



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA



HARLYSON LOPES CARVALHO

**UM PROTOCOLO SIMPLES E EFICIENTE PARA A REAÇÃO DE
KNOEVENAGEL DE BENZILIDENOMALONONITRILAS E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA EM *Aedes aegypti***

MACAPÁ
2019

HARLYSON LOPES CARVALHO

**UM PROTOCOLO SIMPLES E EFICIENTE PARA A REAÇÃO DE
KNOEVENAGEL DE BENZILIDENOMALONONITRILAS E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA EM *Aedes aegypti***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Disciplina de TCC II da Universidade Federal do Amapá - UNIFAP, no Curso de Licenciatura em Química, como requisito de avaliação de Conclusão do Curso de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira.
Coorientadora: Prof^a. Ma. Inana Fauro Araújo.

MACAPÁ
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborado por Cristina Fernandes – CRB2/1569

Carvalho, Harlyson Lopes.

Um protocolo simples e eficiente para a reação de Knoevenagel de benzilidenomalononitrilas e avaliação da atividade larvicida em *Aedes aegypti* / Harlyson Lopes Carvalho; Orientador, Irlon Maciel Ferreira; Coorientadora, Inana Fauro Araújo. – Macapá, 2019.

55.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Curso de Licenciatura em Química.

1. Química verde. 2. Reação aldólica. 3. Ensino de química. I. Ferreira, Irlon Maciel, orientador. II. Araújo, Inana Fauro, coorientadora. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

615.321 C331p
CDD. 22 ed.

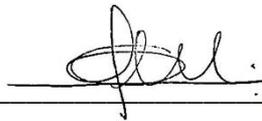
HARLYSON LOPES CARVALHO

**UM PROTOCOLO SIMPLES E EFICIENTE PARA A REAÇÃO DE
KNOEVENAGEL DE BENZILIDENOMALONONITRILAS E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA EM *Aedes aegypti***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Disciplina de TCC II da Universidade Federal do Amapá - UNIFAP, no Curso de Licenciatura em Química, como requisito para obtenção do diploma de Licenciado em Química.

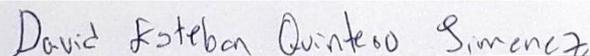
Orientador: Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira.
Coorientadora: Prof^a. Ma. Inana Fauro Araújo.

DATA DE APROVAÇÃO: 12 / 07 / 2019

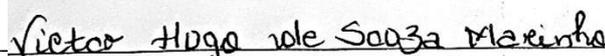


Orientador: Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ – UNIFAP

Coorientadora: Prof^a. Ma. Inana Fauro Araújo
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ – UNIFAP



Examinador: Prof. Dr. David Esteban Quintero Jimenez
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ – UNIFAP



Examinador: Me. Victor Hugo de Souza Marinho
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ – UNIFAP

Dedico este trabalho à Deus e aos meus pais
Aldenias Carvalho e Auriceli Lopes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a minha família que sempre estiveram ao meu lado, em especial a minha mãe, que foi minha maior inspiração para minha formação.

Além disso, agradeço também ao meu orientador Dr. Irlon Maciel Ferreira pela oportunidade que me concedeu em participar do grupo Biorg (Grupo de Biocatálise e Biotransformação em Química Orgânica), por ter acreditado no meu potencial e por toda a orientação proporcionada ao longo desses anos.

Sou grato aos meus amigos Aline, Eloysy, Cristina, Ingrith, Ingrid, Jardel, Jeferson, Luca, Luciane, Kelry, Madson, Raimundo, Robson, Shirlene e Viviane que não me deixaram ser vencido pelo cansaço e sempre acreditaram em mim, em especial a Eloysy que sempre esteve ao meu lado dando todo apoio.

Agradeço também a todos os colegas da pós-graduação que me ajudaram nessa caminhada, em especial a Inana Fauro, Pedro Fauro, Gabryelle Almeida e Daniel Santos que foram e sempre serão grandes amigos. Agradeço a todos os alunos da iniciação científica do Biorg em especial a Andreia Amorim e Hellen Loureiro que foram mais que amigas nos momentos de turbulência pelo qual passei, foram irmãs que apesar de tudo sempre me aconselharam e estiveram comigo.

Meus agradecimentos vão também para meu amigo Victor Hugo, que sempre esteve disponível para me ouvir, aconselhar e até chamar minha atenção quando necessário. Não posso esquecer também dos meus amados discipuladores, Domingos Ribeiro e Dora Ribeiro, pelas orações, conselhos e fé que possuem em mim.

Agradeço a todos os professores do colegiado de Química por proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional. Por fim, a palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados, em especial ao prof. Douglas Komar por toda paciência em compartilhar seu conhecimento.

RESUMO

Os mosquitos do gênero *Aedes* são responsáveis pela dengue, febre amarela, chikungunya e Zika. Embora importantes avanços surgiram no desenvolvimento de medidas alternativas para o controle de mosquitos, os inseticidas químicos continuam sendo uma parte vital dos programas de controle integrado. Nesse trabalho foram sintetizados uma série de benzilidenomalononitrilas em bons rendimentos (71-99%), usando apenas água e glicerol a temperatura ambiente. O estudo da atividade larvicida entre os derivados de benzilidenomalononitrilas mostrou que o composto 2e (R = 4-Cl) apresentou melhor atividade larvicida (LC50 e LC90 de 9,42 e 15,02, respectivamente, em 24 h). Um estudo de docking molecular foi aplicado para identificar a interação do modo 2e com os sítios de ligação na enzima acetilcolinesterase, o perfil de interação mostrou um valor de 48,9795, com cinco ligações em três diferentes aminoácidos.

