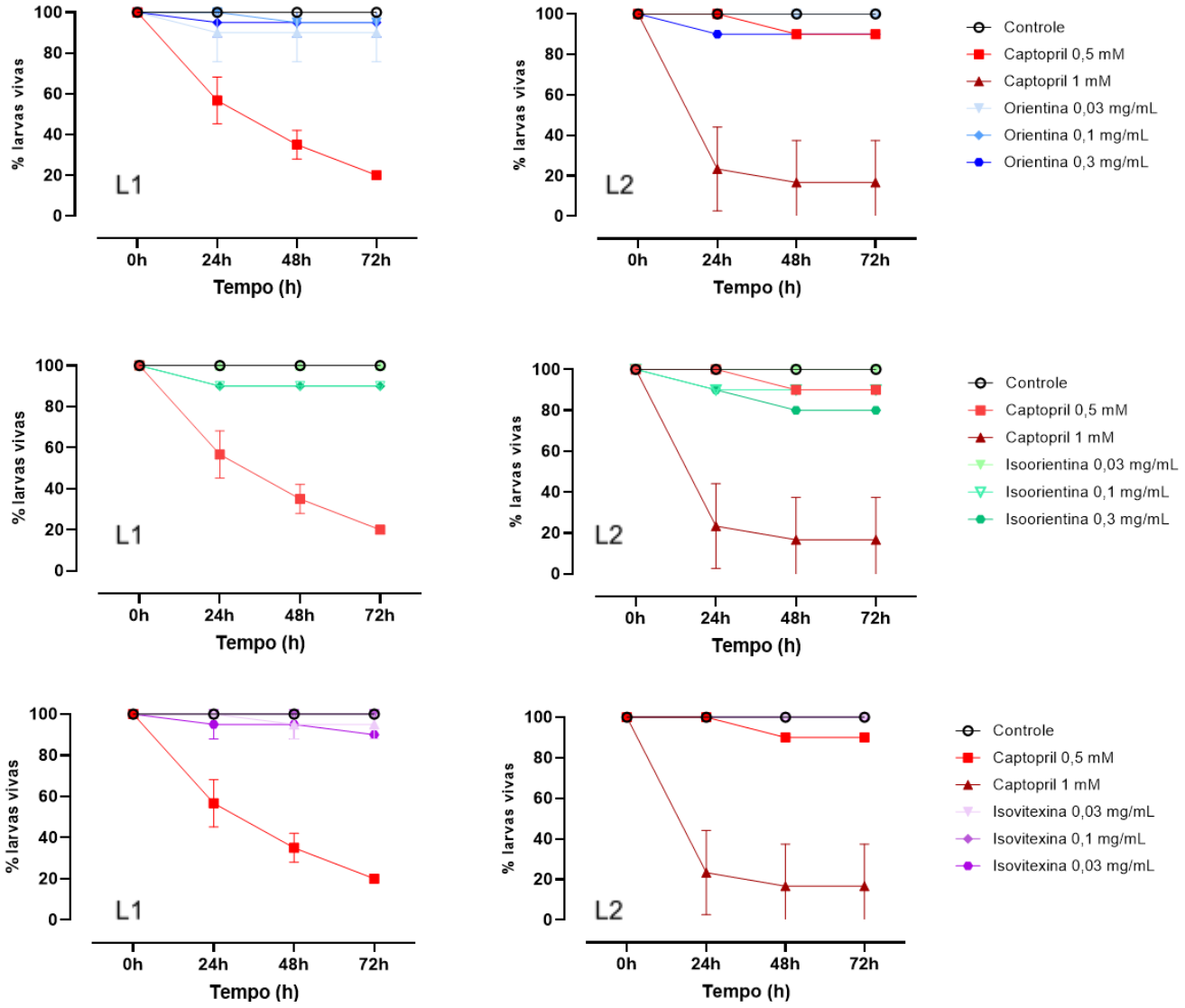


Figura 21: Efeito dos flavonóides (0,03-0,3 mg/mL) na sobrevivência das larvas do ínstar L1 (à esquerda) e L2 (à direita) de *A. aegypti*. Os dados foram expressos em percentagem relativamente ao controle (100%) e a letalidade foi avaliada a cada 24h. Notar a baixa letalidade das larvas expostas aos flavonóides (n=2).

