

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

**Biotecnologia celular aplicada na triagem de compostos naturais e sintéticos
com foco na ativação do receptor de ecdisteróides**

Juliana Wegner

Pelotas, 2023

Juliana Wegner

**Biotecnologia celular aplicada na triagem de compostos naturais e sintéticos
com foco na ativação do receptor de ecdisteróides**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Entomologia).

Orientador: Prof. Dr. Moisés João Zotti

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

W412b Wegner, Juliana

Biotecnologia celular aplicada na triagem de compostos naturais esintéticos com foco na ativação do receptor de ecdisteróides [recurso eletrônico] / Juliana Wegner ; Moisés João Zotti, orientador. – Pelotas, 2023.
90 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. *Drosophila melanogaster*. 2. Ecdisteróides. 3. Extratos vegetais. 4. Reguladores de crescimento. 5. Tebufenozida. I. Zotti, Moisés João, orient. II. Título.

Juliana Wegner

Biotecnologia celular aplicada na triagem de compostos naturais e sintéticos com
foco na ativação do receptor de ecdisteróides

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração:
Entomologia).

Data da Defesa: 15/12/2023

Banca examinadora:

Prof. Dr. Moises João Zotti
Departamento, de Fitossanidade, FAEM/UFPel (Orientador)
Doutor em Applied Biological Science pela Ghent University, UGENT, Bélgica

Prof. Dr. Dori Edson Nava
Pesquisador da Embrapa Clima Temperado e professor permanente no curso
de Pós-graduação em Fitossanidade e Entomologia da Universidade Federal
de Pelotas.
Doutor em Entomologia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
Universidade de São Paulo (Esalq/USP).

Prof. Dr. Daniel Bernardi
Departamento de Fitossanidade, FAEM/UFPel
Doutor em Entomologia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
Universidade de São Paulo (Esalq/USP).

Dr. Ciro Pedro Guidotti Pinto
Doutor em Agronomia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
(UNESP)

Agradecimentos

Primeiramente a Deus pela Sua graça e misericórdia. Por prover tudo que eu precisava durante a minha caminhada: maturidade, disciplina, resiliência, paciência, serenidade;

Ao Bruno, meu amado esposo que representa minha segurança em todos os aspectos, por seu amor incondicional, seus sorrisos, seus conselhos, e incentivo. Por ser minha calma em meio à tempestade. Obrigada por me manter motivada durante todo o processo; sem você, essa etapa não teria sido concluída;

Aos meus pais, Gilmar e Denise, meus irmãos Karina e Guinter, e meu cunhado Itair, pela confiança no meu progresso, pelo amor e apoio emocional. Obrigada por serem a minha referência e estarem sempre presentes na minha vida de uma forma indispensável, mesmo que distantes tantos quilômetros;

À minha sogra Margarete, pela companhia constante e tão querida, além de todo incessante incentivo, apoio e atenção;

À minha enteada Maria Eduarda, pela sua alegria e leveza em todos momentos que estamos juntas;

À minha família, estendida principalmente ao meu tio Ricardo, tia Margarete, prima Nathalia, e vó Dag, por todos momentos de descontração e apoio em minha trajetória;

Ao meu orientador Prof. Dr. Moisés João Zotti (UFPel- PPGFs), que apesar da intensa rotina, aceitou me orientar e confiou a mim esse trabalho. Agradeço por sua paciência, incentivo e valiosas contribuições, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos Daniel Quiroga, Vanessa, Caroline, Jissela, Jonathan e Rafael, do PPGFs, pelas trocas de ideias, risadas, desesperos e ajuda mútua. Juntos conseguimos avançar e ultrapassar muitos obstáculos;

Aos integrantes do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LabMIP-UFPel) pela assistência e convivência nesse período, em especial a Dra. Mariane D'Ávila Rosenthal pelo acolhimento, apoio técnico e amizade dispensados;

Ao professor César Valmor Rombaldi, pela atenção a mim ofertada, que foram essenciais para que este trabalho fosse concluído satisfatoriamente;

Aos professores Leandro Dallagnol, Jerônimo Araújo, Cândida Jacobsen, Marco Marinho, Álvaro Guerra e Nathan Vanier, pelo apoio técnico prestado durante o desenvolvimento do projeto;

Ao professor João Iganci e ao Emanuel, pelo auxílio, especialmente na identificação das plantas utilizadas nesta pesquisa;

Ao professor Geferson Fischer, pelo acolhimento e pelas dúvidas sanadas;

Ao Laboratório de Bioquímica Vegetal, especialmente ao Eduardo, por sua dedicação e disposição em colaborar conosco ao longo do projeto;

Ao Laboratório de Interação Planta-Patógeno, especialmente à Sabrina e a Emanuele, que cederam muitas vezes os equipamentos, seu tempo e sua disponibilidade para efetuar meu trabalho de pesquisa;

Aos demais colegas e amigos que não citei aqui, pois são muitos, que compartilharam dos inúmeros desafios que enfrentamos, sempre com o espírito colaborativo;

A Universidade Federal de Pelotas (UFPel), instituição a qual tem sido minha casa pelos últimos anos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade (PPGFs) pela oportunidade proporcionada a mim;

A banca avaliadora, que prontamente e com entusiasmo aceitaram fazer parte desse momento tão importante em minha vida;

A CAPES pelo financiamento;

A todo o corpo docente da UFPel;

Muito obrigado!

***A ciência se compõe de tropeços que,
por sua vez, são os passos até a verdade.***

Julio Verne

Resumo

WEGNER, Juliana. **Biotecnologia celular aplicada na triagem de compostos naturais e sintéticos com foco na ativação do receptor de ecdisteróides**. 2023. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

O receptor de ecdisteróides desempenha um papel crucial no processo de muda e no desenvolvimento dos insetos, tornando-o um alvo estratégico para intervenção no controle de pragas. A busca por novos ingredientes ativos com propriedades inseticidas envolve várias estratégias, que vão desde a triagem *in silico* de moléculas, até a busca de compostos provenientes de fontes naturais. Diante disso, explorou-se duas abordagens cujo alvo foi o receptor de ecdisteróides: extratos de samambaias e moléculas análogas a tebufenozida. A primeira abordagem investigou os efeitos de cinco extratos de samambaias em células embrionárias de *Drosophila melanogaster* (S2), analisando citotoxicidade e ação agonista e antagonista no receptor de ecdisteróides. Extratos de *Blechnum occidentale* L. mostraram 76% de luminescência no ensaio agonista, e *Blechnum occidentale* L. e *Christella* sp. inibiram quase totalmente a luminescência no ensaio antagonista. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que os extratos de samambaias apresentam potencial para serem utilizados no controle de moscas-das-frutas, uma vez que foram capazes de atuar no receptor de ecdisteróides de *Drosophila melanogaster*. A outra abordagem consistiu em testes *in vitro* que foram conduzidos com três moléculas análogas a tebufenozida, avaliando citotoxicidade, transfecção celular com o plasmídeo B.act.ere.luc., e mensuradas as atividades agonistas e antagonistas no receptor de ecdisteróides em células embrionárias de *Drosophila melanogaster* (S2). Para a modelagem estrutural, utilizaram-se estruturas de proteínas previamente caracterizadas de insetos como referência a fim de construir um modelo homólogo do receptor em *Drosophila melanogaster*. A análise *in silico* e *docking* molecular foram realizadas para avaliar a interação das moléculas análogas a tebufenozida com o receptor modelado. Os resultados obtidos sugerem que as variações observadas nas atividades agonistas e antagonistas não são estatisticamente significativas ao nível de significância 5% e não apresentam potencial para atuar no receptor de ecdisteróides de dípteros. Ambos os caminhos destacam a necessidade de uma pesquisa contínua e abrangente para enfrentar os desafios crescentes associados à resistência de insetos e ao desenvolvimento de inseticidas mais eficazes e seletivos.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*; Ecdisteróides; Extratos vegetais; Reguladores de crescimento; Tebufenozida.

Abstract

WEGNER, Juliana. **Cellular biotechnology applied to the screening of natural and synthetic compounds with a focus on the activation of the ecdysteroid receptor.** 2023. 90p. Master's Thesis in Sciences - Graduate Program in Crop Protection, Eliseu Maciel Faculty of Agronomy, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2023.

The ecdysteroid receptor plays a crucial role in the molting process and insect development, making it a strategic target for pest control intervention. The search for new active ingredients with insecticidal properties involves various strategies, ranging from in silico screening of molecules to the exploration of compounds from natural sources. Two approaches targeting the ecdysteroid receptor were explored: fern extracts and tebufenozida analog molecules. The research investigated the effects of five fern extracts on *Drosophila melanogaster* (S2) embryonic cells, analyzing cytotoxicity and agonist and antagonist actions on the ecdysteroid receptor. *Blechnum occidentale* L. extracts showed 76% luminescence in the agonist assay, while *Blechnum occidentale* L. and *Christella* sp. inhibited luminescence almost entirely in the antagonist assay. Based on the results, fern extracts show potential for fruit fly control by acting on the ecdysteroid receptor in *Drosophila melanogaster*. The other approach involved in vitro tests with three tebufenozide analog molecules, evaluating cytotoxicity, cell transfection with the B.act.ere.luc. plasmid, and measuring agonist and antagonist activities on the ecdysteroid receptor in *Drosophila melanogaster* (S2) embryonic cells. For structural modeling, previously characterized insect protein structures were used as a reference to build a homologous model of the receptor in *Drosophila melanogaster*. In silico analysis and molecular docking were performed to assess the interaction of tebufenozide analog molecules with the modeled receptor. The results suggest that the observed variations in agonist and antagonist activities are not statistically significant at the 5% significance level and do not have the potential to act on dipteran ecdysteroid receptors. Both approaches emphasize the need for continuous and comprehensive research to address the growing challenges associated with insect resistance and the development of more effective and selective insecticides.

Keywords: *Drosophila melanogaster*; Ecdysteroids; Growth regulators; Plant extracts; Tebufenozide.

Lista de Figuras

Artigo 1

Figura 1.	Diagrama representando o plasmídeo repórter contendo o gene da Luciferase. Fonte: Zotti et al., 2013.....	29
Figura 2.	Colônias de <i>Escherichia coli</i> transformadas com o plasmídeo B.act.ere.luc. fo-ram cultivadas em placas de Petri contendo meio LB e ampicilina. Somente as bactérias que incorporaram o plasmídeo conseguiram formar colônias. Na sequência, apresentamos a fotodocumentação do PCR realizado em 12 colônias selecionadas. Fonte: Wegner, J. (2023).....	35
Figura 3.	A integridade do plasmídeo B.act.ere.luc. foi avaliada por meio de uma eletroforese em gel de agarose a 1%. Fonte: Wegner, J. (2023)	36
Figura 4.	Curvas sigmóides de dose-resposta do controle positivo 20E. Fonte: Wegner, J. (2023)	37
Figura 5.	A curva dose-resposta do extrato de <i>Blechnum occidentale</i> L. destaca a relação entre a concentração do extrato e a resposta biológica, ilustrando como diferentes doses influenciam a resposta. Fonte: Wegner, J. (2023)	38
Figura 6.	Efeito agonista observado para os extratos de samambaias na linhagem celular S2. A atividade agonista das moléculas foi comparada com a concentração de 1000µM do hormônio 20-Hidroxiectdisônio (20E) e etanol como controle. Há diferença significativa do mensuramento da luminescência medida em comparação ao controle com 20-Hidroxiectdisônio segundo a análise de variância (ANOVA). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Grupos com a mesma letra não apresentam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$, teste de Tukey). Fonte: Wegner, J. (2023)	39
Figura 7.	Efeito antagonista observado para os cinco extratos na linhagem celular S2. A atividade antagonista dos extratos foi comparada com a concentração de 1000µM do hormônio 20-Hidroxiectdisônio (20E). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Grupos com a mesma letra não	42

apresentam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$, teste de Tukey). Fonte: Wegner, J. (2023)

Artigo 2

- Figura 1. Desenho esquemático que representa como os receptores nucleares são organizados em diferentes partes. As letras brancas representam cada seção, sendo um receptor nuclear comum com uma parte inicial que varia (A/B), uma parte que se liga ao DNA que é conservada (C), uma parte dobrável que varia (D), uma parte que se liga a substâncias específicas que é conservada (E) e uma parte final que varia muito (F). NLS significa sinal de localização nuclear, e AF-1 e AF-2 são partes que ativam funções específicas. Fonte: Martin, David (2010) 57
- Figura 2. Diacilhidrazinas, que inclui os ingredientes ativos comerciais cromafenozida, metoxifenoazida e tebufenoazida disponíveis no Brasil. Fonte: Wegner, J. (2023) 60
- Figura 3. Moléculas análogas a Tebufenoazida, em comparação com as moléculas controle 20-Hidroxiciclodisônio e Tebufenoazida. Fonte: Wegner, J. (2023) 63
- Figura 4. Viabilidade celular em resposta à exposição das moléculas em diferentes concentrações. Os grupos incluíram DMSO (controle), Célula (controle), F3141-0007, F0147-0409 e F0373-0541. A análise de variância (ANOVA), revelou diferenças significativas entre os grupos ($F = 10.1$, $gl_1 = 4$, $gl_2 = 9.67$, $p = 0.002$). Fonte: Wegner, J. (2023) 71
- Figura 5. Curvas sigmóides de dose-resposta do controle positivo 20E. Fonte: Wegner, J. (2023) 72
- Figura 6. Efeito agonista observado para as três moléculas análogas a tebufenoazida na linhagem celular S2. A atividade agonista das moléculas foi comparada com a concentração de $1000\mu\text{M}$ do hormônio 20-Hidroxiciclodisônio (20E) e DMSO (Solvente de diluição das moléculas) como controle. Há diferença significativa do mensuramento da luminescência medida em comparação ao controle com 20-Hidroxiciclodisônio segundo a análise de variância (ANOVA) ($F = 243$, $GL_1 = 9$; $GL_2 = 7,96$; $P < 0.0001$). Fonte: Wegner, J. (2023) 73
- Figura 7. Efeito antagonista observado para as três moléculas análogas a tebufenoazida na linhagem celular S2. A atividade antagonista das moléculas foi comparada com a concentração de $1000\mu\text{M}$ do

	hormônio 20-Hidroxiecdisônio (20E) e DMSO (Solvente de diluição das moléculas) como controle. Conforme a análise de variância (ANOVA) ($F= 1,92$, $GL\ 1= 9$; $GL\ 2= 20$; $P=0,108$), o resultado sugere que as variações observadas nas atividades antagonistas não são estatisticamente significativas ao nível de significância escolhido (0,05). Fonte: Wegner, J. (2023)	74
Figura 8.	Alinhamento de 45 sequências do receptor de ecdisteróides (EcR) de diversos artrópodes, demonstrando a similaridade da área conservada. Fonte: Wegner, J. (2023)	75
Figura 9.	Topologia predefinida da filogenia do receptor de ecdisteróide de diversos artrópodes, compreendendo as ordens Diptera, Hemiptera, Coleoptera, Himenoptera, Lepidoptera, Isoptera, Thysanoptera, Neuroptera e Syphonaptera, além de outros artrópodes. A topologia foi testada por análise de bootstrap com 1000 réplicas. Os números abaixo do ramo indicam as porcentagens de bootstrap. Fonte: Wegner, J. (2023)	76
Figura 10.	Modelo homólogo de <i>Drosophila melanogaster</i> obtido através das estruturas dos receptores de <i>Heliothis virescens</i> , <i>Bemisia tabaci</i> e <i>Tribolium castaneum</i> . Fonte: Wegner, J. (2023)	77
Figura 11.	Interface gráfica da possível interação entre a molécula F0147-0409 e o receptor de ecdisteróides de <i>Drosophila melanogaster</i> ; e o receptor modelado em forma de superfície, com a molécula encaixada em seu sítio de ligação. Fonte: Wegner, J. (2023)	80
Figura 12.	Interface gráfica da possível interação entre a molécula F0373-0541 e o receptor de ecdisteróides de <i>Drosophila melanogaster</i> ; e o receptor modelado em forma de superfície, com a molécula encaixada em seu sítio de ligação. Fonte: Wegner, J. (2023)	81
Figura 13.	Interface gráfica da possível interação entre a molécula F3141-0007 e o receptor de ecdisteróides de <i>Drosophila melanogaster</i> ; e o receptor modelado em forma de superfície, com a molécula encaixada em seu sítio de ligação. Fonte: Wegner, J. (2023)	82

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1.	Tabela de Citotoxicidade por Concentração de Extratos de Samambaias	36
Tabela 2.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão dos grupos de extratos no ensaio agonista	40
Tabela 3.	Teste à Homogeneidade de Variâncias (Levene) do ensaio agonista	41
Tabela 4.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão dos grupos de extratos no ensaio antagonista	43
Tabela 5.	Teste à Homogeneidade de Variâncias (Levene) do ensaio antagonista	43

Artigo 2

Tabela 1.	Parâmetros de Lipinski avaliados para as moléculas análogas a tebufenozida, em comparação com as moléculas controle	69
Tabela 2.	Atividade agonista de ecdisteróides para 20E e três compostos esteróides testados para células S2	72

Lista de Abreviaturas e Siglas

20E	20-Hidroxiecdisonio
ANOVA	Análise de Variância
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECR	Receptor de ecdisona
FRED	Fast Exhaustive Docking
IGRs	Reguladores de crescimento de insetos
LB	Meio Luria-Bertani
LBD	Domínio de ligação ao ligante
LogEC50	Logaritmo do valor da concentração efetiva 50% (EC50)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	Método Neighbor-Joining
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PM	Peso molecular
PonA	Ponasterona-A
PSA	Área de superfície polar
RCSB PDB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB
ROCS	Rapid Overlay of Chemical Structures
RXR	Receptor retinóide X
S2	Linhagem celular de <i>Drosophila melanogaster</i>
USP	Proteína do ultraspiráculo
XLogP	Coeficiente de partição octanol-água

Sumário

Introdução geral	17
Artigo 1 - Ação de extratos de samambaias em células embrionárias de <i>Drosophila melanogaster</i>: Citotoxicidade e atividade no receptor de ecdisteróides.....	20
Introdução.....	24
Materiais e métodos.....	27
Linhagem celular.....	27
Viabilidade celular.....	27
Plasmídeo repórter.....	28
Extratos de samambaias.....	30
Ensaio de citotoxicidade.....	32
Transfecção celular.....	32
Ensaio agonista e antagonista.....	33
Resultados e Discussão.....	34
Plasmídeo repórter.....	34
Citotoxicidade.....	36
Atividade agonista.....	37
Atividade antagonista.....	41
Composição química dos extratos.....	44
Considerações finais.....	45
Referências bibliográficas.....	46
Artigo 2 Ação de análogos da tebufenozida sobre o receptor de ecdisteróides de díptera usando a linhagem celular S2.....	51
Introdução.....	55
Materiais e métodos.....	62
Linhagem celular.....	62
Testes <i>In Vitro</i> com Moléculas Análogas a Tebufenozida.....	62
Ensaio de citotoxicidade.....	63
Ensaio de Transfecção.....	64

Ensaio agonista e ensaio antagonista.....	65
Alinhamento e Análise Filogenética.....	66
Modelagem molecular por homologia.....	67
Análise <i>in silico</i> e <i>docking</i> molecular.....	68
Resultados e Discussão.....	69
Parâmetros de Lipinski.....	69
Citotoxicidade.....	70
Atividade agonista.....	71
Atividade antagonista.....	73
Alinhamento e Análise Filogenética.....	74
Modelagem molecular por homologia.....	77
Análise <i>in silico</i> e <i>docking</i> molecular.....	77
Considerações finais.....	83
Referências bibliográficas.....	84
Considerações finais.....	88
Referências.....	89

Introdução geral

Devido ao consumo de alimentos aumentando, com a limitação de áreas adequadas para a produção agrícola (DASZKIEWICZ, 2022), e com o desafio de gerar alimento com qualidade para abastecer a demanda, a agricultura deve aumentar de forma sustentável a produção utilizando menos áreas, fazendo uso eficiente dos recursos naturais e com o menor impacto no meio ambiente (GILLER et al., 2021).

Esforços intensivos têm sido feitos para descobrir novos agentes de controle de pragas e a integração desses materiais é importante para a agricultura (SPARKS & BRYANT, 2022), e o uso de novos agentes de controle pode minimizar a poluição por agrotóxicos e melhorar a produtividade das culturas nos campos (NISHIMOTO, 2019).

A pesquisa e desenvolvimento de novos ingredientes ativos que possam ter ação inseticida abrangem diversas abordagens, desde a triagem de moléculas sintéticas até a busca por ingredientes ativos provenientes de fontes naturais (LORSBACH et al., 2019; SPARKS & BRYANT, 2022). Essas duas vertentes representam estratégias distintas, mas complementares, na busca por soluções eficazes para o controle de pragas.