Palavras-Chave: *Aedes aegypti*; Química verde; Atividade larvicida; Docking molecular.

Agradecimentos: FAPEAP, UNIFAP e USP.

ABSTRACT

Mosquitoes of the genus *Aedes* are responsible for dengue, yellow fever, chikungunya and Zika. Although important advances have emerged in the development of alternative methods for mosquito control, chemical insecticides remain a vital part of integrated control programs. In this paper were synthesized benzylidenemalononitrile derivatives in good yields (71-99%) using only water and glycerol at room temperature. A study of the larvicidal activity between benzylidenemalononitriles showed that the compound **2e** (R= 4-Cl) possesses excellent larvicidal activity (LC50 and LC90 of 9.42 and 15.02, respectively at 24 h). A study of molecular docking was applied to identify the type of interaction of compound **2e** with binding sites at the enzyme acetylcholinesterase. The profile of the interaction showed a score 48.9795 with five bonds at three different amino acids.

Keywords: *Aedes aegypti*; Green chemistry; Larvicidal activity; Molecular docking.

Acknowledgements: FAPEAP, UNIFAP and USP.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos	15
3 REFERENCIAL TEORICO	16
3.1 Química Verde	16
3.2 Reação de Condensação de Knoevenagel	17
3.2.1 Produtos sintéticos gerados a partir da reação de Knoevenagel	19
3.2.2 Efeito do solvente	22
3.3 <i>Aedes aegypti</i>	22
3.4 Atividade Larvicida	24
3.5 A importância da Reação de Knoevenagel para o Ensino de Química	24
4 ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA VIRTUAL DE QUÍMICA	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
APÊNDICE	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Preparação dos aduto aldol	18
Figura 2 - Mecanismo geral para a reação de Knoevenagel	18
Figura 3 - Reação de Condensação de Knoevenagel	19
Figura 4 - Exemplos de condensações de Knoevenagel	19
Figura 5 - Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Princípios da Química Verde	16
Tabela 2 - Exemplos de adutos de Knoevenagel com atividades biológicas.....	21

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AChE - Acetilcolinesterase

CL 50 - Concentração Letal 50%

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMF - Dimetilformamida

FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

MgO - Óxido de magnésio

OMS - Organização Mundial da Saúde

QV - Química Verde

RMN - Ressonância magnética nuclear

RMSD - Desvio Quadrado Médio

TEA - Trietanolamina

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, são praticamente unânimes as opiniões no que se refere à importância da síntese orgânica para o desenvolvimento econômico dos países. Desta forma, a síntese orgânica consiste em uma reação na qual ocorre interação de reagentes inorgânicos para formação de moléculas orgânicas simples ou complexas de compostos químicos com ação biológica.

Para tanto, nos veio à mente o seguinte questionamento: É possível obter compostos derivados de benzilidenomalononitrilas em água e glicerina com altos rendimentos e testar sua ação biológica no controle de larvas do *Aedes aegypti*?

O problema inicialmente delineado nos possibilitou buscar várias alternativas que supostamente comportasse uma sequência de respostas geradas a partir de sínteses e testes biológicos agregados dos fundamentos observados, a saber: i) Parte-se da hipótese de que os compostos benzilidenomalononitrilas não poderão ser sintetizados utilizando apenas água como solvente; ii) É possível obter moléculas derivados de benzilidenomalononitrilas em água e glicerina com altos rendimentos e comprovar sua ação biológica através do controle de larvas do *Aedes aegypti*; iii) É preciso sintetizar os compostos benzilidenomalononitrilas utilizando os princípios da química verde para que ocorra melhor rendimento e menos agressão ao meio ambiente.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo geral desenvolver métodos ambientalmente aceitos, seguros e baratos para sínteses de diferentes benzilidenomalononitrilas com altos rendimentos e avaliando a sua atividade biológica em larvas do *Aedes aegypti* e como objetivos específicos têm: i) Sintetizar benzilidenomalononitrilas através da reação de condensação de Knoevenagel baseado nos princípios da química verde; ii) Caracterizar os compostos sintetizados por técnicas espectroscópicas como Ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H , Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e Espectro de infravermelho (IV); iii) Realizar a simulação do ancoramento molecular entre compostos sintetizados; iv) Avaliar as propriedades larvicida frente larvas do *Ae. Aegypti* dos compostos sintetizados.

Para a elaboração deste trabalho científico, realizou-se uma pesquisa experimental, onde se procurou elaborar um estudo de forma qualitativa e quantitativa. Tendo como método de procedimento o comparativo, pois trabalha em comparar o conjunto dos elementos que existe hoje com suas origens históricas. Para tanto, fez uso do método de abordagem o dedutivo, pois o pesquisador caminha do conhecido para o desconhecido com uma margem

pequena de erro.

Este trabalho é relevante devido aos solventes que foram empregados nas reações, ou seja, água e glicerina, pois a água é um ótimo solvente para reações químicas devido sua reatividade e importância biológica já que não é tóxico para os organismos e a glicerina por ser um solvente bastante empregado na indústria farmacêutica e por não possuir propriedades químicas tóxicas. Por conseguinte, outro diferencial nas nossas sínteses foi o tempo de reação que as moléculas foram expostas durante sua formação, onde não se utilizou equipamento chapa aquecedora justamente visando os princípios da química verde.