Diferenças estatísticas determinadas por two-way Anova seguida pelo teste de Tukey, sendo * p<0.05 / ** p<0.005 / *** p<0.001 / ****p<0.0001

7.3 Avaliação do efeito dos flavonóides isolados da Fbut da *C. glazioui* no desenvolvimento de larvas de *A. aegypti*

Os flavonóides, nas concentrações de 0,03-0,3 mg/mL, foram pouco letais às larvas de *A. aegypti.* No entanto, a exposição das larvas aos compostos retardou o seu desenvolvimento. Avaliando o crescimento em função do tempo para formação de pupa, o crescimento foi significativamente menor na presença dos flavonoides (Fig. 22 e 23)

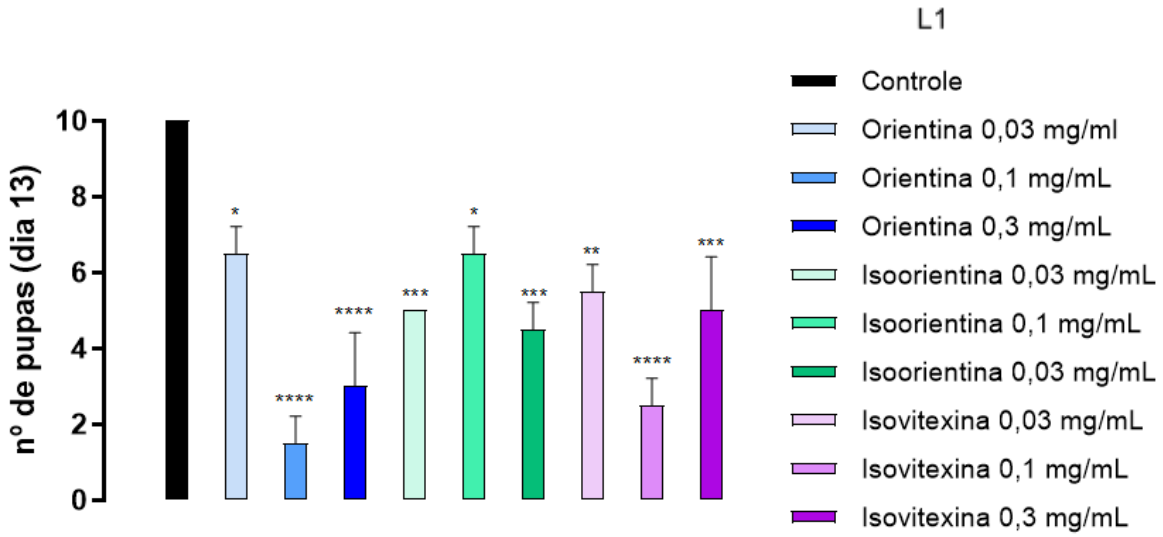


Figura 22: Efeito dos flavonóides (0,03-0,3 mg/mL) de *C. glazioui* no desenvolvimento de larvas do ínstar L1 de *A. aegypti* relativamente ao controle. O crescimento foi avaliado contando-se o número de pupas formadas em cada poço após 15 dias de exposição aos flavonoides (n=2) com 10 larvas/poço. Diferenças estatísticas determinadas por one-way Anova seguida pelo teste de Dunnet, sendo *p<0.05 / ** p<0.005 / *** p<0.001 / ****p<0.0001