Na triagem de novas moléculas sintéticas, busca-se a descoberta de moléculas seletivas e que possam atuar especificamente em uma região-alvo, entre elas o receptor de ecdisteróides. Este receptor desempenha um papel crucial no processo de muda e no desenvolvimento dos insetos, tornando-o um alvo estratégico para intervenção no controle de pragas (LIN et al., 2023). A abordagem sintética oferece a vantagem da precisão na concepção molecular, permitindo ajustes específicos para otimizar a eficácia e minimizar os efeitos colaterais em organismos não-alvo (ARAÚJO et al., 2023).

Neste contexto, surgem os inseticidas que agem no sistema endócrino, entre eles os reguladores de crescimento de insetos (IGRs), os quais têm sido empregados em aplicações fitossanitárias em uma grande quantidade de insetos-praga (STANLEY & PREETHA, 2016). Vários compostos comerciais, como tebufenozida, metoxifenoazida, cromafenozida e halofenozida, são classificados como diacilhidrazinas, afetam a complexa rota metabólica do receptor de ecdisona,

levando à muda letal precoce, porém, possuem alta seletividade inseticida, estrutura simples e baixa toxicidade para vertebrados (SUN & ZHOU, 2015).

Por outro lado, a busca de inseticidas baseados em ingredientes ativos provenientes de produtos naturais pode refletir uma abordagem mais sustentável. Os inseticidas a base de produtos naturais têm sido uma área-chave de interesse na descoberta de novos ingredientes ativos para proteção de culturas, devido as suas propriedades inseticidas naturais (SPARKS & BRYANT, 2022).

Muitas plantas e organismos produzem metabólitos secundários que afetam diretamente a função hormonal dos insetos, entre eles a ecdise (THIEM et al., 2017). Assim, busca-se explorar essas fontes para isolar e identificar substâncias ativas que possam ser utilizadas no desenvolvimento de inseticidas mais seguros para o meio ambiente e para organismos não-alvo (MISHRA et al., 2020).

A convergência dessas duas abordagens, design sintético e busca de ingredientes ativos naturais, para a mesma região-alvo, representa uma síntese integrada para o desenvolvimento de soluções eficazes e sustentáveis no controle de pragas. Ao combinar a inovação da química sintética com a produtos naturais, busca-se pesticidas eficazes, seletivos e, que minimizem os impactos adversos no meio ambiente (KIYOTA, 2020). Essa abordagem integrada, focada no receptor de ecdisteróides, não apenas oferece potenciais avanços na eficácia dos inseticidas, mas também destaca a importância de considerar a biologia dos insetos como um ponto central nas estratégias de controle de pragas.

Ao desenvolver novos compostos inseticidas é necessário que ocorra a avaliação de biossegurança e testes de toxicidade, sendo um processo que inclui várias etapas, desde testes *in silico*, *in vitro*, *in vivo* e até, finalmente, a ensaios clínicos de campo, tendo um aumento crescente e significativo em pesquisas *in silico* e *in vitro* (CLIFT & DOAK, 2021).

Os estudos *in silico* são realizados virtualmente, via simulação computacional. Neste, com a construção de um algoritmo, é possível prever como os fármacos podem interagir com um receptor (SUMMERFIELD & DONG, 2020). Estudos *in vitro* são considerados métodos alternativos de teste para (1) reduzir o uso de animais em estudos de toxicologia, (2) refinar as estimativas de toxicidade

1 e (3) substituir estudos *in vivo* – denominados 3 R's de testes alternativos
2 (*reduction, replacement, refinement*) (QUINN, 2014).

3 Os estudos *in vitro* tem demonstrado através de diversas evidências, que
4 podem oferecer dados rápidos, relativamente precisos e relevantes, e ainda, que
5 os sistemas de modelagem estão surgindo como uma grande ajuda para decifrar e
6 prever os fenômenos fisiológicos e biológicos. Essas metodologias de modelagem
7 são ricas e variadas, que além de conterem ferramentas de predição *in vitro* e *in*
8 *vivo*, envolvem técnicas teóricas ou *in silico* (DANCHIN, 2022).

9 Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi investigar a atividade de cinco
10 extratos de espécies de samambaias e de três moléculas análogas a tebufenozida
11 no receptor de ecdisteróides de *Drosophila melanogaster*, utilizando parâmetros
12 biológicos e de toxicidade a fim de verificar se os compostos conseguem, a nível
13 bioquímico, percorrer o trajeto até o sítio de ação do receptor de ecdisteróides, com
14 ação efetiva, seja ela antagonista ou agonista.

1 **Artigo 1**

2 **Ação de extratos de samambaias em células embrionárias de *Drosophila***
3 ***melanogaster*: Citotoxicidade e atividade no receptor de ecdisteróides**

4

5

6

7

8 *Artigo redigido nas normas da revista “Phytochemistry Reviews - Fundamentals
9 and Perspectives of Natural Products Research” (versão em português)

Ação de extratos de samambaias em células embrionárias de *Drosophila melanogaster*: Citotoxicidade e atividade no receptor de ecdisteróides

Juliana Wegner¹, Jissela Gaibor¹, Bruno Freitas Farias¹ e Moisés João Zotti¹

¹ Laboratório de Entomologia Molecular, Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas (UFPeL), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Autor correspondente:

Juliana Wegner

Laboratório de Entomologia Molecular, Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas (UFPeL), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: juliana.wegner1@gmail.com

1 RESUMO

2 A resistência a pesticidas sintéticos é uma preocupação crescente, levando à busca
3 por inseticidas naturais, e, nesse contexto, os fitoecdisteroides surgem como
4 alternativas promissoras. O objetivo desta pesquisa consistiu em investigar os
5 efeitos de extratos vegetais de samambaias em células embrionárias de *Drosophila*
6 *melanogaster*, e analisar respostas celulares como citotoxicidade e ação no
7 receptor de ecdisteróides. Os extratos foram obtidos de folhas de *Christella* sp.,
8 *Serpocaulon* sp., *Nephrolepis cordifolia*, *Blechnum occidentale* L. e *Pteridium*
9 *aquilinum*. Os ensaios consistiram na transfecção de células embrionárias de
10 linhagem S2 (*Drosophila melanogaster*) com o plasmídeo B.act.ere.luc. Foi
11 avaliada a atividade do hormônio 20-hidroxiecdisônio e de cinco extratos vegetais,
12 citotoxicidade, efeito agonista e efeito antagonista. No ensaio agonista, o extrato de
13 *Blechnum occidentale* L. produziu aproximadamente 76% da luminescência em
14 comparação ao controle positivo. Os demais extratos testados não apresentaram
15 efeito significativo comparado ao controle positivo. No ensaio antagonista, os
16 extratos de *Blechnum occidentale* L. e *Christella* sp. inibiram a luminescência do
17 receptor nuclear quase em sua totalidade (99,93% e 99,94%, respectivamente),
18 *Pteridium aquilinum* inibiu em 85,77%, *Nephrolepis cordifolia* L. inibiu 79,6% e
19 *Serpocaulon* sp. inibiu 56,94%, em comparação ao controle positivo. Com base nos
20 resultados obtidos, pode-se concluir que os extratos de samambaias apresentam
21 potencial para serem utilizados no controle de moscas-das-frutas, uma vez que
22 foram capazes de atuar no receptor de ecdisteróides de *Drosophila melanogaster*.

23 **Palavras-chave:** *Drosophila melanogaster*; extratos vegetais; linhagem celular;
24 receptor de ecdisteróides; samambaias.

ABSTRACT

Increasing resistance to synthetic pesticides has led to the search for natural insecticides, and in this context, phytoecdysteroids emerge as promising alternatives. The objective of this research was to investigate the effects of fern plant extracts on *Drosophila melanogaster* embryonic cells, analyzing cellular responses such as cytotoxicity and action on the ecdysteroid receptor. Extracts were obtained from the leaves of *Christella* sp., *Serpocaulon* sp., *Nephrolepis cordifolia*, *Blechnum occidentale* L., and *Pteridium aquilinum*. The assays involved transfecting S2 (*Drosophila melanogaster*) embryonic cells with the B.act.ere.luc plasmid. The activity of the 20-hydroxyecdysone hormone and five plant extracts, cytotoxicity, agonist effect, and antagonist effect were evaluated. In the agonist assay, the *Blechnum occidentale* L. extract produced approximately 76% of luminescence compared to the positive control. The other tested extracts did not show a significant effect compared to the positive control. In the antagonist assay, the *Blechnum occidentale* L. and *Christella* sp. extracts inhibited nuclear receptor luminescence almost entirely (99.93% and 99.94%, respectively), *Pteridium aquilinum* inhibited by 85.77%, *Nephrolepis cordifolia* L. inhibited by 79.6%, and *Serpocaulon* sp. inhibited by 56.94%, compared to the positive control. Based on the results, it can be concluded that fern extracts have the potential to be used in fruit fly control, as they were able to act on the ecdysteroid receptor of *Drosophila melanogaster*.

Keywords: *Drosophila melanogaster*; plant extracts; cell line; ecdysteroid receptor; ferns.

1 **Introdução**

2 Pragas e patógenos representam uma ameaça para todos os elementos da
3 segurança alimentar, afetando desde a etapa de produção até a distribuição,
4 enquanto também impactam a qualidade e o valor nutricional dos alimentos
5 (Savary et al., 2019). Desde 2014, no sul e sudeste do Brasil, a ocorrência de
6 *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) aumentou em frutos de casca fina,
7 como morangos, mirtilos (*Vaccinium myrtillus*), cerejas (*Prunus* sp.), amoras
8 (*Morus* sp.) e framboesas (*Rubus idaeus*) (Andreazza et al., 2017; Bernardi et
9 al., 2017).

10 O dano pode ocorrer em diferentes partes dos vegetais ocasionando queda
11 de valor comercial, de produção e até morte das plantas. Cerca de 100 espécies
12 de moscas frugívoras são consideradas pragas fitófagas, uma vez que suas
13 larvas atacam a polpa e/ou as sementes de frutos cultivados e culturas de
14 relevância na agricultura. (Virgilio et al., 2014).

15 Embora certos pesticidas ainda demonstrem eficácia no manejo dessas
16 pragas, a preocupação com o desenvolvimento de resistência é uma constante.
17 (Andreazza et al., 2016), sendo que *Drosophila suzukii* já apresenta resistência
18 a alguns produtos químicos (Mota-Sanchez e Wise 2023).

19 Sabe-se que as plantas produzem uma enorme variedade de produtos
20 naturais com estruturas químicas altamente diversas (Valli et al., 2018). A função
21 original atribuída aos fitoecdisteroides era contribuir para a dissuasão de insetos
22 predadores (Speed et al., 2015). Neste contexto, a evolução das defesas
23 químicas nas plantas provavelmente está ligada ao surgimento de metabólitos
24 secundários, que são frequentemente produzidos como subprodutos durante a
25 síntese de produtos metabólicos primários (De Geyter 2012). Contudo, os

extratos podem ter diferenças em suas respostas tóxicas, devido à diferença de concentração, bem como à diversidade dos metabólitos secundários presentes nos extratos (Das et al., 2021).

Os metabólitos secundários, compostos químicos produzidos pelas plantas, não desempenham um papel direto no crescimento ou reprodução, mas frequentemente têm propriedades bioativas que podem ser de interesse agrônomo, biotecnológico e industrial (Bajguz et al., 2015). Geralmente, a maioria dos artigos científicos sugere que o efeito sinérgico é melhor do que o efeito de um único composto sozinho. Como a resistência a meios sintéticos de controle aumenta, a busca por novos agentes e métodos de controle é fundamental para a proteção futura de cultivos.

Os primeiros ecdisteróides de origem vegetal foram descobertos em uma conífera *Podocarpus nakaii* Hayata em 1968 e denominaram-se ponasteronas A, B e C (Hoffmeister et al., 1968). Outros ecdisteróides, especialmente 20-hidroxiecdisona, foram encontrados em outras plantas do gênero *Podocarpus*, em samambaias do gênero *Polypodium*, em espécies do gênero *Achyranthes* (Amaranthaceae) e plantas do gênero *Artemisia*, pertencente à família Asteraceae (Lafont et al., 2021).

Segundo Arif et al. (2022), os ecdisteróides ou compostos relacionados estão presentes em angiospermas, gimnospermas, algas, fungos, organismos aquáticos e alguns artrópodes e invertebrados, e cerca de 500 fitoecdisteróides diferentes são encontrados em mais de 100 plantas terrestres. No que diz respeito às samambaias, ecdisteróides foram encontrados em mais de 50% das espécies rastreadas pertencentes às famílias Polypodiaceae, Pteridaceae e Blechnaceae (Wu et al., 2010).

Ainda, a propriedade tóxica de samambaias, incluindo *Pteridium aquilinum* (L) Kuhn (Dennstaedtiaceae) foi relatada, provavelmente devido à presença de fitoecdisteróides que inibem a ecdise e desempenham um papel defensivo no aumento da imunidade contra ataques de insetos fitófagos (Jones e Firn 1978). Takemoto et al. (1968) identificaram fitoecdisteróides presentes em plantas da família Blechnaceae, e a atividade inseticida de samambaias foi previamente identificada como sendo causada por fitoecdisteróides.

Vários autores ponderaram sobre a ação de fitoecdisteróides em insetos. Mannan et al. (2008) discorreram sobre os efeitos tóxicos de determinadas espécies de samambaias sobre *Spodoptera littura* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa armígera* (Lepidoptera: Noctuidae). Arnault e Sláma (1986) alimentaram larvas de *Acrolepiopsis assectella* (Zell) com dietas contendo fitoecdisteróides, resultando em efeitos fisiopatológicos. Lovatto et al. (2016) utilizaram extrato aquoso de *Pteridium aquilinum* em afídeos *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera:Aphididae), resultando em ação repelente e inseticida, redução da prole e sobrevivência, sugerindo o declínio populacional dos afídeos expostos aos tratamentos. Selvaraj et al. (2004) testaram extratos de *Pteridium aquilinum* em larvas de *Spodoptera littura* e *Helicoverpa armigera*, resultando em interrupção de desenvolvimento e infertilidade.

No contexto da toxicologia, os ensaios *in vivo* e *in vitro* são amplamente utilizados na avaliação de toxicidade de produtos químicos (Tschiche et al. 2022). Embora ensaios *in vivo* com insetos forneçam informações úteis sobre a toxicidade para o organismo alvo, são demorados e exigem o uso de altos níveis dos compostos testados. Em contraste, ensaios *in vitro* são mais reprodutíveis e muito mais rápidos (He et al., 2023). Diante disso, surge o uso de linhagens de

células de insetos como um substituto para estudos de insetos inteiros para minimizar a variabilidade ao determinar a eficácia com uma quantidade relativamente pequena de produto de teste, área que até agora tem sido amplamente negligenciada.

Estudos *in vitro* utilizam uma parte específica, seja um órgão, tecido ou célula, de um determinado organismo para estudá-lo sob um ambiente controlado. As vantagens dos estudos *in vitro* são tempo e custos potencialmente reduzidos, além de uma boa representatividade, visto que são desenvolvidos utilizando as células ou tecidos do organismo alvo (Singh et al., 2018).

Portanto, neste artigo foram investigados os efeitos dos extratos vegetais de samambaias em células embrionárias de *Drosophila melanogaster*, analisando respostas celulares, como citotoxicidade e ação agonista e/ou antagonista no receptor do ecdisônio.

Materiais e métodos

Linhagem celular

A cultura celular foi obtida de coleção estabelecida no Laboratório de Biotecnologia Viral – LABV do Centro de Desenvolvimento e Inovação (CDI) do Instituto Butantan. Células S2, provenientes de células embrionárias de *Drosophila melanogaster*, foram mantidas a 27°C em meio de cultura celular Insect-XPRESS™ Protein-free (Lonza®), em frascos de meio de cultura de 25cm². A qualidade das células foi monitorada com uso de microscopia óptica com o microscópio invertido Olympus IX53, e lente com aumento de 40x.

Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular utilizando foi realizado seguindo protocolo descrito por Strober (2015), cuja técnica envolve o uso de azul de tripano (Trypan Blue). O procedimento adotado consistiu na coleta de uma alíquota de células, e adicionado mesma alíquota de corante Trypan Blue 0,4% (Invitrogen™).

Este método fornece uma estimativa da proporção de células vivas em sua amostra. Uma alta porcentagem de viabilidade é indicativa de um cultivo celular saudável, enquanto uma baixa porcentagem pode indicar que as células estão danificadas ou morrendo.

Plasmídeo repórter

O ensaio repórter têm como base a ativação do receptor de ecdisteróides (EcR) para induzir a expressão da enzima luciferase. O gene repórter contém a enzima luciferase, originária do vagalume *Photinus pyralis* (Linnaeus, 1767) (Coleoptera: Lampyridae). O plasmídeo repórter utilizado possui um promotor basal de actina (B.act.) precedido por sete cópias do elemento resposta ao ecdisônio do gene *Drosophila hsp27* (ere.), seguido pelo gene repórter do vagalume (luc.) (B.act.ere.luc), e encerra-se com um sinal de terminação (Figura 1) (Zotti et al., 2014).

O plasmídeo foi clonado em bactérias competentes *Escherichia coli* (T. Escherich, 1885) (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae) através de choque térmico, que consiste na inserção do plasmídeo em uma cepa de bactérias competentes, induzindo a multiplicação das mesmas com o plasmídeo inserido. Após uma incubação das bactérias com o plasmídeo no gelo por 30 minutos, o complexo foi aquecido abruptamente a 42°C por 50 segundos, e posteriormente transferido imediatamente para gelo por dois minutos.

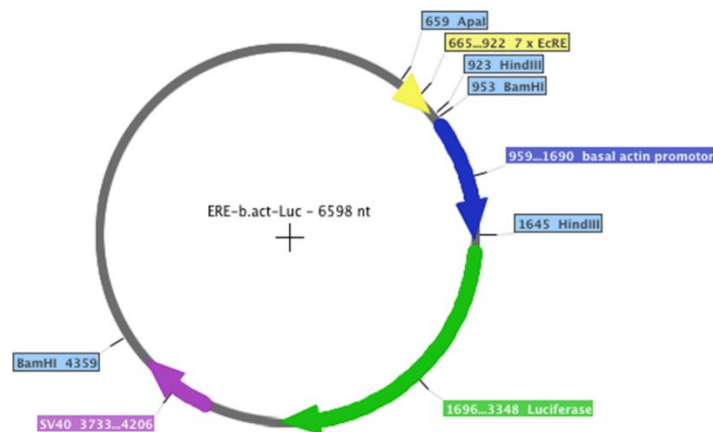


Figura 1 Diagrama representando o plasmídeo repórter contendo o gene da luciferase. Fonte: Zotti et al. (2014).

Foi adicionado meio LB (Luria Bertani), às bactérias transformadas, e transferido para uma incubadora a 37°C por 1 hora, sob agitação de 220 rpm. Posteriormente, as bactérias foram adicionadas à uma placa de petri, contendo ampicilina, e incubadas a 37°C por 16 horas, resultando apenas nas bactérias transformadas que se multiplicaram e formaram colônias na placa de petri.

Para confirmar que as colônias da placa continham o plasmídeo B.act.ere.luc, foi realizado um PCR (Polimerase chain reaction- Reação em cadeia da polimerase) de colônia, com colônias escolhidas aleatoriamente. Para a confirmação do plasmídeo por meio de PCR, foram desenhados primers específicos para o gene da luciferase, cujas sequências foram GTCAGATTCTCGCATGCCAG (Forward) e GTCATCGTCTTTCCGTGCTC (Reward).

Cada reação de PCR foi composta por 4.0 µL de 5X GoTaq®Flexi Reaction Buffer (Promega), 1.2 µL de MgCl₂ (Promega), 0.6 µL de dNTPs, 0.6 µL de primer Forward, 0.6 µL de primer Reward, 0.2 µL de enzima GoTaq®Flexi DNA Polymerase (Promega), 0.9 µL de amostra da amostra da colônia e 12.4 µL

de água ultrapura, totalizando uma reação de 20.5 µL por amostra. As reações foram submetidas à amplificação em termociclador. O programa utilizado se baseou em: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos; e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de todas as reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), utilizando como marcador o Ladder 1kb (Invitrogen™). Foram aplicados 4µL de produto da PCR no gel, o qual foi corado com 2µL de GelRed, e visualizado em fotodocumentador.

Após constatado que as colônias selecionadas continham o plasmídeo B.act.ere.luc., foi realizada a multiplicação das bactérias. Este procedimento foi realizado, com o uso de uma ponteira esterilizada, retirando uma porção das colônias e levando para um tubo plástico com 5ml de meio LB Broth (Sigma-Aldrich) e 7,5 µL de ampicilina. Após uma incubação de aproximadamente 16 horas à 37°C, o plasmídeo foi purificado com o kit de purificação Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

Por fim, para constatar a integridade do plasmídeo purificado, foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1% com a amostra pura.