Além de serem sintetizadas, estas moléculas por possuírem em sua estrutura um grupo nitrila, também foram testadas para ação larvicida. Ademais, torna-se necessária a busca de novas alternativas ambientalmente seguras, potencialmente adequadas e mais eficazes para uso em programas de combate à larva do *A. aegypti*. Portanto, este trabalho visa o estudo de produtos sintéticos com propriedades larvicida sendo sintetizadas pela Reação de Knoevenagel.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Desenvolver métodos ambientalmente aceitos, seguros e baratos para sínteses de diferentes benzilidenomalononitrilas com altos rendimentos e avaliando a sua atividade biológica em larvas do *Aedes aegypti*.

2.2 Específicos

- Sintetizar benzilidenomalononitrilas através da reação de condensação de Knoevenagel baseado nos princípios da química verde;
- Caracterizar os compostos sintetizados por técnicas espectroscópicas como Ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H , Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e Espectro de infravermelho (IV);
- Realizar a simulação do “ancoramento” molecular entre compostos sintetizados;
- Avaliar a atividade larvicida frente larvas do *Ae. aegypti* dos compostos sintetizados.

3 REFERENCIAL TEORICO

3.1 Química Verde

De acordo com Pitanga (2015), as décadas de 1980/90 foram marcadas por denúncias de problemas ambientais causados pela utilização indiscriminada de algumas substâncias químicas como também pelas primeiras iniciativas que procuraram promover ações de enfrentamento dos impactos, não só ao ambiente natural, mas também às condições de vida da população mundial.

Diante do contexto foi fundamental buscar novas alternativas que minimizar-se os impactos gerados por substâncias tóxicas e um direcionamento surge sob o nome de Green Chemistry, Química Verde (QV) ou Química Limpa (LENARDÃO *et al.*, 2003). Sendo assim, os químicos começaram a se mobilizar a fim de promover iniciativas que visassem diminuir os efeitos provocados pela poluição.

Além disso, para Vilches e Gil (2011), os 12 princípios da QV incluem práticas experimentais de uma forma mais consciente e menos agressiva ao meio ambiente e a saúde, permitindo ao estudante, futuro profissional desta área, fazer relações teórico/práticas mais profundas com o objeto de estudo, propiciando conhecimento e domínio de sua prática.

A tabela abaixo mostra, resumidamente, os 12 Princípios da Química Verde e seus critérios de acordo com Anastas e Warner (1998).

Tabela 1 - Princípios da Química Verde.

PRINCÍPIO	CRITÉRIO
PREVENÇÃO	Evitar a formação de resíduo é melhor que trata-lo.
ECONOMIA ATÔMICA	Buscar utilizar 100% dos materiais iniciais no produto final.
SÍNTESE DE PRODUTOS MENOS PERIGOSOS	Sempre que viável, as sínteses de produtos químicos devem buscar utilizar e gerar substâncias com baixa ou nem uma toxicidade a saúde humana e ao ambiente.
DESENHO DE PRODUTOS SEGUROS	Os produtos químicos devem ser desenhados de tal forma que realizem a função desejada e ao mesmo tempo não sejam tóxicos.
SOLVENTES AUXILIARES MAIS SEGUROS	Não utilizar solventes auxiliares e quando usar, sempre que possível, utilizar solventes com baixa periculosidade.
EFICIÊNCIA ENERGÉTICA	O uso de energia ao realizar os processos químicos, deve sempre ser minimizado e, se possível, realizar em temperatura e pressão ambiente.
USO DE FONTES RENOVÁVEIS DE MATÉRIA-PRIMA	Sempre que técnica e economicamente viável, a utilização de matérias renováveis deve ser escolhida.
EVITAR A FORMAÇÃO DE DERIVADOS	A Derivatização desnecessária deve ser minimizada ou, se possível, evitada. Estas requerem reagentes adicionais e podem gerar

	resíduos.
CATÁLISE	Reagentes catalíticos são os melhores reagentes estequiométricos.
DESENHO PARA A DEGRADAÇÃO	Os produtos químicos devem ser desenhados para que no final sejam degradados inocuamente e não persistam no ambiente.
ANÁLISE EM TEMPO REAL PARA A PREVENÇÃO DA POLUIÇÃO	A necessidade de se criar ferramentas analíticas que acompanhe todo processo e controle em tempo real, antes da formação de substâncias nocivas.
QUÍMICA INTRINSECAMENTE SEGURA PARA A PREVENÇÃO DE ACIDENTES	É necessário escolher processos químicos com substâncias mais seguras, evitando o risco de acidentes químicos, incluindo vazamentos, explosões e incêndios.

Fonte: Adaptado de ANASTAS e WARNER (1998).

A Química Verde envolve o planejamento da síntese e dos produtos químicos visando evitar problemas ambientais que possam causar danos aos seres vivos, eliminando os processos químicos prejudiciais ao ambiente e substituindo-os por outros menos agressivos, sustentáveis e recicláveis (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2013). Sendo assim, Ferreira, Rocha e Silva (2013), citam que implementar métodos sintéticos para substâncias de alta eficácia com menos toxicidade para a saúde humana e para o meio ambiente é necessário, pois minimiza os impactos ambientais e sociais.

Para Marques, Bisol e Sá (2012, p. 1696):

“Tecnologias consideradas limpas representam um conjunto de iniciativas para tornar os processos produtivos mais racionais, com base no uso inteligente e econômico de matérias primas e utilidades, minimizando e, se possível, eliminando a geração de contaminantes que possam colocar em risco a saúde do homem e do meio ambiente”.