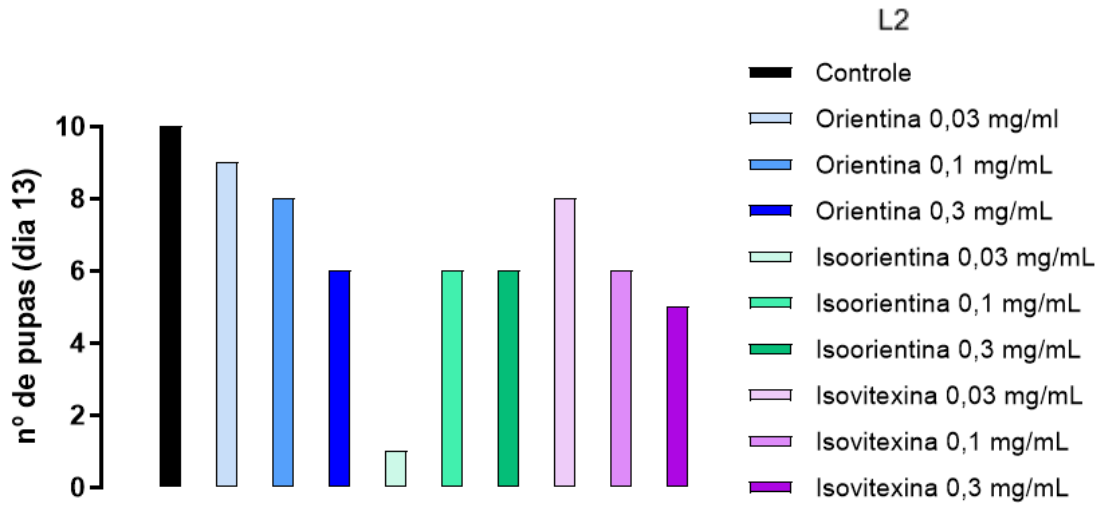


Figura 23: Efeito dos flavonóides (0,03-0,3 mg/mL) de *C. glazioui* no desenvolvimento de larvas do ínstar L2 de *A. aegypti* relativamente ao controle. O crescimento foi avaliado contando-se o número de pupas formadas em cada poço após 15 dias de exposição aos flavonoides (n=1) com 10 larvas/poço. Neste caso, não foi possível realizar análise estatística devido à baixa quantidade de testes.

A figura 24 demonstra os diferentes tamanhos das larvas L2 quando expostas à orientina. Na imagem, é possível observar que a larva controle (cont) é maior comparativamente às demais expostas ao flavonóide.

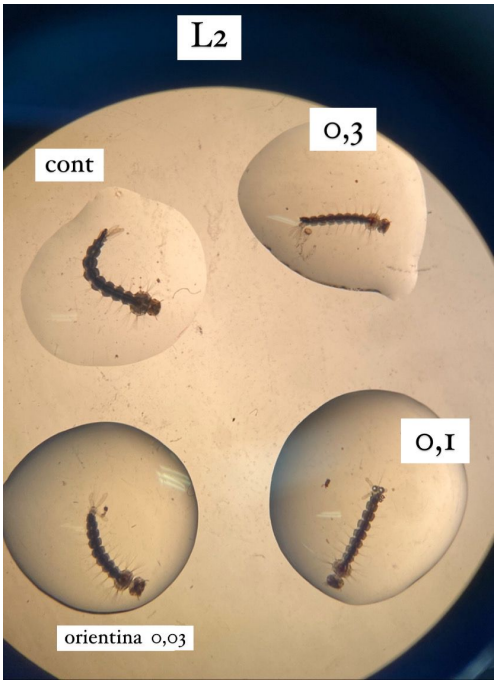


Figura 24: Comparação dos tamanhos das larvas de *A. aegypti* em ínstar L2 em condições controle e 72h após exposição à orientina (0,03 - 0,3 mg/mL)

8. Discussão

Até o presente momento, este estudo avaliou a atividade das enzimas conversoras de angiotensina (ECA-1 e ECA-2) de mamíferos frente aos substratos e inibidores disponíveis no mercado brasileiro. Não existem substratos específicos e disponíveis para as enzimas de insetos. Técnicas da biologia molecular permitiram identificar mais de 40 homólogos (Lamango et al., 1994, Harisson et al., 2014) de ECAs em insetos, mas estudos funcionais são poucos e inconclusivos. Há indicações de que as isoformas ECAs são vitais para os insetos, mas essas funções fisiológicas são pouco conhecidas. Sabe-se apenas que não seriam as mesmas funções vasculares dos homólogos humanos/mamíferos porque o sistema circulatório da hemolinfa de insetos é aberto, sem diferenciação de um sistema cardiovascular semelhante ao de vertebrados.

Todos os homólogos das “enzimas conversoras de angiotensina” têm como substrato as próprias angiotensinas, mas esses peptídeos não existem em invertebrados. Dessa forma, não está claro se seriam precursores dos substratos enzimáticos naturais no inseto, como os homólogos das enzimas parecem ser precursores das enzimas humanas preservados durante a evolução animal. As perguntas sem respostas são numerosas e orientam para um trabalho multidisciplinar futuro exigente da obtenção de resultados que, atualmente, são quase todos obtidos com material disponível para estudo das enzimas humanas.