Extratos de samambaias

Foram coletadas folhas de três espécies de samambaias (*Christella* sp., *Serpocaulon* sp., e *Nephrolepis cordifolia*) em Nova Petrópolis, localização 29°21'38.8"S 51°04'31.9"W, cujo Bioma é Mata Atlântica, apresenta clima subtropical e vegetação regional característica de floresta estacional decidual

submontana e floresta ombrófila mista montana; solo neossolo litólico distrófico e decomposição basáltica com relevo forte ondulado (Ambiconsult, 2012).

Foram coletadas folhas de uma espécie de samambaia (*Blechnum occidentale* L.) no Campus Capão do Leão (Universidade Federal de Pelotas), localização 31°48'06.7"S 52°25'08.1"W, cujo Bioma é Pampa, apresenta clima subtropical e vegetação regional característica de floresta estacional semidecidual; solo predominantemente composto pela associação de planossolos solódicos e de Gleissolo pouco húmico e decomposição granítica (Severo, 1999).

E, por fim, foram coletadas as folhas de uma espécie de samambaia (*Pteridium aquilinum*) em Pelotas, localização 31°45'50.5"S 52°14'41.2"W, cujo Bioma é Pampa, apresenta clima subtropical e vegetação regional característica de floresta estacional semidecidual; solo predominantemente composto pela associação de planossolo e Gleissolo (Nörnberg e Rehbein, 2020).

O processo de extração envolveu as seguintes etapas: Moagem das folhas individualmente em moinho de facas modelo SL 31 (SOLAB), cedido gentilmente pelo Laboratório de Pós-Colheita, Industrialização e Qualidade de Grãos (LABGRÃOS-UFPel). Foram pesadas todas as amostras e adicionado 1 grama (g) de planta para 5 mililitros (mL) de solvente extrator metanol. A mistura foi adicionada em vidros âmbar e agitados vigorosamente a 200 rpm em uma incubadora modelo TE-420, cedido gentilmente pelo Laboratório de Interação Planta-Patógeno (LIPP-UFPel), por 7 dias, a fim de garantir que os compostos fossem solubilizados no metanol. Após a extração, a mistura foi filtrada com papel de filtro para separar a parte sólida e líquida da mistura, e coletada em um recipiente âmbar. Posteriormente, utilizou-se o rotaevaporador Laborota 4000

(Heidolph, Alemanha), acoplado a banho ultratermostático com circulação (Q214M2, Quimis, Brasil) e bomba de vácuo, cedido pelo Laboratório de Metabolismo Secundário (LabMS-UFPeI), a temperatura de 60°C, a fim de evaporar o solvente e concentrar os metabólitos secundários. O concentrado de cada planta foi acondicionado em eppendorfs e armazenado em freezer para posterior diluição seriada.

Ensaio de citotoxicidade

Para o teste de citotoxicidade, foram preparadas séries de diluições dos extratos em etanol absoluto, resultando em concentrações variadas dos extratos. As concentrações de células S2 usadas para montar os ensaios de citotoxicidade foram de 500.000 células/ml e depositadas em placas de cultura de 24 poços (KASVI®). Posteriormente, foi adicionado 5µL dos extratos diluídos em álcool absoluto em cada poço, sendo posteriormente incubada a 27°C por 24 horas.

Cada tratamento foi realizado em triplicata, e cada experimento foi repetido pelo menos 2 a 3 vezes. Após o período de incubação, a viabilidade foi avaliada usando uma solução do corante Trypan Blue 0,4% (Invitrogen™). Esse reagente tem capacidade de penetração na membrana celular se as células estiverem mortas, resultando em uma coloração azul-escura. A análise estatística foi conduzida usando o teste ANOVA para comparar as médias dos extratos com a média do controle dentro de cada grupo de concentração. A análise dos dados foi realizada com o software Prism v8 da GraphPad Software Inc.

Transfecção celular

Os extratos foram testados nas células S2, a fim de avaliar como afetam a expressão do gene repórter de luciferase no EcR. Para isso, as células S2 foram transfectadas com o plasmídeo repórter, utilizando o reagente lipossômico Escort™ IV (Sigma Aldrich). Para tal, utilizou-se uma placa de cultivo de células de fundo chato de 24 poços (Kasvi), e cada poço foi preenchido com 500.000 células/mL, por aproximadamente 45 minutos, a fim de aderirem no fundo do poço.

Em um tubo falcon 15 mL adicionou-se 497 µL de meio de cultura, 3 µL do reagente lipossômico Escort™ IV (Sigma Aldrich) e 100 ng do plasmídeo repórter (por poço), e posteriormente ficando em repouso em temperatura ambiente por 30 minutos. Após o período de incubação, o meio de cultura das células foi substituído pela solução contendo meio de transfecção, ficando em incubação em estufa a 27°C pelo período de cinco horas.

Ensaio agonista e antagonista

Após a remoção do meio de transfecção e substituição por meio de cultura normal, 5 µL de cada extrato diluído, nas concentrações em etanol absoluto foi adicionado a cada poço.

Para as curvas de dose-resposta e experimentos de atividade agonista, a luminescência foi mensurada 24 horas após a adição dos tratamentos (extratos). Para atividade antagonista, primeiramente foi adicionado 5 µL dos extratos, e incubado por 24h a 27°C. Após a primeira incubação, foi adicionado o hormônio 20-Hidroxicedisônio (controle) na concentração de 1000µM e incubado novamente, por 24 horas a 27°C.

Após os correspondentes períodos de incubação, com uma micropipeta as células foram transferidas para uma placa branca de 96 poços (Kasvi), sendo que cada poço recebeu 100 µL da suspensão de células (aproximadamente 50.000 células), e realizado em triplicata técnica.

Os resultados para os ensaios agonista e antagonista foram mensurados em forma numérica de luminescência (lúmens) emitidos pela enzima luciferase frente à adição do substrato luciferina, utilizando o kit Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega). Foram adicionados 100 µL do substrato da luciferase, e mensurado com o luminômetro SpectraMax M5e no Laboratório de Bioquímica Vegetal (UFPEL). Cada experimento foi realizado de duas a três vezes.

As respectivas logEC₅₀ (valores de concentração efetiva mediana de indução de 50% de luminescência) com 95% de confiabilidade foram calculados com o software Prism v8 (GraphPad Software Inc. La Jolla, Ca). Os dados de efeito agonista foram calculados pelo teste ANOVA a 5% de confiabilidade, tendo como controle positivo 20-Hidroxicdisônio, na concentração de 1000µM. Já para efeito antagonista, foram considerados extratos eficientes aqueles que reduziram em >15% a luminescência quando comparado ao controle positivo com 20-Hidroxicdisônio.

Resultados e Discussão

Plasmídeo repórter

Após o processo de clonagem do plasmídeo nas bactérias, foi realizado um PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) nas colônias transformadas. O objetivo do PCR foi amplificar a região específica do DNA que continha o gene da luciferase. Para confirmar se o PCR foi bem-sucedido e se as colônias

continham o plasmídeo desejado, foi realizada a primeira eletroforese em gel de agarose. Nesse caso, os produtos amplificados pelo PCR foram separados e visualizados no gel para verificar o tamanho e a presença da banda esperada (Figura 2).

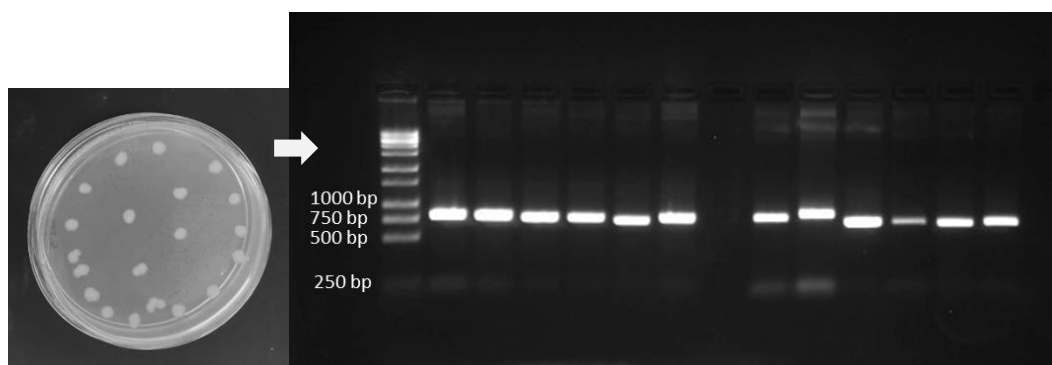


Figura 2 Colônias de *Escherichia coli* transformadas com o plasmídeo B.act.ere.luc. foram cultivadas em placas de Petri contendo meio LB e ampicilina. Somente as bactérias que incorporaram o plasmídeo conseguiram formar colônias. Na sequência, apresentamos a fotodocumentação do PCR realizado em 12 colônias selecionadas. Fonte: Wegner, J. (2023).

Após confirmar a presença do plasmídeo nas colônias transformadas, as bactérias foram multiplicadas e o plasmídeo foi purificado com kit de purificação Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Em seguida, para verificar a integridade do plasmídeo purificado, foi realizada uma segunda eletroforese em gel de agarose. Nesse caso, o plasmídeo purificado foi aplicado no gel, e o tamanho da banda observada após a eletroforese foi comparado ao tamanho esperado do plasmídeo (aproximadamente 6500 pares de bases) (Figura 3).

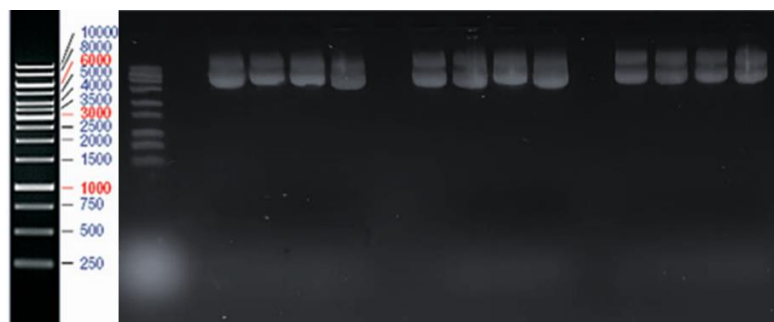


Figura 3 A integridade do plasmídeo B.act.ere.luc. foi avaliada por meio de uma eletroforese em gel de agarose a 1%. Fonte: Wegner, J. (2023)

Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade revelaram que os extratos de samambaias apresentaram diferentes níveis de toxicidade para a cultura de células. As concentrações nas quais a citotoxicidade foi observada estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 Tabela de Citotoxicidade por concentração de extratos de samambaias

Espécie	Concentração mg/mL	Viabilidade celular % Média ± Desvio Padrão
<i>Nephrolepis cordifolia</i> (L.) C.Presl	20	55,7±1,53
	2	71,5±1,32
	0,2	81,7±2,08
	0,02	86,2±1,89
	0,002	89,0±1,00
<i>Serpocaulon</i> sp.	20	0,00±0,00
	0,2	89,7±1,53
	0,02	93,3±1,15
<i>Christella</i> sp.	20	84,9±1,65
	0,2	93,7±1,53
<i>Blechnum occidentale</i> L.	20	93,3±0,58
<i>Pteridium aquilinum</i>	20	20,17±2,75
	0,2	90,17±1,06
Célula (controle negativo)		
Etanol (controle negativo)		

Entre as espécies de samambaias testadas, é importante observar que a espécie *Blechnum occidentale* L. se destacou notavelmente em termos de viabilidade celular. Na concentração mais alta, a viabilidade celular foi notavelmente maior, em comparação com as demais espécies, atingindo aproximadamente 93%. Esses resultados sugerem que a espécie *Blechnum occidentale* L. pode ser uma fonte promissora de compostos, e que merece uma investigação mais aprofundada.

Atividade agonista

Segundo Singh et al. (2020), um composto mais potente é aquele com o $\log EC_{50}$ mais baixo. O composto 20-Hidroxiecdisonio (controle) demonstrou alta atividade agonista como esperado, apresentando $\log EC_{50}$ de -4.954,5, indicando que a substância é eficaz em concentrações relativamente baixas para produzir seu efeito desejado (Figura 4).

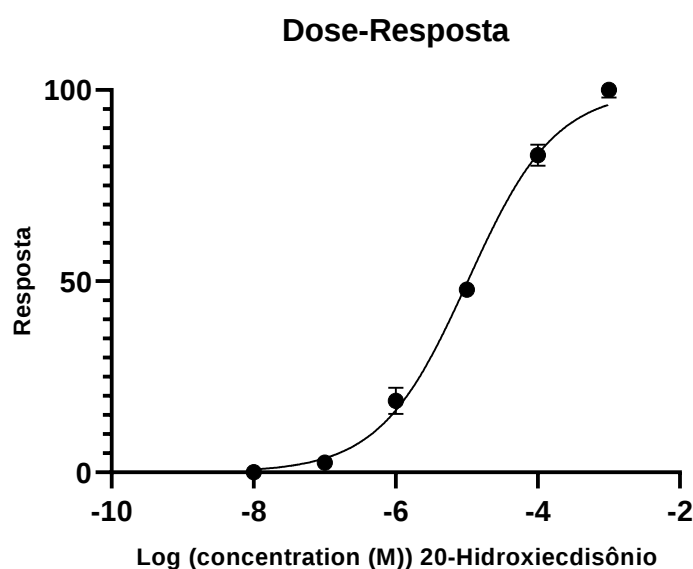


Figura 4 Curvas sigmóides de dose-resposta do controle positivo 20E. Fonte: Wegner, J. (2023)

Em relação à atividade agonista, os extratos foram testados na concentração máxima não tóxica para as culturas celulares. O extrato de *Blechnum occidentale* L. apresentou efeito significativo quando comparado à concentração de 1000 μ M de 20-Hidroxiecdisonio (20E), e expressou logEC₅₀ de -1.514.

A logEC₅₀ de *Blechnum occidentale* L. é consideravelmente maior em comparação com o controle, indicando que o extrato testado é menos potente e requer uma concentração mais alta para produzir 50% do efeito máximo. Entretanto, ainda assim, o composto em questão parece ter uma boa potência (Figura 5), indicada pela LogEC₅₀ negativa, e uma baixa concentração efetiva 50%.

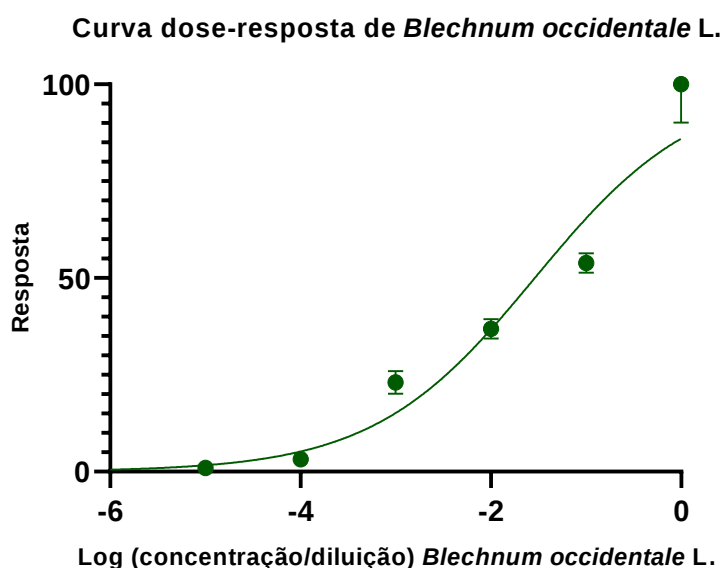
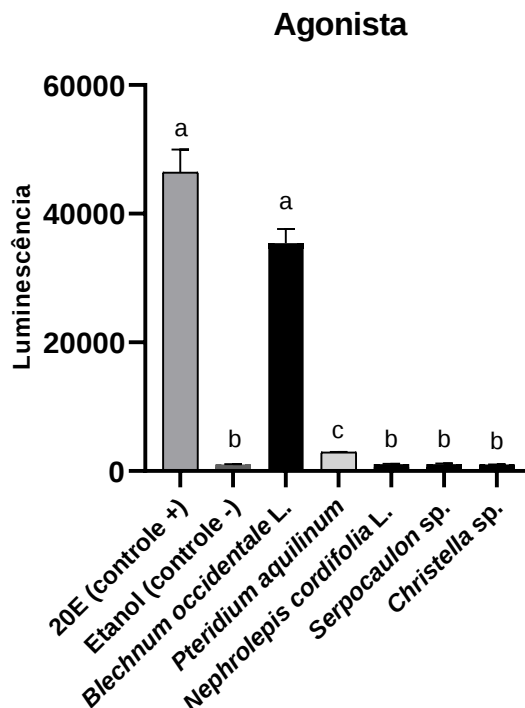


Figura 5 A curva dose-resposta do extrato de *Blechnum occidentale* L. destaca a relação entre a concentração do extrato e a resposta biológica, ilustrando como diferentes doses influenciam a resposta. Fonte: Wegner, J. (2023)

O extrato de *Blechnum occidentale* L. produziu aproximadamente 76% da luminescência em comparação ao controle positivo. Os demais extratos testados, não apresentaram efeito significativo comparado ao controle positivo

1 (Figura 6). Os resultados mostram que houve diferenças significativas entre as
 2 médias dos grupos ($p < .001$).



3
 4 **Figura 6** Efeito agonista observado para os extratos de samambaias na linhagem
 5 celular S2. A atividade agonista das moléculas foi comparada com a
 6 concentração de 1000µM do hormônio 20-Hidroxiectdisônio (20E) e etanol como
 7 controle. Há diferença significativa do mensuramento da luminescência medida
 8 em comparação ao controle com 20-Hidroxiectdisônio segundo a análise de
 9 variância (ANOVA). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente
 10 significativas. Grupos com a mesma letra não apresentam diferenças
 11 significativas entre si ($p < 0,05$, teste de Tukey). Fonte: Wegner, J. (2023)

12 O teste ANOVA de Welch a um fator foi realizado para avaliar se há
 13 diferenças significativas entre os grupos em relação à variável analisada. O
 14 resultado do teste ANOVA mostrou os valores $F = 476$, $gl_1 = 6$, $gl_2 = 5,81$, $p < .001$,
 15 indicando que há diferenças significativas entre os grupos.

16 A tabela descritiva de grupo (Tabela 2) apresenta as médias, desvios-
 17 padrão e erros-padrão dos grupos *Blechnum occidentale* L., *Pteridium aquilinum*,
 18 *Nephrolepis cordifolia* L., *Serpocaulon* sp., *Christella* sp., etanol e 20E. Essas

medidas descritivas são importantes para entender as características de cada grupo e compará-los entre si. O grupo com a maior média de valores na variável analisada foi *Blechnum occidentale* L., com média de 35.412,7 lúmens, não diferindo estatisticamente do controle positivo 20E.

Tabela 2 Médias, desvios-padrão e erros-padrão dos grupos de extratos no ensaio agonista

	N	Média	Desvio-padrão	Erro-padrão
<i>Blechnum occidentale</i> L.	6	35.412,7 ^a	2.233,12	1.289,29
<i>Pteridium aquilinum</i>	6	2.904,1 ^c	89,85	51,88
<i>Nephrolepis cordifolia</i> L.	6	54,0 ^b	11,56	6,68
<i>Serpocaulon</i> sp.	6	139,0 ^b	4,70	2,72
<i>Christella</i> sp.	6	49,9 ^b	35,81	20,67
Etanol (controle -)	6	51,5 ^b	8,58	4,95
20E (controle +)	6	46.448,0 ^a	3.522,14	2.033,51

De acordo com o Teste de Levene (Tabela 3), há evidências estatísticas para rejeitar a hipótese nula de homogeneidade de variâncias entre os grupos. O valor de p (0,002) é menor que o nível de significância comum de 0,05, indicando que a diferença nas variâncias entre os grupos é estatisticamente significativa. O valor de p indica a probabilidade de se obter um resultado tão extremo quanto o observado, considerando que não há diferença real entre os grupos. Quando o valor de “p” é muito baixo, isso indica que é muito improvável que o resultado observado seja devido ao acaso, o que sugere que há diferença real entre os grupos.

1 **Tabela 3** Teste à Homogeneidade de Variâncias (Levene) do ensaio agonista

	F	gl1	gl2	p
A	6.41	6	14	0.002

2 O teste de Tukey foi realizado para identificar quais grupos apresentaram
3 diferenças significativas. De acordo com os resultados, o grupo *Blechnum*
4 *occidentale* L. apresentou diferença significativa em relação aos demais grupos
5 ($p < .001$).