“Sempre que possível os químicos buscam realizar reações sem solvente, o que é especialmente difícil quando se trata de um processo em grande escala” (MARQUES; BISOL; SÁ, 2012, p. 1699). Portanto, a alternativa é descobrir substitutos que tenham um ciclo de funcionalmente mais verde, reduzindo assim o impacto ambiental.

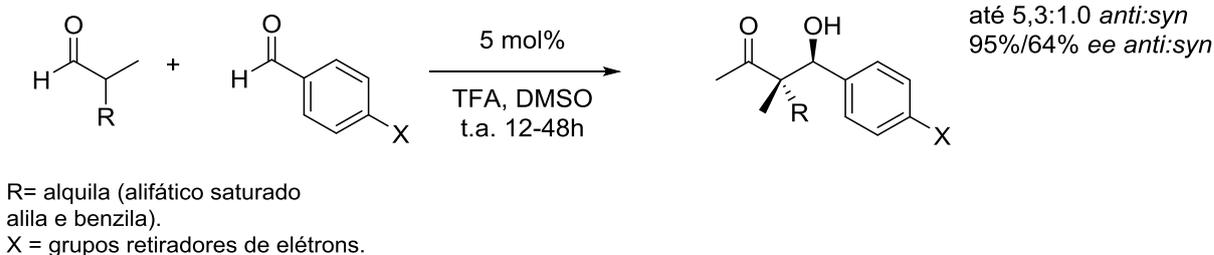
3.2 Reação de Condensação de Knoevenagel

Segundo Larhed & Hallberd (2001, p. 406), “a condensação de Knoevenagel é uma reação importante devido sua clássica formação de ligação C-C em química orgânica”. Desta forma, “essa condensação ocorre entre aldeídos ou cetonas e compostos de metileno ativos com amônia ou outra amina como catalisador de solventes orgânicos” (KNOEVENAGEL, 1894, p. 2345).

A reação de Knoevenagel é considerada uma “modificação do aldol onde a principal

diferença entre essas abordagens é a maior acidez do hidrogênio ativo de metileno quando comparado a um hidrogênio de α -carbonila” (KWAK; FUJIKI, 2004, p. 2021). A Figura 1 mostra a formação da preparação dos adutos aldol (TIETZE, 1991).

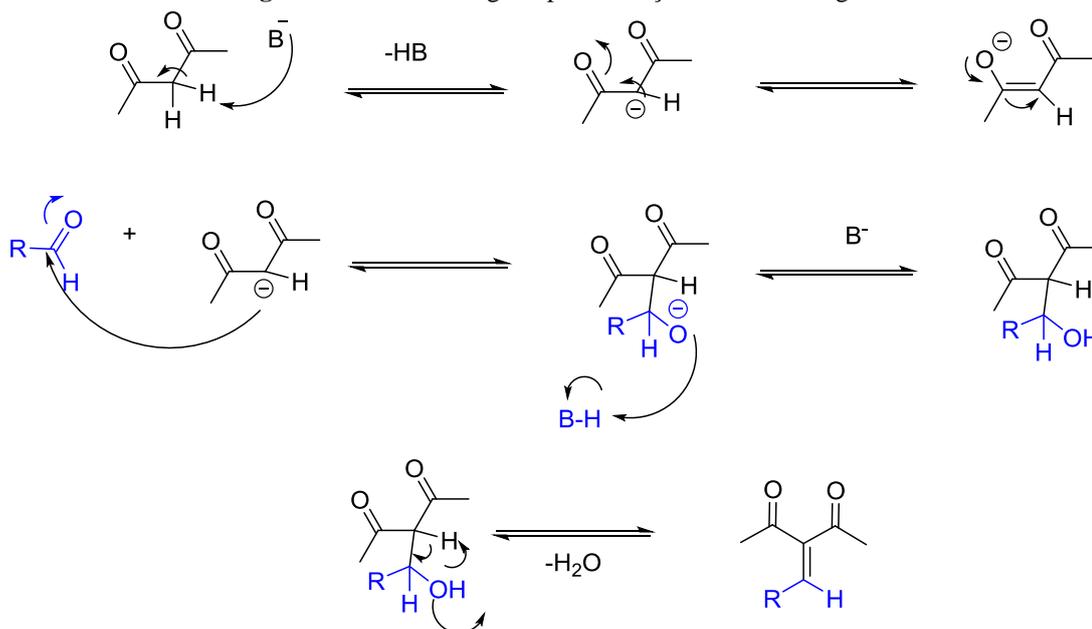
Figura 1- Preparação dos aduto aldol.



Fonte: TIETZE, (1991).

“Na primeira descrição da reação de Knoevenagel foram introduzidas mudanças usando piridina como solvente e piperidina como catalisador, que foi denominada Modificação de Doebner” (MARCH, 1992, p. 2374). Ademais, “o mecanismo geral para a reação de Knoevenagel envolve a desprotonação do derivado malonato pela piperidina e o ataque pelo carbônio formado na subunidade carbonila como uma reação aldólica” (MISHRA; HAJRA, 2015, p. 5651). Portanto, a figura 2 ilustra o mecanismo geral da reação de Knoevenagel de forma simplificada.