Os resultados descritos neste trabalho preliminar mostram que, nesta fase inicial, os estudos com insetos poderão ser trabalhosos, como foram as tentativas para conseguir evidências funcionais sólidas para as próximas etapas da bioprospecção de repelentes/inseticidas.

No trabalho atual, foi necessário caracterizar primeiramente as atividades das ECAs em mistura no plasma de rato, estudando as propriedades fundamentais das duas isoformas, a afinidade e a especificidade dos substratos e inibidores disponíveis exclusivamente para o padrão humano. Ainda não é possível concluir se as enzimas de mamíferos servirão como padrão de referência para avaliar a reatividade dos insetos aos compostos naturais. Estes resultados preliminares indicaram, e as experiências futuras mostrarão, se o isolamento das isoformas das enzimas de mosquito será essencial para identificação de ligantes específicos e caracterização farmacológica da reatividade enzimática.

Novos substratos sintéticos deverão ser pesquisados para quantificação da atividade enzimática do inseto. Os resultados mostraram que a afinidade do Mca-APK(Dnp) pela ECA-2 do plasma foi menor que a afinidade do Abz-FRK(Dnp)P-OH pela ECA-1 , pois a velocidade da clivagem do substrato e a intensidade de desenvolvimento de fluorescência foram de 3 a 5 vezes menor com a ECA-2. Na prática, a fluorescência só foi visível com concentrações 15 a 20 vezes maiores de substrato.

Também ficou evidente que a ECA-1 humana tem alta afinidade pelo inibidor captopril, da ordem de nanomolar e que este inibidor também foi seletivo para a ECA-1, confirmando muitos resultados da literatura (Ondetti et al., 1977). No entanto, a prova de conceito mostrou que as doses letais nas larvas foram 10.000 vezes maiores que a afinidade enzimática.

Em relação à ECA-2, observamos que o inibidor DX600 realmente inibiu a hidrólise do substrato, mas não foi seletivo para a ECA-2, como descrito na literatura (Huang et al., 2003), porque inibiu também a atividade da ECA-1 sem muita diferença de concentração. Dessa forma, o DX600 não serviu para separar a reatividade das duas enzimas do plasma de mamíferos, devido à baixa disponibilidade (alto custo e consumo elevado) ainda não sabemos se as reatividades das ECAs de insetos serão diferentes

Ao comparar os efeitos da fração butanólica nas ECAs, foi possível observar pequenas diferenças de intensidade, uma vez que as IC50 calculadas para ECA-1 e ECA-2 foram, respectivamente, de $4{,}6.10^{-5}$ g/mL e $2{,}0.10^{-4}$ g/mL. Dessa forma, conclui-se que a Fbut inibiu as duas enzimas de mamíferos, sendo mais ativa na ECA-1, indicando que sua ação não é seletiva.

Todos os compostos isolados da Fbut foram muito pouco ativos quando comparados ao captopril na ECA-1, ou com o DX600 na ECA-2 , ou à própria Fbut nas duas enzimas.

O ácido clorogênico, as procianidinas B5, B3 e B2, a orientina, a isoorientina e a isovitexina reduziram significativamente a fluorescência emitida pelo substrato Abz para ECA-1 (p<0,0001). Entretanto, apenas a isoorientina e a isovitexina foram capazes de inibir mais de 50% da atividade enzimática da ECA-1 e ainda em concentrações 100.000 vezes maiores que o inibidor padrão (captopril). Em estudos anteriores, flavonóides da *Cecropia* inibiram a ECA-1 *in vitro* (Lacaille-Dubois et al., 2001) mas este efeito foi questionado por outros estudos *in vivo* (Ninahuaman et al.,

2007). Em relação à ECA-2, os compostos com até 10 μM não foram capazes de inibir mais que 10% da atividade enzimática, não tendo uma ação significativa.

Já para as dosagens nas larvas, a Fbut teve uma IC50 de $2{,}1.10^{-4}$ M para a ECA-1, enquanto no plasma estava em $4{,}5.10^{-5}$ M. Para a ECA-2, a IC50 foi de $1{,}1.10^{-4}$ M, sendo que no plasma foi de 2.10^{-4} M. Nestas dosagens, apesar da Fbut ter sido mais ativa na ECA-2 das larvas, as IC50 obtidas experimentalmente foram muito próximas. Ainda é necessário comprovar se essa proximidade nas IC50 está relacionada com a similaridade dos homólogos.