6 **Atividade antagonista**

7 Em relação à atividade antagonista dos extratos, os resultados indicam
8 que o efeito antagonista variou entre as diferentes espécies de plantas, sendo
9 mais pronunciado em algumas em comparação com outras (Figura 7). Os
10 extratos foram testados na concentração máxima não tóxica para a cultura
11 celular.

12 Os resultados obtidos em comparação ao 20-Hidroxiecdisonio,
13 demonstram que os extratos de *Blechnum occidentale* L. e *Christella* sp. inibiram
14 a luminescência do receptor nuclear quase em sua totalidade (99,93% e 99,94%,
15 respectivamente). Todos os demais extratos apresentaram inibição da
16 luminescência do receptor nuclear: *Pteridium aquilinum* inibiu em 85,77%,
17 *Nephrolepis cordifolia* L. inibiu 79,6% e *Serpocaulon* sp. inibiu 56,94%.

18

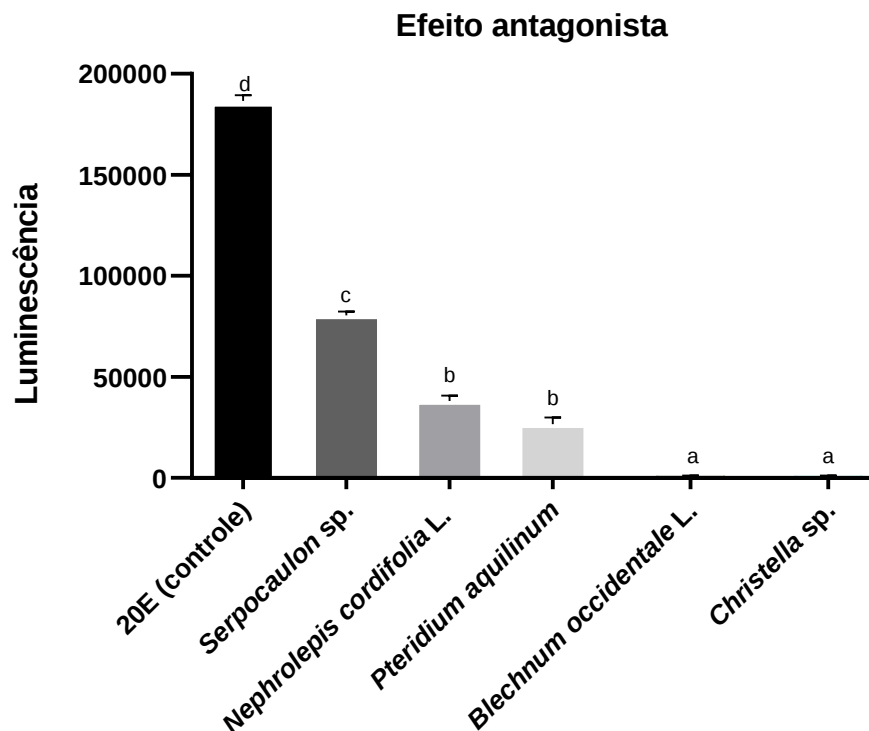


Figura 7 Efeito antagonista observado para os cinco extratos na linhagem celular S2. A atividade antagonista dos extratos foi comparada com a concentração de 1000µM do hormônio 20-Hidroxiecdisonio (20E). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Grupos com a mesma letra não apresentam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$, teste de Tukey).
 Fonte: Wegner, J. (2023)

O teste ANOVA de Welch a um fator foi realizado para avaliar se há diferenças significativas entre os grupos em relação à variável analisada. O resultado do teste ANOVA de Welch mostrou um valor $F=5.197$, $gln=5$, $gld=5.18$, $p < .001$, indicando que há diferenças significativas entre os grupos.

A tabela descritiva de grupo (Tabela 4) mostram a média, desvio-padrão e erro-padrão para cada grupo. O grupo com a maior média de valores na variável analisada foi *Serpocaulon sp.*, com média de 80.382 lúmens.

Tabela 4 Médias, desvios-padrão e erros-padrão dos grupos de extratos no ensaio antagonista

	N	Média	Desvio-padrão	Erro-padrão
<i>Blechnum occidentale</i> L.	3	142 ^a	20.9	12.1
<i>Pteridium aquilinum</i>	3	38.092 ^b	1.050,9	606.7
<i>Nephrolepis cordifolia</i> (L.)	3	26.574 ^b	1.323,4	764.1
<i>Serpocaulon</i> sp.	3	80.382 ^c	809,8	467.5
<i>Christella</i> sp.	3	122 ^a	21,9	12.6
20E (controle)	3	186.645 ^d	4.662,0	2.691,6

A tabela apresenta as médias, desvios-padrão e erros-padrão dos grupos *Blechnum occidentale* L., *Pteridium aquilinum*, *Nephrolepis cordifolia* L., *Serpocaulon* sp., *Christella* sp. e 20E. Essas medidas descritivas são importantes para entender as características de cada grupo e compará-los entre si.

De acordo com o Teste de Levene (Tabela 5), há evidências estatísticas para rejeitar a hipótese nula de homogeneidade de variâncias entre os grupos. O valor de p (0,003) é menor que o nível de significância de 0,05, indicando que a diferença nas variâncias entre os grupos é estatisticamente significativa.

Tabela 5 Teste à Homogeneidade de Variâncias (Levene) do ensaio antagonista

F	gl1	gl2	p
6.95	5	12	0.003

O teste de Tukey foi realizado para comparar as médias dos grupos entre si. Os grupos comparados foram: *Blechnum occidentale* L., *Pteridium aquilinum*, *Nephrolepis cordifolia* L., *Serpocaulon* sp., *Christella* sp. e 20-Hidroxiccdisônio (controle positivo). Os resultados do teste de Tukey mostraram diferenças significativas entre os grupos, com valores de $p < .001$ para todas as

comparações, exceto para a comparação entre *Blechnum occidentale* L. e *Christella* sp., que apresentou um valor de $p = 0.0122$.

Composição química dos extratos

Segundo Waswa et al. (2021), o gênero *Blechnum* apresenta uma série de compostos medicinais, e uma das classes de compostos encontrados são os ecdisteróides, obtidos através de isolamento de diferentes espécies de *Blechnum*. Entre esses compostos, foram detectados ecdisona, ponasterona e shidasterona, que possuem alta atividade de ligação ao receptor de ecdisteroides em células Kc de *Drosophila melanogaster* (Arai et al., 2008) e podem ter propriedades anti-alimentares e inseticidas.

Embora as pesquisas indiquem a presença de ecdisteróides em plantas do gênero *Blechnum*, ocorre muita variabilidade na composição de metabólitos entre populações, e comumente ocorrem variações em larga escala, como entre regiões ou latitudes. Devido a isso, a realização de cromatografia nos extratos é de grande importância para confirmar e aprofundar a compreensão da variabilidade na composição de metabólitos, especialmente ecdisteróides, em plantas do gênero *Blechnum*. Apesar de existir evidências de presença desses compostos, a cromatografia oferece uma abordagem analítica precisa e discriminatória que pode revelar nuances na composição química.

Para a identificação dos compostos que estão agindo como antagonista, o desafio é maior. A realização de cromatografia em uma amostra rica em extratos, como os derivados de samambaias, pode revelar uma profusão de picos cromatográficos, cada um representando um componente distinto. Contudo, a simples identificação visual não é suficiente para decifrar o enigma

do composto antagonista. Dezenas de substâncias podem coexistir, dificultando o isolamento e a caracterização do componente relevante.

A ambiguidade da atividade antagonista adiciona camadas adicionais à dificuldade. Enquanto um efeito agonista pode sugerir a presença de um ecdisteróides, a manifestação simultânea de um efeito antagonista no mesmo extrato confunde a narrativa. Paira, portanto, a dúvida, se este antagonismo seria um resultado de um único composto ou da sinergia de múltiplos elementos.

Considerações finais:

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que os extratos de samambaias apresentam potencial para serem utilizados no controle de moscas-das-frutas, uma vez que foram capazes de atuar no receptor de ecdisteróides de *Drosophila melanogaster*. No entanto, são necessários estudos adicionais para avaliar a eficácia desses extratos em condições de campo e determinar a melhor forma de aplicação. Estudos dos extratos que apresentaram antagonismo devem ser aprofundados a fim de identificar os compostos envolvidos. Além disso, é importante considerar os possíveis efeitos colaterais e impactos ambientais antes de utilizar esses extratos como uma estratégia de controle de pragas.

Referências bibliográficas

Ambiconsult. Plano Municipal de Saneamento. **Prefeitura Municipal de Nova Petrópolis**, Nova Petrópolis-RS. 2012.

Andreazza F, Bernardi D, Marangon RB, Nava DE. Técnica de Criação de *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) em dieta artificial. **Circular técnica Embrapa**, Pelotas – RS, 2016. v. 30, n. 1, p.1-13.

Andreazza F, Bernardi D, Dos Santos RSS, Garcia FRM, Oliveira EE, Botton M, Nava DE. *Drosophila suzukii* in Southern Neotropical Region: current status and future perspectives. **Neotrop. Entomol.** 2017. v. 46. p. 591 –605.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI E FRUTI. **CEPEA/USP**. 2022. Piracicaba, São Paulo: Disponível em: <https://www.editoragazeta.com.br/produto/anuario-brasileiro-de-horti-fruti-2022/>

Arif Y, Singh P, Bajguz A, Hayat S. Phytoecdysteroids: Distribution, Structural Diversity, Biosynthesis, Activity, and Crosstalk with Phytohormones. **Int J Mol Sci.** 2022 Aug 4;23(15):8664. doi: 10.3390/ijms23158664.

Arnault C, Sláma K. Dietary effects of phytoecdysones in the leek-moth, *Acrolepiopsis assectella* Zell. (Lepidoptera: Acrolepiidae). **Journal of chemical ecology**, 1979–1986 v.12(10), <https://doi.org/10.1007/BF01041947>

Bajguz A, Bąkała I, Talarek M. Ecdysteroids in plants and their pharmacological effects in vertebrates and humans. In: Atta-ur-Rahman F., editor. **Studies in Natural Products Chemistry**. 2015. Volume 45. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: pp. 121–145.

Bernardi D, Andreazza F, Botton M, Baronio CA, Nava DE. Susceptibility and Interactions of *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus* (Diptera:

1 Drosophilidae) in Damaging Strawberry. **Neotropical entomology**. 2017. 46(1),
2 1–7. <https://doi.org/10.1007/s13744-016-0423-9>

3 Botton M, Arioli CJ, Machota Júnior R, Nunes MZ, Rosa JM. Moscas-das-frutas
4 na fruticultura de clima temperado: situação atual e perspectivas de controle
5 através do emprego de novas formulações de iscas tóxicas e da captura massal.
6 **Agropecuária Catarinense**, 2016. v. 29, p. 103-108.

7 Das N, Mishra SK, Bishayee A, Ali ES, Bishayee A. The phytochemical,
8 biological, and medicinal attributes of phytoecdysteroids: An updated review.
9 **Acta Pharm. Sin. B**. 2021; 11:1740–1766. doi: 10.1016/j.apsb.2020.10.012.

10 De Geyter, E., Toxicity and mode of action of steroids and terpenoid metabolites
11 secondary effects of plants against economically important insect pests in
12 agriculture. Doctoral dissertation, Faculty of Biosciences Engineering, **University**
13 **of Ghent**, Ghent, 2012

14 Follett PA, Jamieson L, Hamilton L, Wall M. New associations and host status:
15 Infestability of kiwifruit by the fruit fly species *Bactrocera dorsalis*, *Zeugodacus*
16 *cucurbitae*, and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Crop Protection**, 2019.
17 v. 115, p. 113-121.

18 He X, Lu L, Huang P, Yu B, Peng L, Zou L, Ren Y. Insect Cell-Based Models:
19 Cell Line Establishment and Application in Insecticide Screening and Toxicology
20 Research. **Insects**. 2023 Jan 18;14(2):104. doi: 10.3390/insects14020104.

21 Hoffmeister H, Nakanishi K, Koreeda M, Hsu HY. The moulting hormone activity
22 of ponasterones in the *Calliphora* test. **J. Insect Physiol.** 1968, 14, 53–54.
23 Available from:
24 https://www.researchgate.net/publication/325864252_Ponasterone_A_and_F_E

cdysteroids_from_the_Arctic_Bryozoan_Alcyonidium_gelatinosum [accessed Oct 21 2023].

Jones CG, Firm RD. Role of phytoecdysteroids in bracken fern, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn as a defense against phytophagous insect attack. **J. Chem. Ecol.** 1978, 4:117–138. doi: 10.1007/BF00988049.

Kosovski MI, Syrov VN, Mirakhmedov MM, Katkova SP, Khushbaktova ZA. Flavonoides de *Leuzea carthamoides*. **Problems in Endocrinology** 1989, 35(5):77,81

Lafont R, Harmatha J, Marion-Poll F, Dinan L, Wilson ID. **The Ecdysone Handbook**, 2022. 3rd edition, on-line, <https://ecdybase.org/>

Lovatto BP, Mauch CR, Lobo EA, Schiedeck G. Avaliação de *Pteridium aquilinum* (Dennstaedtiaceae) e *Urtica dioica* (Urticaceae) como alternativas ao equilíbrio populacional de afídeos em cultivos orgânicos no Sul do Brasil. **Rev. Fac. Agron.** 2016. v.115, p. 265-271.

Mannan MM, Maridass M, Victor B. A review on the potential uses of ferns. **Ethnobotanical leaflets**, 2008. v. 2008, n. 1, p. 33.

Mota-Sanchez D, Wise JC. The Arthropod Pesticide Resistance Database. **Michigan State University**. 2023. On-line at: <http://www.pesticideresistance.org>

Nörnberg SO, Rehbein MO. Avaliação da fragilidade ambiental no município de Pelotas/RS. GEOSUL. Geografia e interdisciplinaridade. In: Revista Geosul, Florianópolis, v.35, n.76, 2020.

Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A. The Grau de liberdadeobal burden of pathogens and pests on major food crops.

Nature Ecology & Evolution, 2019. 3, 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>

Selvaraj P, Britto JÁ, Sahayaraj K. Phytoecdysone of *Pteridium aquilinum*(L) Kuhn (Dennstaedtiaceae) and its pesticidal property in two major pests, **Archives Of Phytopathology And Plant Protection**, 2005. 38:2, 99-105, DOI: 10.1080/0323540040007517

Singh S, Khanna VK, Pant AB. Development of in vitro toxicology: A historic story. In: Dhawan A, Kwon S, editors. In Vitro Toxicology. United States: **Elsevier**; 2018. p. 1-19. ISBN 9780128047712

Speed MP, Fenton A, Jones MG, Ruxton GD, Brockhurst MA. Coevolution can explain defensive secondary metabolite diversity in plants. **New Phytol.** 2015 Dec;208(4):1251-63. doi: 10.1111/nph.13560. Epub 2015 Aug 4. PMID: 26243527.

Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. Curr Protoc **Immunol.** 2015 Nov 2;111:A3.B.1-A3.B.3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111. PMID: 26529666; PMCID: PMC6716531.

Takemoto T, Hikino Y, Okuyama T, Arihara S, Hikino H. Structure of shidasterone, a new molting substance of insects of *Blechnum niponicum*. **Tetrahedron Letters**, 1968. Volume 9, Issue 58, Pages 6095-6098, ISSN 0040-4039,[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)70803-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)70803-3).

Tschiche HR, Bierkandt FS, Creutzenberg O, et al. Analytical and toxicological aspects of nanomaterials in different product groups: Challenges and opportunities. **NanoImpact.** 2022;28:100416. doi:10.1016/j.impact.2022.100416

Valli M, Russo HM, Bolzani VS. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **An Acad Bras Cienc.** 2018;90(1 Suppl 1):763-778. Published 2018 Apr 16. doi:10.1590/0001-3765201820170653

Virgilio M, White I, Meyer M. A set of multi-entry identification keys to African frugivorous flies (Diptera, Tephritidae). **ZooKeys**, 2014. V. 428, 97-108. DOI:<https://doi.org/10.3897/zookeys.428.7366>

Waswa EN, Muema FW, Odago WO, Mutinda ES, Nanjala C, Mkala EM, Amenu SG, Ding SX, Li J, Hu GW. Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacological Properties of the Genus *Blechnum*-A Narrative Review. **Pharmaceuticals (Basel)**. 2022 Jul 21;15(7):905. doi: 10.3390/ph15070905. PMID: 35890203; PMCID: PMC9323518.

Wu P, Xie H, Tao W, Miao S, Wei X. Phytoecdysteroids from the rhizomes of *Brainea insignis*. **Phytochemistry**. 2010;71(8-9):975-981. doi:10.1016/j.phytochem.2010.03.002

Zucchi RA, Moraes RCB. Fruit flies in Brazil - *Anastrepha* species their host plants and parasitoids. **Esalq.** 2023. Disponível em: <http://www.lea.esalq.usp.br/anastrepha/>. Acesso em: 05 out. 2023.

Zucchi RA, Moraes RCB. Fruit flies in Brazil - Hosts and parasitoids of the Mediterranean fruit fly. 2023. Disponível em: <http://www.lea.esalq.usp.br/ceratitidis/>. Acesso em: 05 out. 2023.

Artigo 2

**Ação de análogos da tebufenozida sobre o receptor de ecdisteróides de
díptera usando a linhagem celular S2**

*Artigo redigido nas normas da revista “Insect Molecular Biology” (versão em português)

Ação de análogos da tebufenozida sobre o receptor de ecdisteróides de díptera
usando a linhagem celular S2

Juliana Wegner¹, Jissela Gaibor¹, Bruno Freitas Farias¹ e Moisés João Zotti¹

¹ Laboratório de Entomologia Molecular, Departamento de Fitossanidade,
Universidade Federal de Pelotas (UFPe), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Autor correspondente:

Juliana Wegner

Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas (UFPe),
Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

E-mail: juliana.wegner1@gmail.com

Resumo

O receptor de ecdisteróides é um alvo importante para o desenvolvimento de agrotóxicos seletivos, visto que compostos que atuam neste receptor estão limitados a insetos e alguns outros artrópodes. No entanto, a identificação de compostos seletivos para o receptor de ecdisteróides ainda é um desafio. Nesse contexto, o estudo propõe a integração de diferentes técnicas, como a modelagem molecular e ensaios *in vitro* em células S2 de *Drosophila melanogaster* para investigar a atividade do receptor de ecdisteróides. No desenvolvimento desta pesquisa, a cultura celular S2 de *Drosophila melanogaster* foi mantida e monitorada em condições específicas. Testes *in vitro* foram conduzidos com três moléculas análogas a tebufenozida, avaliando citotoxicidade, transfecção celular com o plasmídeo B.act.ere.luc., e mensuradas as atividades agonistas e antagonistas no receptor de ecdisteróides. Para a modelagem estrutural, utilizaram-se estruturas de proteínas previamente caracterizadas de insetos como referência a fim de construir um modelo homólogo do receptor em *Drosophila melanogaster*. A análise *in silico* e *docking* molecular foram realizadas para avaliar a interação das moléculas análogas a tebufenozida com o receptor modelado. Os resultados obtidos sugerem que as variações observadas nas atividades agonistas e antagonistas não são estatisticamente significativas ao nível de significância 5% e não apresentam potencial para atuar no receptor de ecdisteróides de dípteros. A utilização de técnicas de triagem virtual e *docking* molecular permitiu analisar a estrutura dos compostos análogos a tebufenozida e obter dados relevantes para a pesquisa, a fim de contribuir para o desenvolvimento de agrotóxicos mais seletivos e eficientes, reduzindo custos financeiros e tempo.

Palavras-chave: Diacilhidrazinas; Docking molecular; *Drosophila melanogaster*; Receptor de ecdisteróides; Tebufenozida.

Abstract

The ecdysteroid receptor is a crucial target for the development of selective pesticides, given that compounds acting on this receptor are limited to insects and some other arthropods. However, identifying selective compounds for the ecdysteroid receptor remains a challenge. In this context, the study proposes the integration of different techniques, such as molecular modeling and in vitro assays on *Drosophila melanogaster* cells, to investigate the activity of the ecdysteroid receptor. In the development of this research, the S2 cell culture of *Drosophila melanogaster* was maintained and monitored under specific conditions. In vitro tests were conducted with three molecules analogous to tebufenozide, assessing cytotoxicity, cellular transfection with the B.act.ere.luc plasmid, and measuring agonistic and antagonistic activities on the ecdysteroid receptor. For structural modeling, previously characterized protein structures from insects were used as a reference to construct a homologous model of the receptor in *Drosophila melanogaster*. In silico analysis and molecular docking were performed to evaluate the interaction of tebufenozide analog molecules with the modeled receptor. The results suggest that the observed variations in agonistic and antagonistic activities are not statistically significant at the 5% significance level and do not have the potential to act on the ecdysteroid receptor of dipterans. The use of virtual screening techniques and molecular docking allowed for the analysis of the structure of tebufenozide analog compounds and provided relevant data for the research, aiming to contribute to the development of more selective and efficient pesticides, reducing financial costs and time.