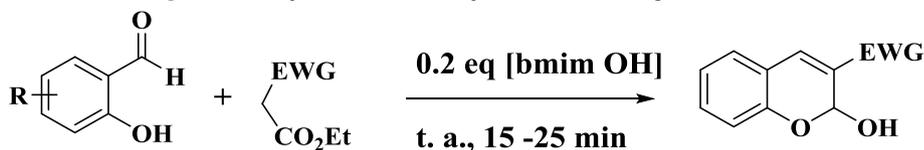
Figura 2 - Mecanismo geral para a reação de Knoevenagel.



Fonte: RAMESH e LALITHA (2015).

Opanasenko (2013), relata que dependendo do substrato, as reações de condensação podem ser realizadas em meio básico ou meio ácido, reagentes estes que são tipicamente solúveis no meio reacional (Figura 3), ou seja, embora essas reações possam apresentar altos rendimentos, o maior problema está na geração de quantidades consideráveis de resíduos que permanecem solubilizados no meio reacional.

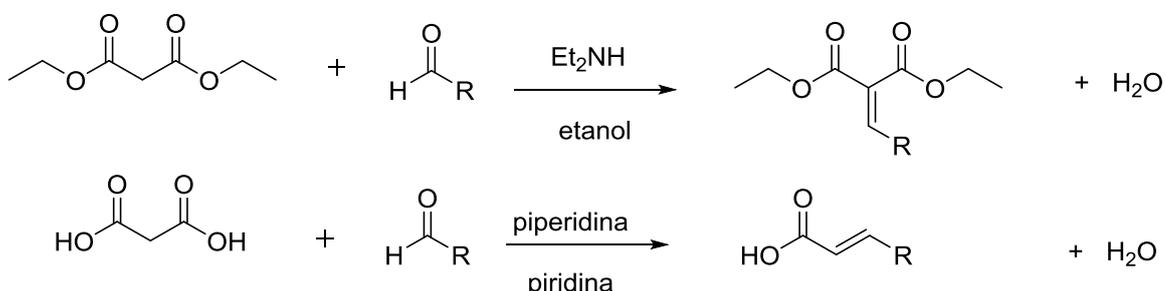
Figura 3 Reação de Condensação de Knoevenagel.



Fonte: CUNHA e SANTANA, (2012).

“Esta reação consiste na reação entre um composto carbonílico e outro contendo o grupo metileno ativado, resultando na formação do aduto com uma ligação dupla carbono-carbono podendo formar ácidos acrílicos beta substituídos quando o ácido malônico é o componente dicarboxílico” (SMITH; MARCH, 2001, p. 2374).

Figura 4 Exemplos de condensações de Knoevenagel



Fonte: Próprio autor – ChemBioDraw versão 12.

Para Opanasenko (2013), os produtos que podem ser gerados pela reação de condensação de Knoevenagel são muitos, dentre eles as nitrilas, utilizadas na polimerização aniônica e os ésteres α,β -insaturados, importantes intermediários para produção de medicamentos e produtos farmacológicos complexos, como mostra a tabela 2.

3.2.1 Produtos Sintéticos Gerados a Partir da Reação de Knoevenagel

“O primeiro mecanismo da condensação de Knoevenagel catalisada por aminas foi proposto pelo próprio autor em 1898” (LARHED; HALLBERD, 2001, p. 406). Sendo assim, a primeira etapa consistiria na formação de uma espécie iônica intermediária, o íon imínio,

que teria por objetivo a ativação da carbonila, tornando-a mais suscetível ao ataque nucleofílico do carbânion formado na etapa de desprotonação (OPANASENKO, 2013).

“Devido à considerável versatilidade da reação de Knoevenagel, não é possível estabelecer com certeza um mecanismo uniforme para todas as classes de catalisadores utilizados ao longo dos anos” (LARHED; HALLBERD, 2001, p. 406).

Dependendo do tipo de catalisador e substratos utilizados nas reações de condensação de Knoevenagel, ela pode se processar via formação do íon imínio ou amina ou pela formação de outros intermediários de reação (VILCHES; GIL, 2011).

Cunha & Santana (2012), propôs outro mecanismo para a condensação de Knoevenagel, sendo este análogo ao de uma condensação aldólica e contendo, basicamente, três etapas principais:

- Desprotonação do metileno ativo pela ação da base;
- Ataque nucleofílico do carbânion formado ao carbono carbonílico de um aldeído ou de uma cetona, formando uma ligação C-C entre as duas espécies envolvidas;
- Eliminação de uma molécula água e formação da insaturação (dupla ligação).

“Muitas reações clássicas, como a reação de Knoevenagel, foram estudadas com base na perspectiva da química verde, que é muito importante no contexto da indústria farmacêutica” (KWAK; FUJIKI, 2004, p. 2021).

Quanto a sua aplicabilidade, os adutos de Knoevenagel e a reação de condensação possuem relevância na produção de compostos com atividade biológica e na indústria farmacêutica, principalmente como intermediários sintéticos, usualmente nomeados como blocos construtores de moléculas mais complexas.

A tabela 2 ilustra alguns exemplos de aplicações de diferentes adutos de Knoevenagel na síntese de compostos com atividade biológica.

Tabela 2 - Exemplos de adutos de Knoevenal com atividades biológicas.

Reação	Aplicação
	Atividade antibacteriana
	Atividade antimicrobiana
	Atividade antimicrobiana
	Inibidor da enzima α -glucosidase
	Antidepressivo

Fonte: ZANIN (2018, p 16).