Em relação aos testes *in vivo*, foi observado uma atividade letal e inibidora do crescimento da Fbut em relação às larvas, principalmente após 24h. Essa atividade está intrinsecamente relacionada ao estágio de desenvolvimento larval, uma vez que ínstares mais iniciais foram mais suscetíveis à ação da Fbut. Vale ressaltar que a ação do DX600 *in vivo* não foi possível de ser realizada devido à escassez desse inibidor.

A maior resistência observada nos estágios mais tardios das larvas pode estar relacionada a uma maior quantidade do homólogo da ECA, que está provavelmente associada ao desenvolvimento da larva (Harisson et al., 2014; Isaac et al., 2007; Siviter et al., 2002).

Os dados permitem concluir que a Fbut da *C. glazioui* tem uma potencial ação inseticida, talvez relacionada à inibição das ECAs das larvas. Este é um mecanismo de ação diferente de todos os mecanismos dos inseticidas atuais, como os bloqueadores de GABA, dos canais de cálcio e potássio ou com atividade anticolinesterásica.

9. Conclusão

In vitro, a Fbut da *C. glazioui* inibiu não-seletivamente as ECAs, tanto do plasma de rato, como do homogenato de larvas de *A. aegypti*. No entanto, os compostos isolados foram menos ativos que o extrato semi-purificado, à exceção dos flavonóides: orientina, isoorientina e isovitexina.

Os resultados *in vivo* mostraram que a Fbut foi letal às larvas em todos os ínstares, à semelhança do captopril. Os flavonóides, apesar de pouco ativos como inseticidas, inibiram o crescimento larval, retardando seu desenvolvimento até o estágio de pupa. É possível que essa atividade esteja relacionada à inibição dos homólogos das ECAs em insetos, porém mecanismos adicionais ainda não foram estudados.

10. Colaborações científicas, dificuldades na pesquisa e limitações

Para o estudo da ação dos compostos nas ECAs das larvas de mosquitos, foi feito um treinamento laboratorial em ensaios biológicos com insetos, da eclosão dos ovos e criação de larvas de mosquitos, à criação controlada de mosquitos. O estágio foi realizado no Laboratório da Profa. Margareth Capurro (Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP) que, gentilmente, nos cedeu também os ovos de *Aedes* para os estudos imediatos com larvas de mosquitos.

As limitações do trabalho referem-se ao momento atual, ao estado da pandemia do SARS-CoV-2. Até agora, apesar das restrições encontradas no laboratório que está se reinstalando, foi possível trabalhar de forma fluida e eficaz.

As dosagens feitas a partir da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, proposta como método alternativo inicialmente, não foram capazes de auxiliar na padronização e nas dosagens dos metabólitos. A hidrólise dos substratos (Ang I e Ang II) no homogenato de larvas parece gerar outros produtos diferentes do plasma de rato, sendo que a falta de tempo hábil não nos permitiu identificar esses produtos e nem adquirir novos padrões para a dosagem.

A escassez/disponibilidade de substratos, pelo custo e consumo elevados, também foi limitação importante, principalmente considerando a especificidade das ações e a insegurança dos resultados pretendidos nesta fase da pesquisa.

11. Referências bibliográficas

1. Abu-Hasan ZI, Williams H, Ismail NM, Othman H, Cozier GE, Acharya KR, Isaac RE. The toxicity of angiotensin converting enzyme inhibitors to larvae of the disease vectors *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. **Scientific Reports**, 7, 45409, 2017.
2. Andrade-Cetto A, Cardenas R, Ramírez-Pérez B. Hypoglycemic effect of Cecropia peltata L. on N5-STZ type 2 diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 3, 110-203, 2007
3. Assolini FC, Tedesco AM, Carpes ST. Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de plantas Usadas como Chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, 9 (3), 209-215, 2006.
4. Berg CC, Rossell FP. Cecropia. **Flora Neotropica Monograp**., 2005.
5. Bolzani VS, Castro-Gamboa I, Silva DHS. **In Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology**; Verpoorte, R., Ed.; Elsevier: Oxford, UK, Vol. 3, Chapter 3.05, 95−133, 2010.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 24. **Boletim epidemiológico** 53, 2022. disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no24
7. Brogdon W, McAlister JC. Insecticide Resistance and Vector Control. **Emerging Infectious Diseases**, 4(4), 605–613, 1998.
8. Burnham S, Smith JA, Lee AJ. The angiotensin-converting enzyme (ACE) gene family of *Anopheles gambiae*. **BMC Genomics,** 6, 172, 2005.
9. Caldwell P, Seegal B, Hsu K, Das, M, Soffer R. Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. **Science,** 191(4231), 1050-1, 1976.
10. Caldas dos Santos T, Rescignano N, Boff L, Reginatto FH, Simões CMO, Campos AM, Mijangos C. In vitro antiherpes effect of C-glycosyl flavonoid enriched fraction of *Cecropia glaziovii* encapsulated in PLGA nanoparticles. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**., 75, 1214-1220, 2017.