Keywords: Diacylhydrazines; Molecular docking; *Drosophila melanogaster*; Ecdysteroid receptor; Tebufenozide.

1 INTRODUÇÃO

2 As pragas agrícolas são responsáveis por cerca de 40% de perdas na
3 produção agrícola global (FAO, 2023). Estudos sobre taxonomia, biologia e
4 fisiologia dos insetos, entomotoxicologia, interações inseto-planta e resistência
5 de plantas hospedeiras a insetos, bem como o uso de biotecnologia, nos auxilia
6 no controle de pragas adequado, através do uso de métodos biológicos e
7 químicos, além do manejo ambiental e métodos culturais, e é de fato, carente de
8 mais pesquisas (Badenes-Pérez, 2022). Assim, é urgente a busca de
9 agrotóxicos mais seletivos e o desenvolvimento de inseticidas planejados de
10 forma racional através de descobertas de moléculas ambientalmente aceitáveis,
11 bem como o uso de novos métodos de controle de pragas (Torres e Bueno,
12 2018).

13 Atualmente existem 31 modos de ação de inseticidas e acaricidas
14 descritos, sendo atuantes em “regiões-alvo”, sendo importante para o
15 planejamento racional de inseticidas (IRAC, 2023). Dessa forma, busca-se novos
16 locais-alvo além do sistema nervoso, surgindo, portanto, inseticidas reguladores
17 de crescimento de insetos, com destaque para os inibidores da síntese de quitina
18 e os aceleradores de ecdise. O desenvolvimento de moléculas tendo como alvo
19 o receptor de ecdisteroides (EcR) é uma alternativa altamente seletiva, visto que
20 compostos que atuam neste receptor estão limitados a insetos e alguns outros
21 artrópodes.

22 Os hormônios esteroides exercem função essencial na transferência de
23 sinais de uma série de processos biológicos que ocorrem em diversos
24 organismos. Estes hormônios circulam na hemolinfa dos insetos e são
25 transportados para as células-alvo, com o propósito de atuar como ligantes na
26 família de receptores nucleares de fatores de transcrição (Stanley e Preetha,

2016). O complexo formado por esteroide-receptor nuclear, afeta a expressão gênica nas células-alvo, desencadeando uma resposta dependente de hormônio.

Nos insetos, os principais hormônios esteroides são conhecidos como ecdisteróides, encarregados pelo processo de ecdise. Operando na coordenação de transições de desenvolvimento, como muda larval e metamorfose, os ecdisteróides tem papel fundamental no processo de desenvolvimento do inseto (Kamiyama e Niwa, 2022).

A sinalização mediada por ecdisteróides possui importância vital para o crescimento e o desenvolvimento dos artrópodes, sendo considerada uma via endócrina integral para a eliminação do exoesqueleto na muda e metamorfose (Yamanaka et al., 2013). As atividades de muda em artrópodes ocorrem através da interação de um hormônio ecdisona chamado 20-hidroxiecdisona (20E) com um sítio de ligação do ligante do receptor de ecdisteroides (EcR) (Song et al., 2017; Chen et al., 2017; Mellor et al., 2020).

Com capacidade de receber sinais hormonais depois de formar um heterodímero com a proteína do ultraspiráculo (USP), o domínio de ligação do ligante (LBD) do EcR é um domínio altamente conservado (Zotti et al., 2013). A ecdisona entra nas células em virtude da sua estrutura hidrofóbica e liga-se ao heterodímero EcR/USP. O receptor ligado ou ativado pelo hormônio liga-se ao DNA em sequências reguladoras chamadas elementos de resposta e, a partir daí, direciona a transcrição do gene. Um subconjunto dos alvos genéticos imediatos do sinal da ecdisona, os genes de resposta primária, são fatores de transcrição que ativam um grande grupo de genes de resposta secundária que, em última análise, levam a funções celulares alteradas. Assim, o sinal hormonal

desencadeia uma cascata de transcrição que amplifica e diversifica o sinal inicial (Iwema et al., 2009)

Todas as proteínas receptoras nucleares exibem uma estrutura modular característica que consiste em cinco a seis regiões designadas de A a F, do terminal N ao terminal C (Figura 1). As regiões A/B, D e F, nem todas presentes em todos os receptores, são geralmente pouco conservadas e sua estrutura é desconhecida. Por outro lado, o domínio de ligação ao DNA (DBD, região C) e o domínio de ligação ao ligante (LBD, região E) são altamente conservados e suas estruturas foram determinadas para vários receptores. Nenhuma dessas proteínas partícipes tem capacidade de ligar-se independente ao 20E, mas com o desenvolvimento do heterodímero (EcR-USP) ocorre uma alteração conformacional na parte EcR, permitindo assim que o complexo se ligue a 20E (Ekoka et al., 2021).

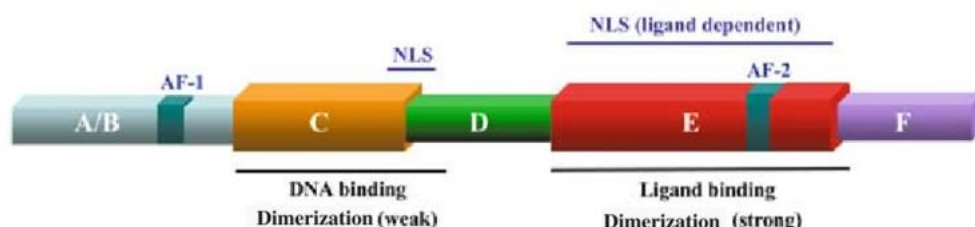


Figura 1 Desenho esquemático que representa como os receptores nucleares são organizados em diferentes partes. As letras brancas representam cada seção, sendo um receptor nuclear comum com uma parte inicial que varia (A/B), uma parte que se liga ao DNA que é conservada (C), uma parte dobrável que varia (D), uma parte que se liga a substâncias específicas que é conservada (E) e uma parte final que varia muito (F). NLS significa sinal de localização nuclear, e AF-1 e AF-2 são partes que ativam funções específicas. Fonte: Martin, David (2010).

Graham et al. (2007) aumentaram a compreensão da especificidade molecular dos receptores de ecdisteróides ao executar um trabalho com quatro pragas agrícolas importantes. Os autores descrevem as características de ligação dos ligantes nos domínios de ligação (LBDs) dos receptores de ecdisteróides de quatro insetos: *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae), *Myzus*

1 *persicae* (Hemiptera: Aphididae), *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) e
2 *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Os resultados mostram que os
3 LBDs dos quatro insetos, embora muito parecidos, têm diferentes afinidades por
4 diferentes ligantes, o que pode levar ao desenvolvimento de novas químicas de
5 ligantes e inseticidas com diferentes espectros de atividade.

6 Recentemente, Wang e Zhou (2019) estudaram os mecanismos
7 moleculares e interações de dois agonistas típicos (Ponasterona A e 20-
8 Hidroxiecdisonio), nos receptores de ecdisteróides de *Drosophila melanogaster*
9 e de *Leptinotarsa decemlineata*. Relataram que as diferentes estruturas
10 helicoidais, bem como os resíduos envolvidos e sua posição, são,
11 provavelmente, responsáveis pela seletividade do ligante do receptor de
12 ecdisteróides de diferentes ordens de insetos.

13 Sendo assim, devido à sua importância no processo de metamorfose dos
14 insetos, os reguladores de crescimento podem afetar duas vias distintas: através
15 da inibição da quitina, na atuação da síntese e na degradação da cutícula; e
16 como análogos hormonais (ecdisona e hormônio juvenil) (Stanley e Preetha,
17 2016). Por possuir seletividade, inseticidas que atuarão como inibidores de
18 ecdise, com alto grau de especificidade, tornam-se um interessante alvo para o
19 manejo de pragas, e seletividade a polinizadores e inimigos naturais.

20 A descoberta de novos pesticidas com base em alvos é orientada por
21 hipóteses, decorrentes de uma hipótese biológica específica de que a
22 modificação da atividade de um alvo ou alvos específicos proporcionará efetiva
23 ação. No entanto, as moléculas e os seus metabólitos que são idealizados para
24 interagir com um alvo específico possuem tendência a interagir com outras
25 proteínas, moléculas de DNA ou RNA, e interferir nas suas funções, o que pode
26 resultar em stress celular indesejado e até morte (Sun et al., 2020).

1 Na busca de moléculas inseticidas, Lipinski et al. (1997) fornecem
2 algumas diretrizes para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Para isso,
3 estabeleceram a “Regra dos 5 - Ro5”, com o fim de avaliar a probabilidade de
4 sucesso de uma molécula como um fármaco oral. Essas regras visam identificar
5 moléculas com maior probabilidade de apresentar boas propriedades
6 farmacocinéticas, ou seja, que tenham a capacidade da molécula ser absorvida,
7 distribuída, metabolizada e excretada pelo organismo.

8 Com isso, houve o desenvolvimento de substâncias agonistas de
9 ecdisteróides, entre elas, cromafenozida, metoxifenoza, halofenoza e
10 tebufenoza (Ekoka et al., 2021). No Brasil, entretanto, não há registro de
11 inseticidas comerciais com uso do ingrediente ativo halofenoza, tendo outros
12 inseticidas comerciais com ação agonista ao ECR disponíveis (Figura 2)
13 (AGROFIT, 2023), sendo continuamente alvo de estudo para o desenvolvimento
14 de novas moléculas. Entre eles, o tebufenoza, composto análogo da ecdisona,
15 estimula o receptor do hormônio da muda de insetos-praga alvo, especialmente
16 lepidópteros, induzindo assim a muda prematura e letal (IRAC, 2023).

17 Silva et al. (2021) conduziram um trabalho de pesquisa explorando os
18 efeitos de diversos inseticidas comerciais em *Harmonia axyridis* (Coleoptera;
19 Coccinellidae). Como resultado obtiveram baixa mortalidade apresentada pela
20 tebufenoza, porém houve uma redução de parâmetros biológicos importantes
21 do predador, como a viabilidade dos ovos, a fecundidade total e a sobrevivência
22 ao longo do tempo, recomendando uma análise mais profunda da dosagem a
23 ser utilizada e das espécies de agentes de controle biológico presentes no
24 campo.

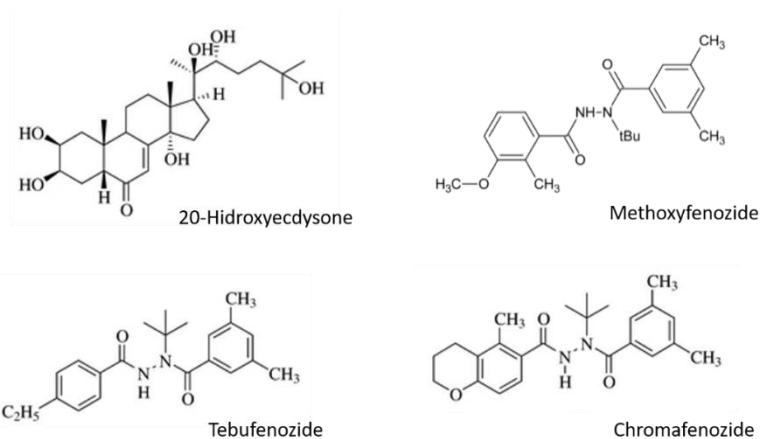


FIGURA 2 Diacilhidrazinas, que inclui os ingredientes ativos comerciais cromafenozida, metoxifenozida e tebufenozida disponíveis no Brasil. Fonte: Wegner, J. (2023)

Silva et al. (2020) estudaram o efeito de diversos inseticidas, incluindo tebufenozida, na respiração, comportamento predatório e consumo de presas por ninfas de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Os autores concluíram que o tebufenozida é um inseticida que afeta a taxa respiratória e a locomoção das ninfas de *Podisus nigrispinus*, além de apresentar um impacto negativo na sobrevivência das ninfas deste predador, com uma taxa de sobrevivência de 66,7%. Em relação ao comportamento, o tebufenozida aumentou a distância percorrida pelos insetos, mas também aumentou o tempo de descanso. Em geral, os autores sugerem que tebufenozida não é recomendado para uso em sistemas de manejo de pragas florestais que visam proteger inimigos naturais como *Podisus nigrispinus*.

Matioli et al. (2019) investigaram o efeito de tebufenozida em ovos, pupas e adultos de *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). e revelaram que tebufenozida não afetou o tempo de desenvolvimento de ovo-pupa e pupa-adulto, o número de pupas ou o peso pupal da progênie F1 e F2. Além disso, não afetou a proporção de sexos dos adultos emergentes da F2. Com base nesses resultados, os autores concluíram que o tebufenozida pode ser aplicado

com segurança antes da liberação e/ou estabelecimento de *C. flavipes* em sistemas de produção de cana-de-açúcar.

Suarez-Lopez et al. (2023) examinaram os efeitos do tebufenozida em diferentes estágios de desenvolvimento de *Chrysoperla carnea* (Neuroptera:Chrysopidae). Os resultados demonstram que a mortalidade larval não variou significativamente entre as larvas que ingeriram presas tratadas com tebufenozida e o grupo controle, e que o tempo de desenvolvimento larval foi reduzido nas larvas que consumiram presas tratadas, especialmente em concentrações mais altas de tebufenozida. Ainda, concluíram que a duração pupal não apresentou diferença significativa entre os grupos, e que os insetos adultos que sobreviveram ao consumo de presas tratadas com tebufenozida exibiram variações leves e não significativas na fecundidade e viabilidade dos ovos. Com base nesses resultados, os autores sugerem a recomendação do tebufenozida em programas de manejo integrado de pragas que envolvem crisopídeos. Esse estudo corrobora com os estudos de Zotti et al. (2013), cujos resultados demonstram que crisopídeos apresentam diferenças sutis na arquitetura do domínio do receptor de ecdisteróides, e que podem interferir na ligação da tebufenozida.

Diante do exposto, o objetivo central deste estudo foi testar moléculas análogas ao tebufenozida em células embrionárias de *Drosophila melanogaster*, a fim de verificar o potencial deste modelo de screening e as moléculas selecionadas, para a busca de inseticidas baseados na transativação do EcR. A abordagem envolveu diversas etapas interrelacionadas que abrangem modelagem homóloga de um receptor de ecdisteróides; a análise das interações moleculares, potenciais sítios de ligação e outras características relevantes para compreender o mecanismo de ligação; e teste *in vitro* das moléculas análogas

de tebufenozida em células embrionárias de *Drosophila melanogaster* para avaliar seus efeitos biológicos. Através dessa abordagem integrada, o estudo buscou também expandir o conhecimento sobre o receptor de ecdisteróides de *Drosophila melanogaster*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura Celular

A cultura celular S2 foi obtida de coleção estabelecida no Laboratório de Biotecnologia Viral – LABV do Centro de Desenvolvimento e Inovação (CDI) do Instituto Butantan, proveniente de células embrionárias de *Drosophila melanogaster*. A cultura celular foi mantida a 27°C em meio de cultura celular Insect-XPRESS™ Protein-free (Lonza ®), em frascos de meio de cultura de 25cm². A qualidade das células foi monitorada com uso de microscopia óptica com o microscópio invertido Olympus IX53, e lente com aumento de 40x.

Testes *In Vitro* com Moléculas Análogas a Tebufenozida

Foram realizados testes *in vitro* utilizando moléculas análogas a tebufenozida, obtidas por triagem virtual anteriormente no Laboratório de Entomologia Molecular (UFPEL), e, sintetizadas pela empresa LifeChemicals (Kiev, Ucrânia) (Figura 3). As moléculas também foram avaliadas seguindo os parâmetros citados por Lipinski et al. (1997).

As regras estabelecem que um composto deve ter peso molecular (PM) ≤500 daltons, pois possui relação direta com a difusão passiva através das membranas semipermeáveis, influenciando também na concentração do composto na superfície do epitélio intestinal, o que pode provocar, em consequência, uma elevação ou uma redução da absorção; o coeficiente de partição octanol-água (LogP) deve possuir valor ≤5 pois esse valor influencia na

lipossolubilidade, ou seja, moléculas mais lipossolúveis são melhores absorvidas, e tendem a penetrar na membrana biológica com mais facilidade; o número de doadores de ligações de hidrogênio deve ser ≤ 5 , visto que desempenha um papel na estabilidade de moléculas; os aceptores de ligações de hidrogênio devem apresentar valores ≤ 10 , porque desempenham um papel crucial na estabilização e conformação tridimensional dessas moléculas; aceptores e doadores de hidrogênio ainda possuem papel crucial na hidrofobicidade das moléculas. E por fim, a polaridade deve ≤ 140 , devido a sua relevância para a solubilidade da molécula em solventes polares, a interação com moléculas biológicas e a capacidade de atravessar barreiras biológicas.

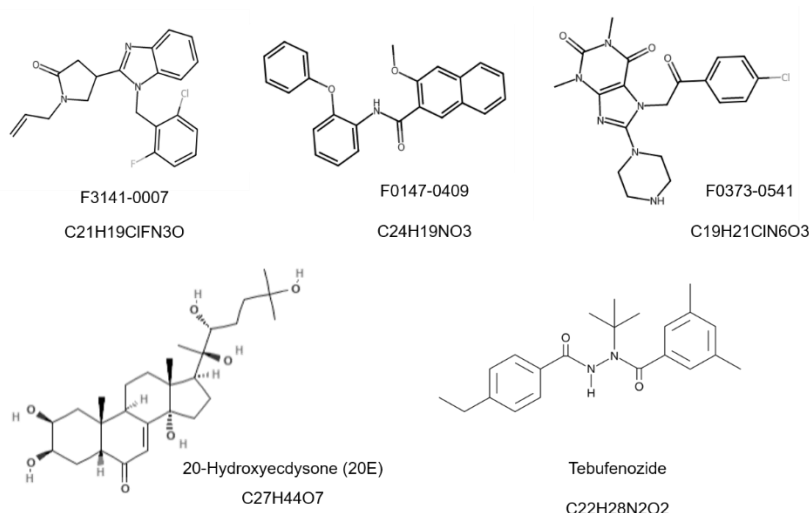


FIGURA 3 Moléculas análogas a Tebufenozida, em comparação com as moléculas controle 20E e Tebufenozida. Fonte: Wegner, J. (2023)

Ensaio de citotoxicidade

Segundo Sun et al. (2020), a citotoxicidade é um ponto importante para avaliar efeitos indesejáveis fora do alvo de um composto candidato na descoberta de medicamentos baseados em alvos. Portanto, foram conduzidos testes de citotoxicidade na cultura celular, em que as células foram expostas a

diferentes concentrações das moléculas e monitoradas, avaliando parâmetros como viabilidade celular e integridade da membrana celular.

Para o teste de citotoxicidade, foram preparadas séries de diluições das moléculas em DMSO, resultando em concentrações variadas dos extratos. As concentrações de células S2 usadas para montar os ensaios de citotoxicidade foram de 500.000 células/ml e depositadas em placas de cultura de 24 poços (KASVI®). Posteriormente, foi adicionado 5µL das moléculas diluídos em DMSO em cada poço, sendo posteriormente incubada a 27°C por 24 horas.

Cada tratamento foi realizado em triplicata, e cada experimento foi repetido pelo menos 2 a 3 vezes. Após o período de incubação, a viabilidade foi avaliada usando uma solução do corante Trypan Blue 0,4% (Invitrogen™). Esse reagente tem capacidade de penetração na membrana celular se as células estiverem mortas, resultando em uma coloração azul-escura. A análise estatística foi conduzida usando o teste ANOVA para comparar as médias dos extratos com a média do controle dentro de cada grupo de concentração. A análise dos dados foi realizada com o software Prism v8 da GraphPad Software Inc.

Ensaio de Transfecção

As moléculas foram testadas nas células S2, a fim de avaliar como afetam a expressão do gene repórter de luciferase no receptor ecdisteróides. Para isso, as células S2 foram transfectadas com o plasmídeo repórter, utilizando o reagente lipossômico Escort™ IV (Sigma Aldrich). Para tal, utilizou-se uma placa de cultivo de células de fundo chato de 24 poços (Kasvi), e cada poço foi preenchido com 500.000 células/mL, por aproximadamente 45 minutos, a fim de aderirem no fundo do poço. Em um tubo falcon 15 mL adicionou-se 497 µL de meio de cultura, 3 µL do reagente lipossômico Escort™ IV (Sigma Aldrich) e 100

ng do plasmídeo repórter (por poço), e posteriormente ficando em repouso em temperatura ambiente por 30 minutos. Após o período de incubação, o meio de cultura das células foi substituído pela solução contendo meio de transfecção, ficando em incubação em estufa a 27°C pelo período de cinco horas.