“A consequência destas propriedades (bioatividades) é o alto valor agregado a alguns compostos. Entre os 20 medicamentos mais vendidos em 2010, a Atorvastatina estava no topo, correspondendo a US\$ 12, 6 bilhões em vendas” (ZANIN *et al.*, 2018, p. 519). Sendo assim, na síntese de Atorvastatina utiliza-se a condensação de Knoevenagel para se obter um produto intermediário deste fármaco (ZANIN, 2018).

3.2.2 Efeito do solvente

Segundo Costa *et al.*, (2005), observou-se que tanto para solventes polares apróticos como a dimetilformamida, ou próticos como o metanol, a condensação é grandemente favorecida.

Quando se utilizam solventes como etanol, metanol, dimetilformamida e principalmente água, a velocidade da reação é maior do que quando se utiliza solventes como tolueno ou tetracloreto de carbono (CUNHA; SANTANA, 2012). Ou seja, solventes que são polares possuem constante dielétrica elevada (COSTA *et al.*, 2005). Portanto, isso favorece a formação e a estabilização de íons, o que é importante para reações que envolvem intermediários aniônicos (CUNHA; SANTANA, 2012).

Isobe *et al.*, (2005), realizaram estudos dos efeitos dos solventes na condensação de Knoevenagel em sistemas heterogêneos. Ademais, “o emprego da água como solvente traz benefícios, uma vez que a água é um solvente economicamente viável, não tóxico e ambientalmente correto” (TIETZE, 1991, p. 392).

“Observa-se que os melhores resultados são obtidos quando se utiliza tolueno e, principalmente, água como solvente” (ISOBE *et al.*, 2005, p. 317).

Os solventes polares e próticos como a água, são capazes de solvatar com maior eficiência os intermediários iônicos, como o ânion enolato a ser adicionado ao aldeído, pois existe a possibilidade de realização de ligação de hidrogênio ou íon-dipolo entre o solvente e o ânion, estabilizando a carga do íon. Portanto, “está estabilização dos íons leva à maior atividade do sistema, refletindo em maior rendimento reacional” (COSTA *et al.*, 2005).

“Por muito tempo acreditou-se que a água, por ser um produto da condensação de Knoevenagel, diminuiria o rendimento da reação, pois inibiria a eliminação de água do intermediário aldólico, no último equilíbrio para a formação do composto de condensação” (TIETZE, 2002, p. 392). No entanto, alguns pesquisadores realizaram a condensação de Knoevenagel sem retirar a água formada e a colocaram como solvente, obtendo resultados comparáveis a outros solventes (ZANIN, 2018).

3.3 *Aedes aegypti*

Para Gomes (2016), o *Aedes aegypti* é reconhecível pela sua cor preta, pernas rajadas e pintas brancas. Além disso, é original do norte da África, onde ocupava originalmente florestas. Seu nome significa "o odioso do Egito" (*aedes* vem do grego e *aegypti*, do latim). Desta forma, apenas as fêmeas dos mosquitos picam o ser humano em busca de alimento (o sangue possui elementos necessários para o

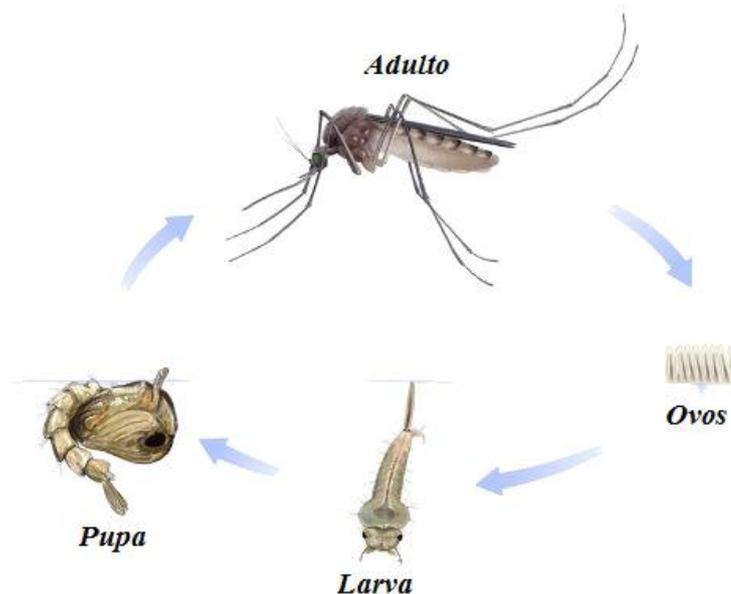
desenvolvimento dos ovos desse inseto).

“Tanto o macho quanto a fêmea alimentam-se de substâncias que contêm açúcar (néctar, seiva, entre outros), mas como o macho não produz ovos, não necessita de sangue” (LEFEVRE *et al.*, 2003, p. 359). Entretanto, a ocorrência das doenças, principalmente a dengue, tem crescido rapidamente em todo mundo nas últimas décadas. Avalia-se que 390 milhões de infecções por dengue por ano, dentre os quais 96 milhões com manifestação clínica (BRAHTT, 2013).

Segundo World Health Organization (2009), a dengue é uma doença transmitida pelo mosquito que se tornou uma das principais preocupações na saúde pública, principalmente em regiões tropical e subtropical. Desta forma, aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas estão em risco de infecção, e 50 milhões de casos são registrados a cada ano em todo o mundo.