11. Carmona AK, Schwanger SL, Juliano MA, Juliano L, Stturrock ED. A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. **Nature Methods**. 1(4),1971-1976, 2006.

12. Coimbra, R. In: Notas de Fitoterapia. Catálogo dos dados principais sobre plantas utilizadas em Medicina e Farmácia. 2ª ed, Laboratório Clínico SIlva Araújo S.S, Rio de Janeip, Brasil, p.230, 1958

13. Conn, BJ, Hadiah JT, Webber BL. The status of Cecropia (Urticaceae) introductions in Malesia: addressing the confusion. **Blumea Journal of Plant Taxonomy and Plant Geography**, 57 (2), 136-142, 2012.

14. Costa GM, Schenkel EP, Reginatto FH. Chemical and pharmacological aspects of the genus Cecropia. **Natural Product Communications**, 6(6), 913-920, 2011.

15. Cushman DW, Ondetti MA. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, 17(4), 589-92. 1991.

16. Delarcina JS, Lima-Landman MTR, Souccar C, Cysneiros RM, Tanae MM, Lapa AJ. Inhibition of histamine-induced bronchospasm in guinea pigs treated with *Cecropia glaziovii* Sneth and correlation with the in vitro activity in tracheal muscles. **Phytomedicine**, 14, 324-332, 2007.

17. Diagne CT, Diallo D, Faye O. et al. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. **BMC Infect Dis**, 15, 492, 2015.

18. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circ Res**, 87 (5), E1-9, 2000.

19. Ferreira SH. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. Br. J. Pharmacol. **Chemother**, 24, 163-9, 1965.

20. Ferreira LLG & Andricopulo AD. Drugs and vaccines in the 21st century for neglected diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, 19(2), 125–127, 2019.

21. Franco-Rosselli P & Berg CC. Distributional patterns of *Cecropia* (Cecropiaceae): a panbiogeographic analysis. **Caldasia**, 19, 285-296, 1997.

22. Gaston KJ. The Magnitude of Global Insect Species Richness. **Conservation Biology,** 5(3), 283–296, 1991.

23. Golding N, Wilson AL, Moyes CL. Integrating vector control across diseases. **BMC Med** 13, 249, 2015.

24. Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, Lamballerie, X. Emerging arboviruses: Why today?, **One Health** 4, 1-13, 2017.

25. Guedes DR, Paiva MH, Donato MM, Barbosa PP, Krokovsky L, Rocha SWDS, Saraiva K, Crespo MM, Rezende TM, Wallau GL, Barbosa RM, Oliveira CM, Melo-Santos MA, Pena L, Cordeiro MT, Franca RFO, Oliveira AL, Peixoto CA, Leal WS, Ayres CF. **Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil.** Emerg Microbes Infect 6(8):e69, 2017.

26. Harrison C, Acharya KR. ACE for all - a molecular perspective. **J Cell Commun Signal**, 8(3), 195-210, 2014.

27. Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Science**, 298 (5591),129-49, 2002.

28. Huang L, Sexton DJ, Skogerson K, Devlin M, Smith R, Sanyal I, Parry T, Kent R, Enright J, Wu QL, Conley G, DeOliveira D, Morganelli L, Ducar M, Wescott CR, Ladner RC. Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2. **J Biol Chem.**, 278 (18), 15532-402003, 2003.