Ensaio agonista e ensaio antagonista

Após a remoção do meio de transfecção e substituição por meio de cultura normal, 5 µL de cada molécula diluída em DMSO foi adicionada a cada poço.

Para as curvas de dose-resposta e experimentos de atividade agonista, a luminescência foi mensurada 24 horas após a adição dos tratamentos (moléculas). Para atividade antagonista, primeiramente foi adicionado 5 µL das moléculas, e incubado por 24h a 27°C. Após a primeira incubação, foi adicionado o hormônio 20-Hidroxiecdisonio (controle) na concentração de 1000 µM e incubado novamente, desta vez por 24 horas a 27°C.

Após os correspondentes períodos de incubação, com uma micropipeta as células foram transferidas para uma placa branca de 96 poços (Kasvi), sendo que cada poço recebeu 100 µL da suspensão de células (50.000 células S2), e realizado em triplicata técnica.

Os resultados para os ensaios agonista e antagonista foram mensurados em forma numérica de luminescência (lúmens) emitidos pela enzima luciferase frente à adição do substrato luciferina, utilizando o kit Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega). Foram adicionados 100 µL do substrato da luciferase, e mensurado com o luminômetro SpectraMax M5e no Laboratório Bioquímica de Plantas (UFPEL). Cada experimento foi realizado pelo menos 2 a 3 vezes.

Os respectivos LogEC50 (valores de concentração efetiva mediana de indução de 50% de luminescência) com 95% de confiabilidade foram calculados

com o software Prism v8 (GraphPad Software Inc. La Jolla, Ca). Os dados de efeito agonista foram calculados pelo teste ANOVA a 5% de confiabilidade, tendo como controle positivo 20-Hidroxiecdisonio, na concentração de 1000 μ M. Já para efeito antagonista, foram consideradas moléculas eficientes aquelas que reduziram em >15% a luminescência quando comparado ao controle positivo com 20-hidroxiecdisonio.

Alinhamento e Análise Filogenética

Realizou-se uma busca no Banco de Dados Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI- National Center for Biotechnology Information) a fim de obter as sequências de receptores de ecdisteróides de diversos artrópodes. Os resultados obtidos foram selecionados quanto à relevância das sequências, buscando abranger diversas ordens e até outras classes de artrópodes. Após a seleção das sequências, procedeu-se a cópia das sequências de aminoácidos dos receptores de ecdisteróides equivalentes.

As sequências foram alinhadas utilizando ClustalW conforme implementado por Seaview (Galtier et al. 1996) através do software BioEdit. O software MEGA11 calculou as estimativas de distância por meio de uma topologia consensual predefinida, e, para a análise filogenética, foi utilizado o método Neighbor-Joining (NJ) com o objetivo de elucidar as relações evolutivas entre os receptores de ecdisteróides que foram objeto deste estudo.

O método Neighbor-Joining é amplamente reconhecido por sua eficácia na construção de árvores filogenéticas a partir de sequências moleculares, especialmente em situações envolvendo muitas sequências (Simonsen et al. 2008).

Modelagem molecular por homologia

Posteriormente, as sequências foram utilizadas para realizar análises de homologia, alinhamento e modelagem estrutural. Conforme descrito anteriormente, o domínio de ligação ao DNA (DBD) e o domínio de ligação ao ligante (LBD) são altamente conservados nas espécies. Diante disso, para a análise de homologia das estruturas do domínio de ligação ao ligante (LBD), utilizou-se estruturas previamente caracterizadas de espécies de insetos disponíveis no site RCSB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*) como referência.

Essas estruturas de proteínas conhecidas forneceram uma base sólida para as análises comparativas e permitiram avaliar e construir um modelo homólogo do receptor de ecdisteróides através da semelhança das estruturas do LBD das proteínas de interesse.

Para tal, utilizaram-se as estruturas dos receptores seguintes: 1R1K - do organismo *Heliothis virescens*, complexada com Ponasterona A (Billas et al., 2003), com uma resolução de 2.90 Å; 1R20 – do organismo *Heliothis virescens*, complexada com agonista sintético BYI06830 (Billas et al., 2003), com uma resolução de 3.00 Å; 1Z5X – do organismo *Bemisia tabaci*, complexada com Ponasterona A (Carmichael et al., 2005), com uma resolução de 3.07 Å; 2NXX – do organismo *Tribolium castaneum*, complexado com Ponasterona A (Iwema et al., 2007), com uma resolução de 2.75 Å; e 7BJV – do organismo *Heliothis virescens*, complexada com agonista sintético BYI09181 (Browning et al., 2021), com uma resolução de 3.05 Å.

As sequências da proteína de interesse foram identificadas em todos modelos acima, e foram alinhadas com a sequência no nosso organismo alvo (*Drosophila melanogaster*) através do software BioEdit. Através do software

Discovery Studio, foi construído um modelo híbrido a partir dos cinco modelos anteriores, resultando no modelo de estruturas tridimensionais de *Drosophila melanogaster*. A análise de homologia foi ainda executada pelo software Discovery Studio, com o objetivo de avaliar as semelhanças estruturais e identificar potenciais sítios de ligação ou interações de interesse.

Análise *in silico* e docking molecular

Através do software OMEGA (OpenEye Scientific), foram inseridas as moléculas a fim de prever as diferentes formas que uma molécula pode assumir (conformações) (OEDOCKING, 2022).

Para o estudo de docagem e acoplamento molecular, foi utilizado o software FRED (OpenEye Scientific), reconhecido por sua capacidade de prever como moléculas interagem com proteínas em nível atômico (OEDOCKING, 2022). Isso é alcançado por meio da análise das conformações das moléculas e das proteínas, bem como da avaliação das energias de ligação.

O receptor do ligante foi modelado no software Make Receptor (OpenEye Scientific), que delineia o sítio ativo da região onde o ligante pode ser acoplado (OEDOCKING, 2022).

Para a criação de representações tridimensionais, utilizou-se o software PyMOL, a fim de visualizar a estrutura cristalina da proteína de interesse e a conformação da proteína em seu sítio de ligação (Rosignoli e Paiardini, 2022).

1 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

2 **Parâmetros de Lipinski**

3 A tabela 1 apresenta uma análise comparativa dos parâmetros de Lipinski
4 para as diferentes moléculas em teste, comparando um conjunto de critérios
5 amplamente utilizado na avaliação da permeabilidade e absorção oral de
6 compostos químicos. Os parâmetros incluem LogP (coeficiente de partição
7 octanol-água), massa molecular, número de doadores de hidrogênio, e número
8 de grupos aceptores de hidrogênio. A comparação destes parâmetros fornece
9 insights valiosos sobre a adequação das moléculas para desenvolvimento de
10 pesticidas, especialmente em relação à sua bioacessibilidade e farmacocinética.

11 **Tabela 1** Parâmetros de Lipinski avaliados para as moléculas análogas a
12 tebufenozida, em comparação com as moléculas controle

Nome da molécula	Peso Molecular (PM) ≤ 500 da	LogP ≤5	Doadores de hidrogênio ≤5	Aceptores de hidrogênio ≤10	Área de Superfície Polar ≤140 Å
F3141-0007	383.85	3.19	0	2	38.13
F0147-0409	369.41	5.46	1	3	47.56
F0373-0541	416.86	1.79	3	5	90.78
Tebufenozida	352.5	3.90	1	2	49.4
20E	480.6	0.5	6	7	138

13 A aplicação da Regra de Lipinski é uma estratégia com finalidade de
14 minimizar os riscos de falhas. Entretanto, a molécula F0147-0409 possui valor
15 de LogP acima do limite, e 20-Hidroxiectdisônio possui um doador de hidrogênio
16 fora dos parâmetros. Porém, cabe dizer que alguns de outros compostos
17 globalmente utilizados também não atendem a Regra de Lipinski. O Fipronil
18 (pirazol), o Tiametoxan (neonicotinóide) e o Lufenuron (benzoiluréia), que são
19 inseticidas, possuem 11 aceptores de hidrogênio. A azadiractina
20 (tetranortriterpenóide), produto que é amplamente utilizado devido a sua

propriedade inseticida, possui peso molecular 720.7 daltons, 16 aceptores de hidrogênio e 215 Å de área de superfície polar. Abamectina (avermectina), outro inseticida e acaricida, vastamente utilizado, apresenta um peso molecular de 1732.10 daltons, 6 doadores de hidrogênio, 28 aceptores de hidrogênio e 340 Å de área de superfície polar (LIPINSKI, 1997) e o inseticida Espinosade (espinosina) possui peso molecular 1477.9 daltons, 22 aceptores de hidrogênio e 222 Å de área de superfície polar, os colocando extremamente fora dos parâmetros propostos por Lipinski. Essas observações ressaltam a importância de considerar a eficácia real dessas substâncias na prática, além de apenas os parâmetros da Regra de Lipinski, quando se avalia sua aplicação como agrotóxicos.

Citotoxicidade

Nossos testes de citotoxicidade revelaram que as moléculas análogas à tebufenozida apresentaram diferentes níveis de toxicidade para a cultura de células. As concentrações nas quais a citotoxicidade foi observada estão resumidas na Figura 4.

A comparação entre as médias das diferentes moléculas indica que F0373-0541 e F0147-0409 tendem a ter um impacto positivo na viabilidade celular em comparação com F3141-0007, na mesma concentração. Ainda, a relação entre a concentração das moléculas e a viabilidade celular não segue uma tendência única, destacando a importância de analisar individualmente o efeito de cada molécula.

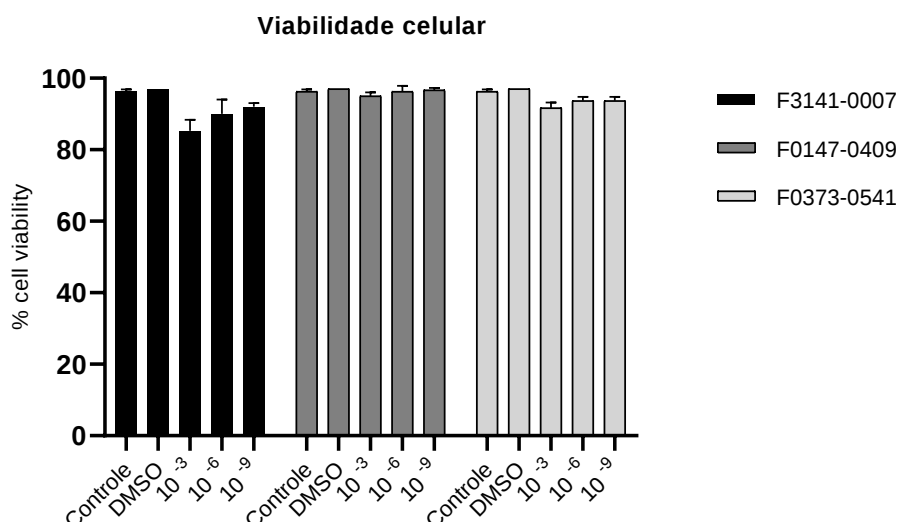


FIGURA 4 Viabilidade celular em resposta à exposição das moléculas em diferentes concentrações. Os grupos incluíram DMSO (controle), Célula (controle), F3141-0007, F0147-0409 e F0373-0541. A análise de variância (ANOVA), revelou diferenças significativas entre os grupos ($F = 10.1$, $gl1 = 4$, $gl2 = 9.67$, $p = 0.002$). Fonte: Wegner, J. (2023)

Atividade agonista

O bioensaio repórter para expressar o gene luciferase em células S2 foram obtidos a partir de uma curva dose-resposta com o hormônio natural 20-hidroxiecdisônio. Apenas o composto 20-Hidroxiecdisônio (controle) demonstrou alta atividade agonista como esperado (Tabela 2), apresentando $\log EC_{50}$ de -4.930, indicando que a substância é eficaz em concentrações relativamente baixas para produzir seu efeito desejado (Figura 5).

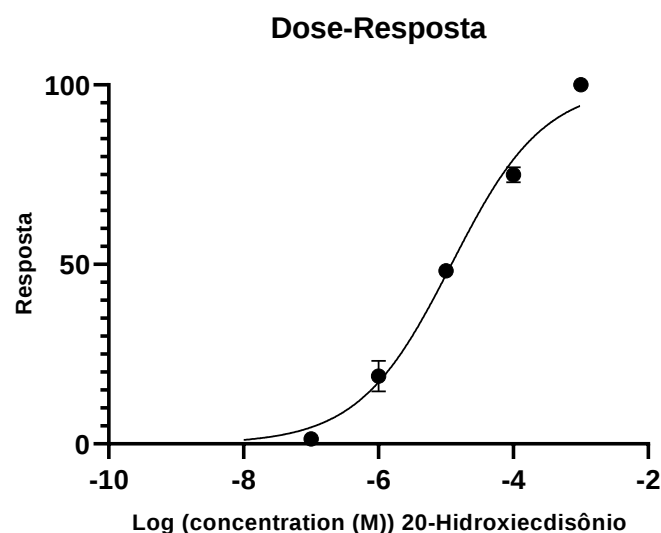


FIGURA 5 Curvas sigmoides de dose-resposta do controle positivo 20E. Fonte: Wegner, J. (2023)

Os compostos foram testados em concentrações máximas micro molar não tóxicas para as culturas celulares. Não foram observadas respostas agonistas, levando à conclusão de que as três moléculas análogas à tebufenozida não apresentam potencial para atuarem como agonistas comerciais (Figura 6).

Tabela 2 Atividade agonista de ecdisteróides para 20E e três compostos esteróides testados para células S2

Molécula	Concentração (M)	Atividade agonista
F0147-0409	10^{-3} ; 10^{-6} ; 10^{-9}	Inativo
F0373-0541	10^{-3} ; 10^{-6} ; 10^{-9}	Inativo
F3141-0007	10^{-6} ; 10^{-9} ; 10^{-11}	Inativo
20-Hidroxicdisônio (20E)	10^{-3}	Ativo

Considerando que as moléculas testadas são análogas a tebufenozida, pode-se corroborar com Zotti et al. (2013) e Pinto et al. (2019) que tebufenozida não possui alta atividade contra Diptera.

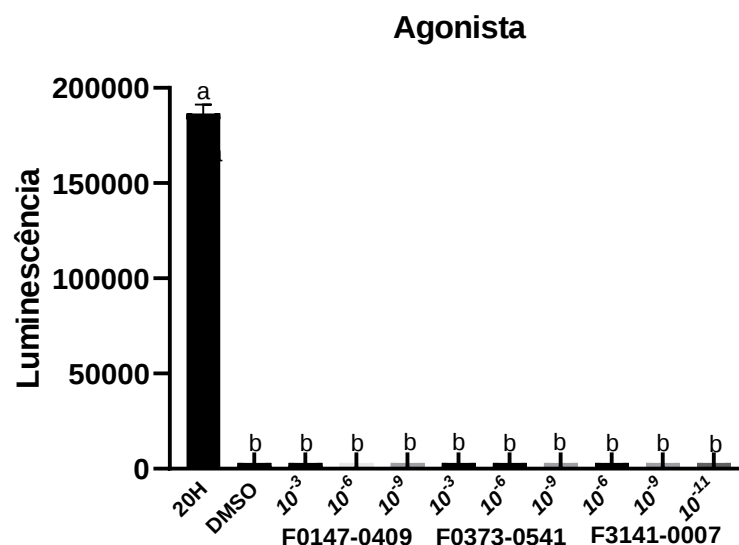


FIGURA 6 Efeito agonista observado para as três moléculas análogas a tebufenozida na linhagem celular S2. A atividade agonista das moléculas foi comparada com a concentração de 1000µM do hormônio 20-Hidroxiectdisônio (20E) e DMSO (Solvente de diluição das moléculas) como controle. Há diferença significativa do mensuramento da luminescência medida em comparação ao controle com 20-Hidroxiectdisônio segundo a análise de variância (ANOVA) (F= 243, GL 1= 9; GL 2= 7,96; P<0.0001). Wegner, J. (2023)

Atividade antagonista

Ensaio biológico realizado em culturas celulares de insetos, com o objetivo de avaliar a atividade antagonista do receptor nuclear, são, em geral, escassos (Zotti et al., 2013). Em relação à atividade antagonista das moléculas análogas a tebufenozida testadas, não houve efeito significativo quando comparado à concentração de 1000 µM de 20-hidroxiectdisônio, e, portanto, neste estudo não foi encontrada uma atividade antagônica em células S2 (Figura 7).

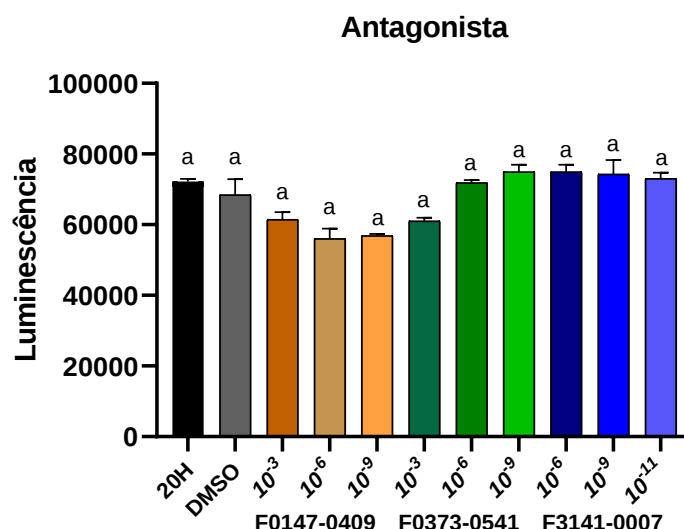


FIGURA 7 Efeito antagonista observado para as três moléculas análogas a tebufenozida na linhagem celular S2. A atividade antagonista das moléculas foi comparada com a concentração de 1000µM do hormônio 20-Hidroxiecdisônio (20E) e DMSO (Solvente de diluição das moléculas) como controle. Conforme a análise de variância (ANOVA) ($F= 1,92$, $GL\ 1= 9$; $GL\ 2= 20$; $P=0,108$), o resultado sugere que as variações observadas nas atividades antagonistas não são estatisticamente significativas ao nível de significância escolhido (0,05). Fonte: Wegner, J. (2023)

Alinhamento e Análise Filogenética

O alinhamento dos receptores de ecdisteróides selecionados demonstrou como as áreas de domínio de ligação ao DNA (DBD, região C) e o domínio de ligação ao ligante (LBD, região E) são altamente conservados (Figura 8).

A árvore filogenética resultante auxiliou na compreensão das relações evolutivas entre os receptores de ecdisteróides de diferentes espécies e seus homólogos, e as ramificações na árvore refletem as similaridades genéticas entre as sequências e forneceram informações sobre a evolução desses receptores.

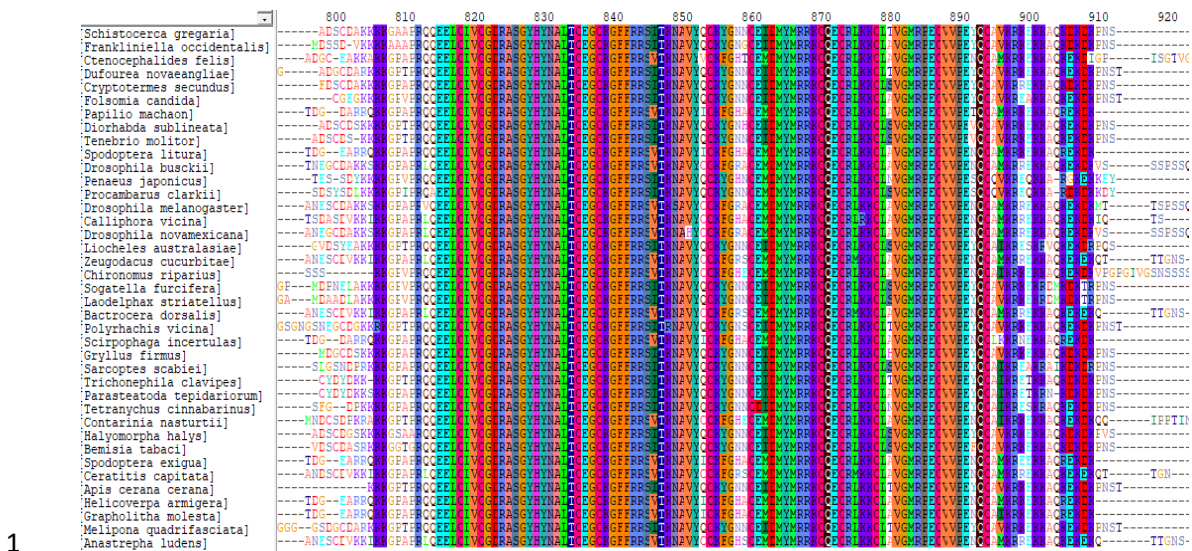


FIGURA 8 Alinhamento de 45 sequências do receptor de ecdisteróides (EcR) de diversos artrópodes, demonstrando a similaridade da área conservada. Fonte: Wegner, J. (2023).