No Brasil, os primeiros relatos datam do final do século XIX e início do século XX. Além disso, o mosquito apresenta em seu ciclo de vida as fases ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (GARCEZ; GARCEZ; SILVA, 2013).

Figura 5 Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.



Fonte: LEFEVRE *et al.*, (2003, p. 359).

As larvas são aquáticas, alimentam-se principalmente de matéria orgânica que se acumulam nas paredes dos criadouros, e não resistem a extensos períodos sem alimentação (GARCEZ; GARCEZ; SILVA, 2013). “Passam por quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4) e a duração desta fase depende da temperatura e disponibilidade de alimento, porém em

condições favoráveis, o período do primeiro ao quarto estágio não passa de cinco dias” (LEFEVRE *et al.*, 2003, p. 359).

3.4 Atividade Larvívica

Segundo Lefevre *et al.*, (2003), as estratégias utilizadas para controle das larvas e dos mosquitos *A. aegypti* são baseadas no uso de várias técnicas disponíveis, como o emprego do bioinseticida *Bacillus Thuringiensis* h-14 (bti), peixes larvófagos das espécies *Gambusia affinis* e *Poecilia sp* e dos inseticidas químicos das classes dos piretroides, carbamatos e organofosforados, além da melhoria de saneamento.

No entanto, o uso continuado de inseticidas sintéticos tem causado o problema de descontrole da população do mosquito, levando ao surgimento de espécies resistentes a uma grande variedade de inseticidas (BRAHTT, 2013).

Conhecido por sua grande capacidade de adaptação, o *Aedes aegypti*, proveniente da África, disseminou-se pelo mundo a partir do século XVII. Desde esta época, foram documentados casos de doenças provocadas pelo vetor em quase todos os continentes, exceção da Antártida (GARCEZ; GARCEZ; SILVA, 2013).

Todavia, com o uso continuado e prolongado de inseticidas sintéticos, tem motivado a seleção de indivíduos resistentes e a perda da eficiência, pois ao se reproduzirem, eles propagam os genes responsáveis pela resistência aos seus descendentes, e pouco a pouco, a população se torna mais tolerante e menos sensível ao produto. Desta forma, outros efeitos indesejados, como a toxicidade aos seres humanos e a outros organismos não-alvo e também poluição ambiental” (NICOLAU; ALVES; NOGUEIRA, 2013).

3.5 A importância da Reação de Knoevenagel para o Ensino de Química

Apesar do cenário otimista, ainda são escassos os relatos de aulas desenvolvidas ou adaptadas para o ensino experimental de QV na graduação (CUNHA *et al.*, 2015).

Segundo Marques, Bisol e Sá (2012, p. 1696), “em função da preocupação com o ensino de química orgânica, é importante se desenvolver aulas práticas de química orgânica verde onde se explorem aspectos sintéticos e mecanísticos da condensação de Knoevenagel de aldeídos aromáticos, adaptando procedimentos já descrito na literatura que utilize água como solvente, reforçando os aspectos teóricos dos cursos básicos de química orgânica, bem como os princípios de química verde”.

Nos cursos teóricos de química orgânica ministrados na graduação, um dos temas mais ricos é a química das substâncias carboniladas, onde os aldeídos e cetonas ocupam lugar de destaque (PINTO; SILVA, 2012). Para Cunha *et al.*, (2015), a relação entre a estrutura e a

reatividade é recursivamente empregada para avaliar a reatividade entre os membros de uma mesma família de compostos. Desta forma, quando a variação na estrutura envolve a modificação do substituinte do anel aromático, por exemplo, o estudante é treinado a correlacionar o efeito eletrônico com a variação da reatividade (PINTO; SILVA, 2012).

Segundo Pitanga (2015), as implicações sintéticas e mecanísticas da reação de Knoevenagel podem ser discutidas de forma integrada, mesmo que a parte referente à investigação da reatividade dos aldeídos não seja executada, o que contribui para a consolidação dos ensinamentos dos cursos teóricos.

Todavia, tão importantes quanto os aspectos acima, a execução deste trabalho contribui para a formação de novas gerações de químicos treinados na forma moderna de fazer Química. Portanto, tal atitude está em consonância com o paradigma de pensar como cientista e atuar como Professor.

Artigo

A Simple and Efficient Protocol for the Knoevenagel Reaction of Benzylidenemalononitriles and the Evaluation of the Larvicidal Activity on *Aedes Aegypti*

Carvalho, H. L.; Amorim, A. L.; Araújo, I. F.; Marino, B. L. B.; Jimenez, D. E. Q.; Ferreira, R. M. A.; Hage-Melim, L. I. P.; Souto, R. N. S.; Porto, A. L. M.; Ferreira, I. M.*

Rev. Virtual Quim., 2018, 10 (2), 362-374. Data de publicação na Web: 22 de março de 2018

<http://rvq.sbq.org.br>

Um Protocolo Simples e Eficiente para a Reação de Knoevenagel de Benzilidenomalonitrilas e Avaliação da Atividade Larvicida em *Aedes Aegypti*

Resumo: Os mosquitos do gênero *Aedes* são responsáveis pela dengue, febre amarela, chikungunya e Zika. Embora importantes avanços surgiram no desenvolvimento de medidas alternativas para o controle de mosquitos, os inseticidas químicos continuam sendo uma parte vital dos programas de controle integrado. Nesse trabalho foram sintetizados uma série de benzilidenomalononitrilas em bons rendimentos (71-99%), usando apenas água e glicerol a temperatura ambiente. O estudo da atividade larvicida entre os derivados de benzilidenomalononitrilas mostrou que o composto **2e** (R = 4-Cl) apresentou melhor atividade larvicida (LC₅₀ e LC₉₀ de 9,42 e 15,02, respectivamente, em 24 h). Um estudo de *docking* molecular foi aplicado para identificar a interação do modo **2e** com os sítios de ligação na enzima acetilcolinesterase, o perfil de interação mostrou um valor de 48,9795, com cinco ligações em três diferentes aminoácidos.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; Química verde; Atividade larvicida; Docking molecular.