29. Instituto Butantan. Vacina da dengue tem imunogenicidade superior a 90%, mostra ensaio clínico; Butantan deve finalizar fase 3 até 2024, 2022. Disponível em: https://butantan.gov.br/noticias/vacina-da-dengue-tem-imunogenicidade-superior-a-90-mostra-ensaio-clinico--butantan-deve-finalizar-fase-3-ate-2024

30. Isaac RE, Lamango NS, Ekbote U, Taylo, CA, Hurst D, Weaver RJ, Shirras AD. Angiotensin-converting enzyme as a target for the development of novel insect growth regulators. **Peptides**, 28(1), 153–162, 2007

31. Jankielsohn A. The Importance of Insects in Agricultural Ecosystems. **Advances in Entomology**, 6, 62-73, 2018.

32. Johansson MA, Mier-y-Teran-Romero L, Reefhuis J, Gilboa SM, Hills SL. Zika and the risk of microcephaly. **N Engl J Med.,** 375, 1–4, 2016.

33. Kim, HM, Shin DR, Yoo OJ, Lee H, Lee JO. Crystal structure of Drosophila angiotensin I-converting enzyme bound to captopril and lisinopril1. **FEBS Letters**, 538(1-3), 65–70, 2003.

34. Lacaille-Dubois MA, Franck U, Wagner H. Search for potential Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-inhibitors from plants. **Phytomedicine**, 8(1), 47–52, 2001

35. Lamango NS, Isaac RE. Identification and properties of a peptidyl dipeptidase in the housefly, *Musca domestica*, that resembles mammalian angiotensin-converting enzyme. **Biochem J**., 299, 651-7, 1994.

36. Langford KG, Zhou Y, Russell LD, Wilcox JN, Bernstein KE. Regulated Expression of Testis Angiotensin-Converting Enzyme during Spermatogenesis in Mice1. **Biology of Reproduction**, 48(6), 1210–1218, 1993.

37. Leta S, Beyene TJ, De Clercq EM, Amenu K, Kraemer MUG, Revie CW. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Int J Infect Dis**, 67, 25-35, 2018.

38. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. **Nature** 426 (6965), 450-4, 2003.

39. Lima-Landman MTT, Borges ACR, Cysneiros RM, Lima TCM, Souccar C, Lapa AJ. Antihypertensive effect of a standardizes aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: an in vivo approach to the hypotensive mechanism. **Phytomedicine**, 14, 314-320, 2007.

40. Monro A.. Neotropical Urticaceae. In: Milliken W, Klitgård B, Baracat, A. Neotropikey – Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics, 2009

41. Müller SD, Florentino D, Ortmann CF, Martins FA, Danielski LG, Michels M, de Souza Constantino L, Petronilho F, Reginatto FH. Anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract of Cecropia glaziovii leaves. **J Ethnopharmacol**, 185, 255-62, 2016.

42. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod.** 75(3), 311-335, 2012.

43. Nichols E, Spector S, Louzada J, Larsen T, Amezquita S, Favila M.E. Ecological Functions and Ecosystem Services Provided by Scarabaeinae Dung Beetles. **Biological Conservation**, 141, 1461-1474, 2008.

44. Ninahuaman MF, Souccar C, Lapa AJ, Lima-Landman MT. ACE activity during the hypotension produced by standardized aqueous extract of *Cecropia*

glaziovii Sneth: a comparative study to captopril effects in rats. **Phytomedicine**, 14(5), 321-7, 2007.