Conforme já descrito por Zdobnov e Bork (2007), os progressos recentes na filogenômica de insetos revelaram uma aceleração genômica das taxas evolutivas em Diptera (moscas, mosquitos) e Lepidoptera (borboletas, mariposas) e foram confirmadas pela árvore filogenética obtida (Figura 9). A compreensão da conservação e da diversidade desses domínios em espécies de insetos é fundamental para a investigação de respostas a ligantes que desempenham um papel essencial no desenvolvimento, reprodução e comportamento dos insetos.

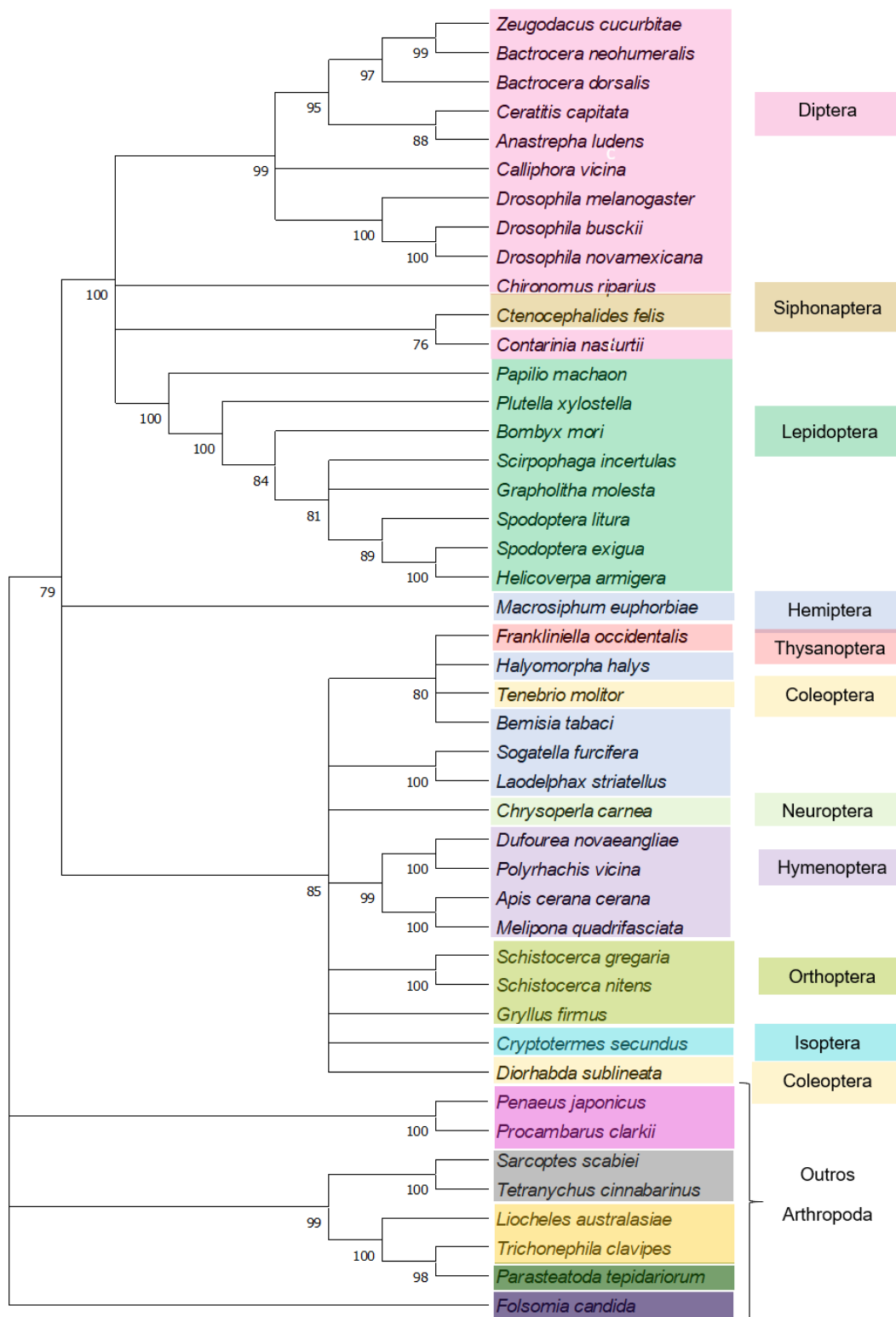


FIGURA 9 Topologia predefinida da filogenia do receptor de ecdisteróide de diversos artrópodes, compreendendo as ordens Diptera, Hemiptera, Coleoptera, Himenoptera, Lepidoptera, Isoptera, Thysanoptera, Neuroptera e Syphonaptera, além de outros artópodes. A topologia foi testada por análise de bootstrap com 1000 réplicas. Os números abaixo do ramo indicam as porcentagens de bootstrap. Fonte: Wegner, J. (2023).

Modelagem molecular por homologia

As estruturas previamente conhecidas das espécies de insetos desempenharam um papel fundamental para obtenção do modelo homólogo de *Drosophila melanogaster* (Figura 10). A figura 10 apresenta a modelagem tridimensional obtida do Domínio de Ligação ao Ligante (LBD) do receptor de ecdisteróides de *Drosophila melanogaster*. A modelagem foi realizada com base em sequências de aminoácidos obtidas por meio de alinhamento com estruturas de referência de receptores de ecdisteróides previamente caracterizados.

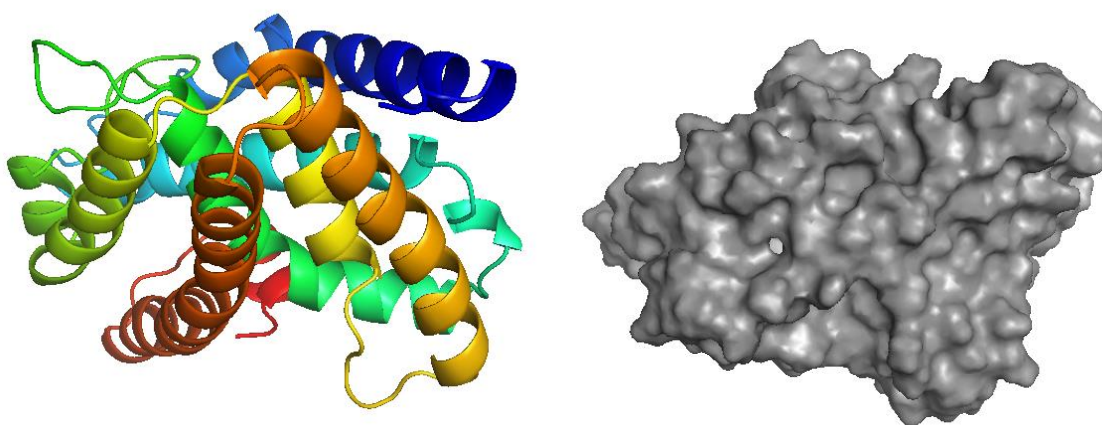


FIGURA 10 Modelo homólogo de *Drosophila melanogaster* obtido através das estruturas dos receptores de *Heliothis virescens*, *Bemisia tabaci* e *Tribolium castaneum*. Fonte: Wegner, J. (2023).

Análise *in silico* e *docking* molecular

A região do sítio ativo do ligante obtido pelo Make Receptor (OpenEye Scientific Scientific) resultou em um valor final de 1,742 Å. O número de conformações geradas pelo OMEGA (OpenEye Scientific Scientific) foi de 443, com uma média de 147,66 conformações por molécula.

Ilustrou-se a topologia das interações moleculares, a fim de visualizar a conformação da proteína em seu sítio de ligação, visto que as interações moleculares desempenham um papel fundamental na compreensão de como as

moléculas interagem com alvos específicos no organismo, como proteínas, enzimas ou receptores.

A molécula F0147 (Figura 11) apresentou dezenove aminoácidos envolvidos, sendo quinze aminoácidos com interações de van der Waals, dois aminoácidos com interação π -alquil, um aminoácido com interação π - π T-Shaped e um aminoácido que formou ponte de hidrogênio.

A molécula F0373 (Figura 12) apresentou vinte e dois aminoácidos envolvidos, sendo quatorze aminoácidos com interações de van der Waals, quatro aminoácidos com interação alquil e π -alquil, um aminoácido com interação π -sulfur, dois aminoácidos com interação carbono-hidrogênio, e um aminoácido que formou duas pontes de hidrogênio.

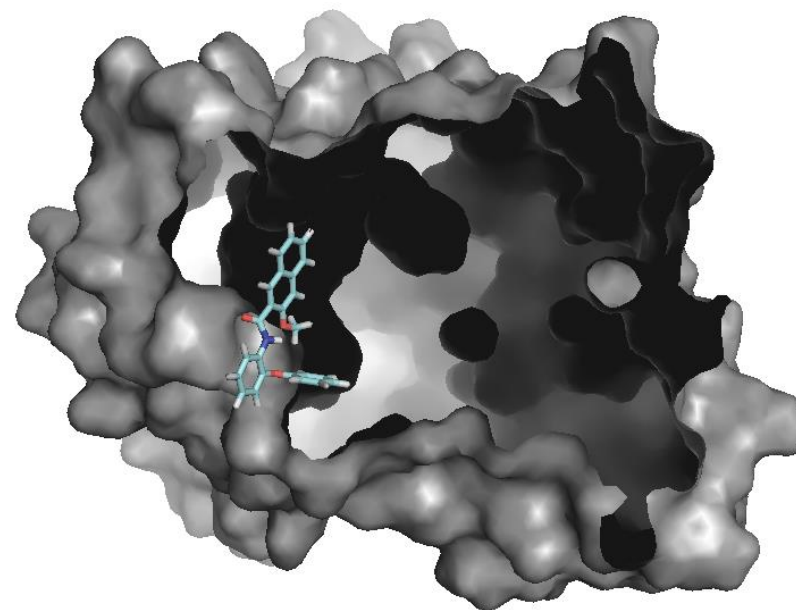
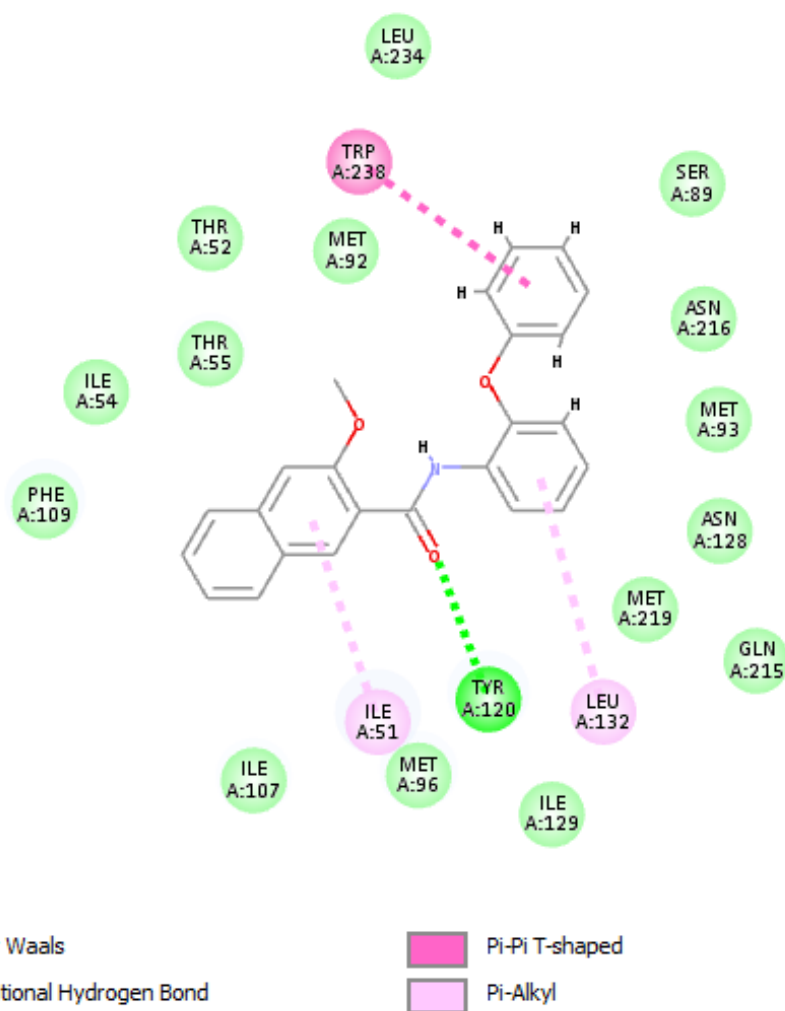
A molécula F3141 (Figura 13) apresentou vinte e um aminoácidos envolvidos, sendo dezessete aminoácidos com interações de van der Waals, dois aminoácidos com π -alquil, um aminoácido com interação π -sigma e um aminoácido que formou uma ponte de hidrogênio.

Em todas as interações, pode-se observar um grande número de interações intermoleculares de van der Waals. Neste contexto, as forças de van der Waals podem contribuir para a estabilidade geral da interação receptor-ligante, proporcionando uma força atrativa adicional entre as moléculas (Oliveira et al., 2013).

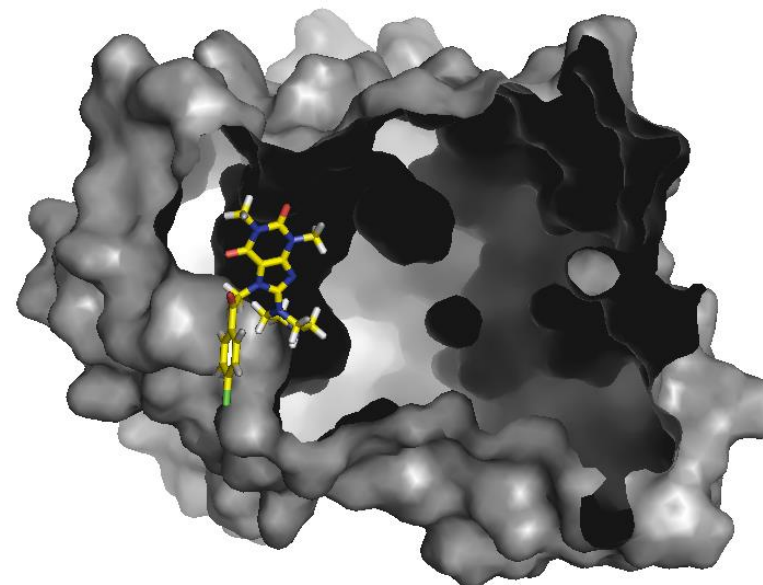
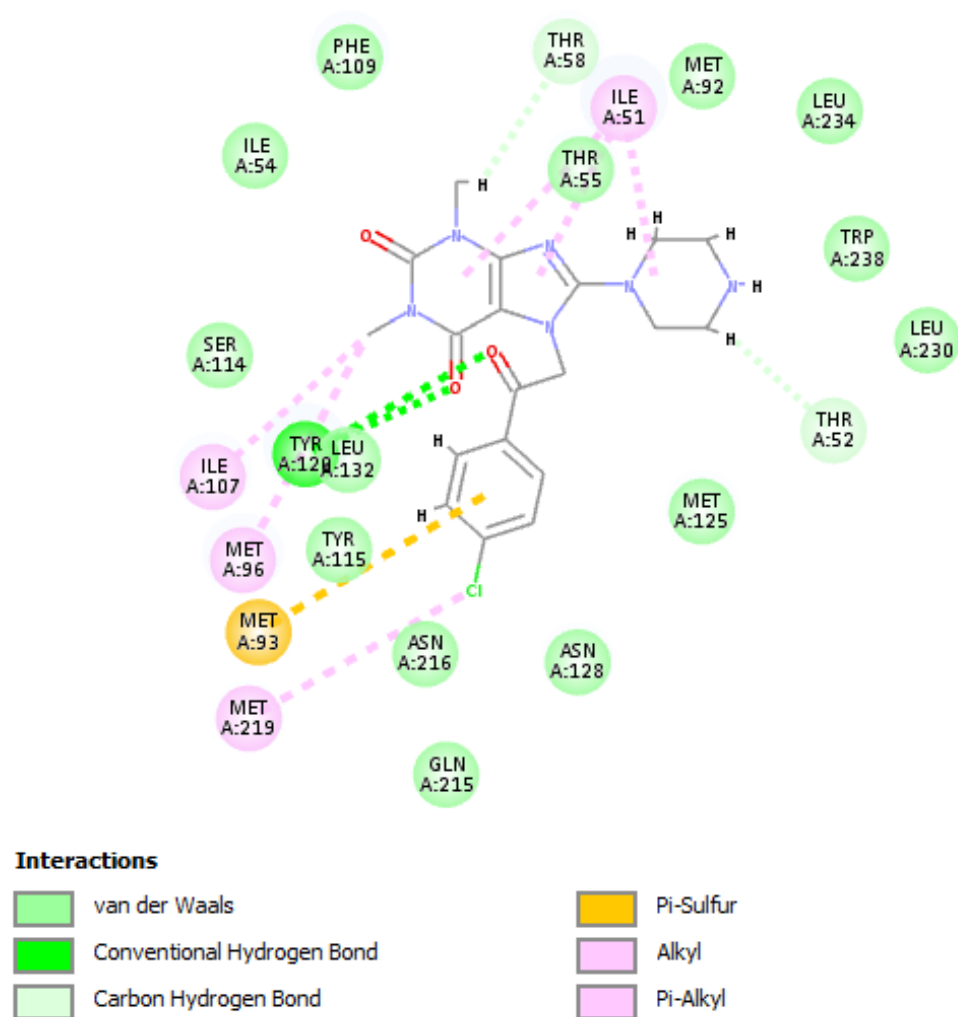
Todas as pontes de hidrogênio presentes estão interagindo com o aminoácido Tirosina 120, importante aminoácido na interação com a cadeia alifática do hormônio 20E, o que sugere uma maior especificidade e força direcional à interação, influenciando a afinidade e a seletividade do ligante (Oliveira, 2015). As interações alquila e π -alquila podem contribuir para a

1 estabilidade da ligação ligante-receptor (Fokoue et al., 2020). As interações
2 carbono-hidrogênio e π -enxofre contribuem significativamente para a afinidade
3 de ligação ao ligante (Horovitz e Trievel, 2012); e a interação π -sigma, são
4 interações fortes, que envolve em grande parte a transferência de carga,
5 ajudando a intercalar o fármaco no sítio de ligação do receptor (Arthur e Uzairu,
6 2019).

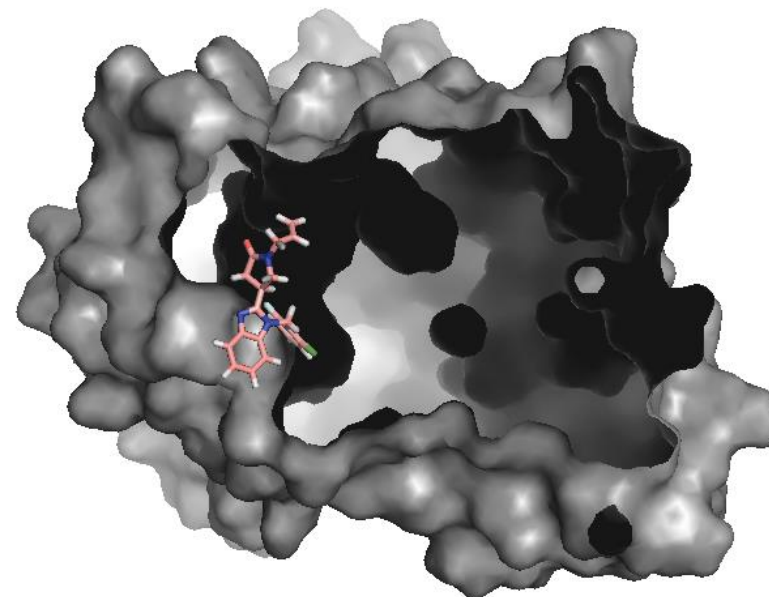
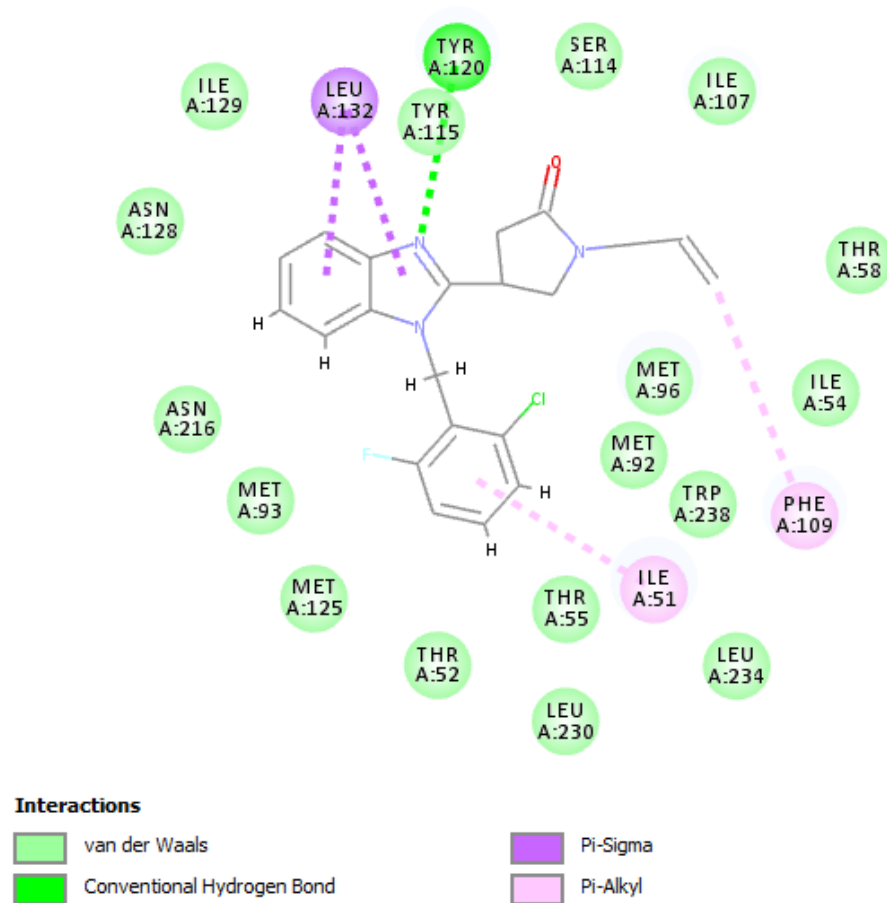
7 Em resumo, a interação entre um receptor e um ligante é frequentemente
8 uma combinação complexa dessas várias interações moleculares. A
9 compreensão desses elementos é crucial para o desenvolvimento de fármacos
10 e para entender os mecanismos bioquímicos envolvidos em processos como o
11 reconhecimento molecular e a sinalização celular. Cada tipo de ligação contribui
12 para a especificidade, afinidade e estabilidade geral da interação.



1 **FIGURA 11** Interface gráfica da possível interação entre a molécula F0147-0409 e o receptor de ecdisteróides de *Drosophila*
 2 *melanogaster*; e o receptor modelado em forma de superfície, com a molécula encaixada em seu sítio de ligação. Fonte: Wegner, J.
 3 (2023).



1 **FIGURA 12** Interface gráfica da possível interação entre a molécula F0373-0541 e o receptor de ecdisteróides de *Drosophila*
 2 *melanogaster*; e o receptor modelado em forma de superfície, com a molécula encaixada em seu sítio de ligação. Fonte: Wegner, J.
 3 (2023).



1 **FIGURA 13** Interface gráfica da possível interação entre a molécula F3141-0007 e o receptor de ecdisteróides de *Drosophila*
 2 *melanogaster*; e o receptor modelado em forma de superfície, com a molécula encaixada em seu sítio de ligação. Fonte: Wegner, J.
 3 (2023).

1 **Considerações finais**

2 Atualmente, as técnicas de triagem virtual e *docking* molecular têm
3 ocupado lugar de destaque quando se trata da identificação de novos compostos
4 bioativos. As análises *in silico* funcionam como uma ferramenta inicial de
5 pesquisa, ajudando a orientar estudos e reduzir custos financeiros e tempo.
6 Neste trabalho, pode-se concluir que as moléculas análogas a tebufenozida não
7 tiveram atividade no receptor de ecdisteroides de dipteros no teste *in vitro*.

8 Apesar de ter se observado a ocorrência de interações químicas
9 satisfatórias entre o ligante e o receptor, os resultados dos testes *in vitro* obtidos
10 não foram favoráveis. Mesmo com a conformidade aos parâmetros de Lipinski,
11 não foi possível obter atividade biológica em linhagem S2. Em seu trabalho,
12 Billas et al. (2003), obteve três ligações de pontes de hidrogênio entre o receptor
13 e o ligante, em seu trabalho com análogos a tebufenozide, enquanto que em
14 nossos experimentos obtivemos no máximo duas ligações de pontes de
15 hidrogênio entre o receptor e o ligante. Isso indica que número de pontes de
16 hidrogênio entre um ligante e o receptor pode ter implicações significativas na
17 interação molecular e, conseqüentemente, na atividade biológica, visto que a
18 formação de mais pontes de hidrogênio geralmente está associada a interações
19 mais fortes e específicas, o que pode resultar em uma maior eficácia do ligante
20 no contexto biológico.

21 Portanto, sugere-se testar as moléculas deste trabalho *in vivo* e em
22 células de insetos de outras ordens, a fim de verificar sua atividade no receptor
23 de ecdisteróides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Agrofit - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. (s.d.). Disponível em [https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons]. Acesso em agosto de 2023.

Arthur D.E., Uzairu A. (2019) Molecular docking studies on the interaction of NCI anticancer analogues with human phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit. **J King Saud Univ Sci** 31(4): 1151–1166. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.01.011

Badenes-Pérez, F. R. (2022). Plant-Insect Interactions. **Plants**, 11, 1140. https://doi.org/10.3390/plants11091140.

Billas, I. M., Iwema, T., Garnier, J. M., Mitschler, A., Rochel, N., & Moras, D. (2003). Structural adaptability in the ligand-binding pocket of the ecdysone hormone receptor. **Nature**, 426(6962), 91–96. https://doi.org/10.1038/nature02112.

Browning, C., McEwen, A. G., Mori, K., Yokoi, T., Moras, D., Nakagawa, Y., & Billas, I. M. L. (2021). Nonsteroidal ecdysone receptor agonists use a water channel for binding to the ecdysone receptor complex EcR/USP. **Journal of Pesticide Science**, 46(1), 88–100. https://doi.org/10.1584/jpestics.D20-095.

Carmichael, J. A., Lawrence, M. C., Graham, L. D., Pilling, P. A., Epa, V. C., Noyce, L., Lovrecz, G., Winkler, D. A., Pawlak-Skrzecz, A., Eaton, R. E., Hannan, G. N., & Hill, R. J. (2005). The X-ray structure of a hemipteran ecdysone receptor ligand-binding domain: comparison with a lepidopteran ecdysone receptor ligand-binding domain and implications for insecticide design. **The Journal of Biological Chemistry**, 280(23), 22258–22269. https://doi.org/10.1074/jbc.M500661200.

Chen, X., Wang, J., Yue, W., et al. (2017). Structure and function of the alternatively spliced isoforms of the ecdysone receptor gene in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Scientific Reports**, 7, 12993. https://doi.org/10.1038/s41598-017-13474-1.

Ekoka, E., Maharaj, S., Nardini, L., et al.** (2021). 20-Hydroxyecdysone (20E) signaling as a promising target for the chemical control of malaria vectors. **Parasites & Vectors**, 14, 86. https://doi.org/10.1186/s13071-020-04558-5.

Fokoue, H. H., Pinheiro, P. S. M., Fraga, C. A. M., & Sant'Anna, C. M. R.. (2020). Há algo novo no reconhecimento molecular aplicado à química medicinal?. **Química Nova**, 43(1), 78–89. https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170474

Food And Agriculture Organization Of The United Nations (**FAO**). (2023). Disponível em: [https://www.fao.org/pest-and-pesticide-

management/about/understanding-the-context/en/]. Acesso em outubro de 2023.

Galtier, N., Gouy, M., & Gautier, C. (1996). Seaview and phylo_win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. **Computer Applications in the Biosciences: CABIOS**, 12(6), 543–548. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/12.6.543>.

Graham, L. D., Johnson, W. M., Pawlak-Skrzecz, A., Eaton, R. E., Bliese, M., Howell, L., Hannan, G. N., & Hill, R. J. (2007). Ligand binding by recombinant domains from insect ecdysone receptors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 37(6), 611–626.

Horowitz, S., Trievel, R. C. (2012). Carbon-oxygen hydrogen bonding in biological structure and function. **The Journal of biological chemistry**, 287(50), 41576–41582. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.418574>

Iwema, T., Chaumot, A., Studer, R. A., Robinson-Rechavi, M., Billas, I. M., Moras, D., Laudet, V., & Bonneton, F. (2009). Structural and evolutionary innovation of the heterodimerization interface between USP and the ecdysone receptor ECR in insects. **Molecular Biology and Evolution**, 26(4), 753–768. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn302>.

IRAC - **Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas**. (2023). Disponível em: <https://www.irac-br.org/modo-de-acao>. Acesso em setembro de 2023.

Kamiyama, T., & Niwa, R. (2022). Transcriptional Regulators of Ecdysteroid Biosynthetic Enzymes and Their Roles in Insect Development. **Frontiers in physiology**, 13, 823418. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.823418>

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 46(1-3), 3–26.

Martín, D. (2010). Functions of Nuclear Receptors in Insect Development. In: Bunce, C., Campbell, M. (eds) Nuclear Receptors. **Proteins and Cell Regulation**, vol 8. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3303-1_3

Matioli, T. F., Zanardi, O. Z., & Yamamoto, P. T. (2019). Impacts of seven insecticides on *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). **Ecotoxicology**, 28(10), 1210-1219. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02129-8>. Epub 2019 Nov 6. PMID: 31691907.

Mellor, C. L., Tollefsen, K. E., Lalone, C., Cronin, M. T. D., & Firman, J. W. (2020). In Silico Identification of Chemicals Capable of Binding to the Ecdysone Receptor. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 39(7), 1438-1450.

- 1 <https://doi.org/10.1002/etc.4733>. **Epub** 2020 Jun 4. PMID: 32335943; PMCID:
2 PMC7781155.
- 3 OEDOCKING v3.3.0.3. (2022). OpenEye Scientific Software. Disponível em
4 <https://encr.pw/xA7hs>
- 5 Oliveira, M. B. S. C.; Ribeiro, F. C.; Vizzoni, A. G. (Org.). (2013) Conceitos
6 básicos e aplicados em imuno-hematologia. Rio de Janeiro: **EPSJV**,156p.
7 Disponível em <https://www.epsjv.fiocruz.br/upload/Material/L226.pdf>
- 8 Oliveira, B. G. (2015). O Estado da Arte da Ligação de Hidrogênio. Química
9 Nova, 38(10), 1313–1322. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150146>
- 10 Rosignoli, S.; Paiardini, A. (2022) Boosting the Full Potential of PyMOL with
11 Structural Biology Plugins. **Biomolecules**, 12, 1764.
12 <https://doi.org/10.3390/biom12121764>
- 13 Silva, T. G., Souza, J. R., Moreira, L. B., et al. (2021). Survival, development and
14 reproduction of **Harmonia axyridis** (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae)
15 under effects of insecticides used in tomato plants. **Ecotoxicology**, 30, 863–872.
16 <https://doi.org.ez66.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10646-021-02415-4>.
- 17 Silva, W. M., Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Serrão, J. E., & Zanuncio, J. C.
18 (2020). Respiration, predatory behavior and prey consumption by *Podisus*
19 *nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) nymphs exposed to some insecticides.
20 **Chemosphere**, 261, 127720.
21 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127720>. Epub 2020 Jul 16. PMID:
22 32721693.
- 23 Simonsen, M., Mailund, T., & Pedersen, C. N. S. (2008). Rapid Neighbour-
24 Joining. In: Crandall, K.A., Lagergren, J. (eds) Algorithms in Bioinformatics.
25 **Lecture Notes in Computer Science**, 5251. Springer, Berlin, Heidelberg.
26 https://doi.org/10.1007/978-3-540-87361-7_10.
- 27 Song, Y., Villeneuve, D. L., Toyota, K., Iguchi, T., & Tollefsen, K. E. (2017).
28 Ecdysone Receptor Agonism Leading to Lethal Molting Disruption in Arthropods:
29 Review and Adverse Outcome Pathway Development. **Environmental Science**
30 **& Technology**, 51(8), 4142-4157. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00480>.
- 31 Stanley, J., & Preetha, G. (2016). Pesticide Toxicity to Parasitoids: Exposure,
32 Toxicity and Risk Assessment Methodologies. In Pesticide Toxicity to Non-Target
33 Organisms; **Springer**: Dordrecht, The Netherlands, p. 99–152.
- 34 Suarez-Lopez, Y. A., Hatem, A. E., Aldebis, H. K., & Vargas-Osuna, E. (2023).
35 Effects of Tebufenozida on Eggs, Larvae and Adults of *Chrysoperla carnea*
36 (Neuroptera: Chrysopidae). **Insects**, 14, 521.
37 <https://doi.org/10.3390/insects14060521>.

- 1 Sun, H., Wang, Y., Cheff, D. M., Hall, M. D., & Shen, M. (2020). Predictive models
2 for estimating cytotoxicity on the basis of chemical structures. **Bioorganic &**
3 **Medicinal Chemistry**, 28(10), 115422.
4 <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115422>. Epub 2020 Mar 12. PMID:
5 32234277; PMCID: PMC7881917.
- 6 Torres, J. B., & Bueno, A. F. (2018). Conservation biological control using
7 selective insecticides – A valuable tool for IPM. **Biological Control**, 126.
8 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.07.012>.
- 9 Wang, F., & Zhou, B. (2019). Molecular dynamics and free energy studies on the
10 *Drosophila melanogaster* and *Leptinotarsa decemlineata* ecdysone receptor
11 complexed with agonists: Mechanism for binding and selectivity. **Journal of**
12 **Biomolecular Structure & Dynamics**, 37(10), 2678–2694.
13 <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1494634>.
- 14 Yamanaka, N., Rewitz, K. F., & O'connor, M. B. (2013). Ecdysone control of
15 developmental transitions: lessons from *Drosophila* research. **Annual Review of**
16 **Entomology**, 58, 497-516. [https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-](https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153608)
17 153608. PMID: 23072462; PMCID: PMC4060523.
- 18 Zotti, M. J., Grutzmacher, A. D., Lopes, I. H., & Smagghe, G. (2013). Comparative
19 effects of insecticides with different mechanisms of action on *Chrysoperla externa*
20 (Neuroptera: Chrysopidae): Lethal, sublethal and dose–response effects. **Insect**
21 **Science**, 20, 743–752.
- 22 Zotti, M. J., Geyter, E., Swevers, L., et al. (2013). A cell-based reporter assay for
23 screening for EcR agonist/antagonist activity of natural ecdysteroids in
24 Lepidoptera (Bm5) and Diptera (S2) cell cultures, followed by modeling of
25 ecdysteroid-EcR interactions and normal mode analysis. **Pesticide**
26 **Biochemistry and Physiology**, 107, 23-33.

27

1 **Considerações finais:**

2 Neste trabalho, foram abordadas duas estratégias diferentes, entretanto
3 complementares, na busca de compostos cujo alvo foi o receptor de
4 ecdisteroides. A primeira estratégia teve como destaque o potencial dos
5 metabólitos secundários de samambaias e sua interação com o receptor de
6 ecdisteroides de *Drosophila melanogaster*. A segunda estratégia corroborou
7 com outros trabalhos sobre a eficácia limitada de análogos de tebufenozida em
8 insetos dípteros, apontando para a necessidade de explorar outras ordens de
9 insetos.

10 O estudo sobre metabólitos secundários de samambaias ressaltou a
11 importância de explorar a biodiversidade vegetal em busca de soluções
12 inovadoras para o controle de pragas. A especificidade para o receptor de
13 ecdisteroides destaca uma abordagem altamente direcionada, potencialmente
14 resultando em inseticidas mais seletivos e menos impactantes no meio
15 ambiente.

16 Por outro lado, constatou-se que compostos análogos a tebufenozida não
17 são efetivos em dípteros, apontando para a complexidade da resposta biológica
18 e ressaltando a importância de considerar a diversidade dos insetos ao
19 desenvolver novos inseticidas.

20 Ambos os caminhos destacam a necessidade de uma pesquisa contínua
21 e abrangente para enfrentar os desafios crescentes associados à resistência de
22 insetos e ao desenvolvimento de inseticidas mais eficazes e seletivos.

Referências:

- ARAÚJO, M. F., CASTANHEIRA, E. M. S., & SOUSA, S. F. The Buzz on Insecticides: A Review of Uses, Molecular Structures, Targets, Adverse Effects, and Alternatives. **Molecules** (Basel, Switzerland), 28(8), 3641. 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28083641>
- CALICIOGLU, O.; FLAMMINI, A.; BRACCO, S.; BELLÙ, L.; SIMS, R. The Future Challenges of Food and Agriculture: An Integrated Analysis of Trends and Solutions. **Sustainability**. 11, 222. 2019. <https://doi.org/10.3390/su11010222>
- CLIFT, M.J.D.; DOAK, S.H. Advanced In Vitro Models for Replacement of Animal Experiments. **Small**, 17: 2101474. 2021. <https://doi.org/10.1002/smll.202101474>
- DANCHIN, A. In vivo, in vitro and in silico: an open space for the development of microbe-based applications of synthetic biology. **Microbial biotechnology**, 15(1), 42–64. 2022. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13937>
- DASZKIEWICZ, T. Food Production in the Context of Global Developmental Challenges. **Agriculture**, 12, 832. 2022. <https://doi.org/10.3390/agriculture12060832>
- GILLER, K.E., DELAUNE, T., SILVA, J.V. et al. The future of farming: Who will produce our food? **Food Sec.** 13, 1073–1099. 2021. <https://doi.org/10.1007/s12571-021-01184-6>
- KIYOTA, H. Synthetic studies of biologically active natural products contributing to pesticide development. **Journal of pesticide science**, 45(3), 177–183. 2020. <https://doi.org/10.1584/jpestics.J20-03>
- LIN, L.; LI, H.; ZHENG, Q.; HU, J.; WU, W. Research Progress on the Regulation of Autophagy and Apoptosis in Insects by Sterol Hormone 20-Hydroxyecdysone. **Insects**, 14, 871. 2023. <https://doi.org/10.3390/insects14110871>
- LORSBACH, B. A.; SPARKS, T. C.; CICCHILLO, R. M.; GARIZI, N. V.; HAHN, D. R.; MEYER, K. G. Natural Products: A Strategic Lead Generation Approach in Crop Protection Discovery. **Pest Manage. Sci.**, 5350, 2019. <https://doi.org/10.1002/ps.5350>
- MISHRA, P., TRIPATHI, A., DIKSHIT, A., PANDEY, A. Insecticides Derived from Natural Products: Diversity and Potential Applications. In: Singh, J., Yadav, A.

1 (eds) Natural Bioactive Products in Sustainable Agriculture. **Springer**,
2 Singapore. 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3024-1_6

3 NISHIMOTO, R. Global Trends in the Crop Protection Industry. **J. Pestic. Sci.** 44
4 (3), 141– 147, 2019. <https://doi.org/10.1584/jpestics>. D19-101

5 QUINN, B. Preparation and Maintenance of Live Tissues and Primary Cultures
6 for Toxicity Studies. In F. Gagne (Ed.), Biochemical Ecotoxicology: Principles and
7 Methods (pp. 33-47). **Elsevier Academic Press Inc.**
8 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411604-7.00003-9>

9 SPARKS, T. C.; BRYANT, R. J. Impact of Natural Products on Discovery of, and
10 Innovation in, Crop Protection Compounds. **Pest Manage. Sci.** 78 (2), 399– 408,
11 2022. <https://doi.org/10.1002/ps.6653>

12 SUMMERFIELD, S.G., DONG, K.C. In vitro in vivo and in silico models of drug
13 distribution into the brain. **J Pharmacokinet Pharmacodyn.** 40:301–14. 2013.
14 <https://doi.org/10.1007/s10928-013-9303-7>.

15 SUN, J.; ZHOU, Y. Design, Synthesis, and Insecticidal Activity of Some Novel
16 Diacylhydrazine and Acylhydrazone Derivatives. **Molecules**, 20, 5625-5637.
17 2015. <https://doi.org/10.3390/molecules20045625>

18 THIEM, B., KIKOWSKA, M., MALIŃSKI, M. P., KRUSZKA, D., NAPIERAŁA, M.;
19 FLOREK, E. Ecdysteroids: production in plant in vitro cultures. **Phytochemistry**
20 **reviews: proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, 16(4), 603–
21 622. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9483-z>