45. Oliveira KN, Coley PD, Kursar TA, Kaminski LA, Moreira MZ, Campos RI The Effect of Symbiotic Ant Colonies on Plant Growth: A Test Using an Azteca-Cecropia System. **PLoS ONE** 10(3): e0120351, 2015
46. Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: new class of orally acting active antihypertensive agents. **Science** 196, 441–444, 1977.
47. Pérez-Guerrero C, Herrera MD, Ortiz R, Alvarez de Sotomayor M, Fernández MA. A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. **J Ethnopharmacol.**, 76(3), 279-84, 2001.
48. Pott A, Pott V. Plantas do Pantanal. 1a ed., Corumbá: Embrapa, 1994
49. Rates SMK. **Plants as sources of drugs**. Toxicon, v. 36, 603-613, 2004.
50. Riordan JF. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. **Genome Biol.**, 4(8):225, 2003
51. Rojas JJ, Ochoa VJ, Ocampo AS, Muñoz JF. Screening antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in treatment of non-nosocomial infections. **BCM Complementary and Alternative Medicine**., 6:2, 2006.
52. Rocha FF, Lapa AJ, De Lima TC. Evaluation of the anxiolytic-like effects of Cecropia glazioui Sneth in mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, 71(1-2),183-90, 2002 .
53. Rocha FF, Lima-Landman MTR, Souccar C, Tanae MM, de Lima TCM, Lapa AJ. Antidepressant-like effect of *Cecropia glaziovii* Sneth and its constituents – In: vivo and in vivo characterization of the underlying mechanism. **Phytomedicine**, 14, 396-402, 2007.
54. Ryan US, Ryan JW, Whitaker C, Chiu A. Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II). II. Immunocytochemistry and immunofluorescence. **Tissue and Cell**, 8(1), 125–145, 1976.
55. Scott ML, Hribar LJ, Leal AL, McAllister JC. Characterization of Pyrethroid Resistance Mechanisms in *Aedes aegypti* from the Florida Keys. **Am J Trop Med Hyg.** 104(3):1111–22, 2021.
56. Skeggs LT. The preparation and function of the hypertension-converting enzyme. **Journal of Experimental Medicine**, 103(3), 295-9, 1956.

57. Silva AF, Bastos EL, Torres MD, Costa-da-Silva AL, Ioshino RS, Capurro ML, Alves FL, Miranda A, Vieira Rde F, Oliveira VX Jr. Antiplasmodial activity study of angiotensin II via Ala scan analogs. **J Pept Sci.**, 20(8), 640-8, 2014.

58. Siviter RJ, Taylor CA, Cottam DM, Denton A, Dani MP, Milner MJ, et al. Ance, a Drosophila angiotensin-converting enzyme homologue, is expressed in imaginal cells during metamorphosis and is regulated by the steroid, 20- hydroxyecdysone. **Biochem J**, 367, 87–93, 2002.

59. Soubrier F, Alhenc-gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I converting enzyme revealed by molecular cloning. **Proc Natl Acad Sci USA**, 85(24), 9386-90, 1988.

60. Souccar C, Cysneiros RM, Tanae MM, Torres LMB, Lima-Landman MTR, Lapa AJ. Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of Cecropia glaziovii Sneth and underlying mechanism. **Phytomedicine**, 15, 462-469, 2008.

61. Stork NE, McBroom J, Gely C, Hamilton AJ. New approaches narrow global species estimates for beetles, insects, and terrestrial arthropods. **Proc Natl Acad Sci USA**., 112(24):7519-23, 2015.

62. Sriramula S, Pedersen KB, Xia, H, Lazartigues E. Determining the enzymatic activity of Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) in brain tissue and cerebrospinal fluid using a quenched fluorescent substrate. **Methods Mol. Biol.**, 1527, 117-126, 2017.

63. Tanae MM, Lima-Landman MTR, De Lima TCM, Souccar C, Lapa A.J. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. **Phytomedicine**, 14(5), 309-313, 2007.

64. Teich, V., Arinelli, R. , Fahham, L. *Aedes aegypti* and society: the economic burden of arboviruses in Brazil, **J Bras Econ Saúde**, 9(3), 267-276, 2017.

65. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A Human Homolog of Angiotensin-converting Enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, 275(43), 33238–33243, 2000.

66. Turner AJ, Hooper NM. The angiotensin–converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. **Trends in Pharmacological Sciences**, 23(4), 177–183, 2002.

67. WHO. The World Traditional Medicines Situation, in Traditional medicines: Global Situation, Issues and Challenges. ***Geneva*** 3,1–14, 2011.

68. WHO. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders

and neonatal malformations, 2016. Disponível em https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-(ihr-2005)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations

69. WHO. World malaria report 2021. **World Health Organization**. 322 p, 2021.

70. Yang HY, Erdös EG, Levin Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. **Biochim Biophys Acta** 214(2), 374-6,1970.

71. Zaman MA, Oparil S, Calhoun DA. Drugs targeting the renin–angiotensin–aldosterone system. **Nature Reviews Drug Discovery**, 1(8), 621–636, 2002.

72. Zhou P, Yang XL, Wang XG. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature** 579, 270–273, 2020

73. Ministério da Saúde. Agenda de Prioridades de Pesquisa do Ministério da Saúde, 2018, 27 p. Disponível em https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/agenda_prioridades_pesquisa_ms.pdf