Abstract

Mosquitoes of the genus *Aedes* are responsible for dengue, yellow fever, chikungunya and Zika. Although important advances have emerged in the development of alternative methods for mosquito control, chemical insecticides remain a vital part of integrated control programs. In this paper were synthesized benzylidenemalononitrile derivatives in good yields (71-99%) using only water and glycerol at room temperature. A study of the larvicidal activity between benzylidenemalononitriles showed that the compound **2e** (R= 4-Cl) possesses excellent larvicidal activity (LC₅₀ and LC₉₀ of 9.42 and 15.02, respectively at 24 h). A study of molecular docking was applied to identify the type of interaction of compound **2e** with binding sites at the enzyme acetylcholinesterase. The profile of the interaction showed a score 48.9795 with five bonds at three different amino acids.

Keywords: *Aedes aegypti*; Green chemistry; Larvicidal activity; Molecular docking.

* Universidade Federal do Amapá, Grupo de Biocatálise e Biotransformação em Química Orgânica, Colegiado de Química, Rod. JK, KM 02, CEP 68902-280, Macapá, Amapá, Brasil.

✉ irlon.ferreira@gmail.com

DOI: [10.21577/1984-6835.20180028](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180028)

A Simple and Efficient Protocol for the Knoevenagel Reaction of Benzylidenemalononitriles and the Evaluation of the Larvicidal Activity on *Aedes Aegypti*

Harlyson L. Carvalho,^a Andréia L. de Amorim,^a Inana F. Araújo,^{a,b} Bianca L. B. Marino,^c David E. Q. Jimenez,^d Ricardo M. A. Ferreira,^b Lorane I. S. Hage-Melim,^c Raimundo N. P. Souto,^b André L. M. Porto,^d Irlon M. Ferreira^{a,*}

^a Universidade Federal do Amapá, Grupo de Biocatálise e Biotransformação em Química Orgânica, Colegiado de Química, Rod. JK, KM 02, CEP 68902-280, Macapá, Amapá, Brasil.

^b Universidade Federal do Amapá, Laboratório de Artrópodes, Colegiado de Biologia, Rod. JK, KM 02, CEP 68902-280, Macapá, Amapá, Brasil.

^c Universidade Federal do Amapá, Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal, Rod. JK, KM 02, CEP 68902-280, Macapá, Amapá, Brasil.

^d Universidade de São Paulo, Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise, Instituto de Química de São Carlos, Av. João Dagnone, 1100, Ed. Química Ambiental, J. Santa Angelina, 13563-120 São Carlos, São Paulo, Brasil.

* irlon.ferreira@gmail.com

Recebido em 23 de outubro de 2017. Aceito para publicação em 21 de março de 2018

1. Introduction

2. Materials and methods

2.1. General methods

2.2. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

2.3. Fourier Transform Infrared (FTIR)

2.4. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

2.5. Chemical reagents

2.6. Synthesis of the benzylidenemalononitrile derivatives (**2a-g**)

2.7. Physical and spectroscopic data

2.8. Larvicidal activity

2.9. Statistical analysis

2.10. Molecular docking between the compound **2e** and the enzyme acetylcholinesterase

3. Results and discussion

4. Conclusion

1. Introduction

Mosquitoes of the genus *Aedes* are responsible for dengue, yellow fever, chikungunya, and Zika.¹ Yellow fever, like dengue, is a viral hemorrhagic fever and can be lethal. Chikungunya virus is an alphavirus that belongs to the Semliki Forest Virus antigenic complex. More one million cases have been reported in the Americas since 2013. The first Brazilian case was confirmed in the Amapá federal state in 201.²⁻⁴ Zika virus has generated a great deal of concern because of its associations with microcephaly and Guillain-Barré syndrom.^{5,6} These pathogens collectively infect 100 million people every year, and over 2.5 billion people live in areas susceptible to these disease.^{1,7,8}

Insecticides,^{7,9} genetically modified mosquitoes,¹⁰ and larvicides^{11,12} can all control these vectors. However, controlling the mosquito vector at the larval stage is especially powerful because they can be easily targeted in breeding habitats, i.e., larvae are immobile.

Although important advances have emerged in the development of alternative measures for mosquito control, chemical insecticides remain a vital part of integrated control programs. The use the pyrethroid and organophosphate pesticides are common in the control of adult mosquitoes worldwide.^{1,9} However, resistance to insecticides is a growing problem in vector control programs this resistance can be a consequence of various physiological variables.^{13,14}

Concurrently, continuous monitoring of mosquito populations may play an important role in preventing or minimizing the development of resistance to effective insecticides. However, developing new products to combat insects is equally important. Therefore, the synthesis of new biologically active compounds for larvicidal control has attracted strong interest.

Benzylidenemalononitrile derivatives are versatile building blocks in the synthesis of biological and pharmacological molecules.

For example, 1,3-diarylpyrazole derivatives have anti-inflammatory properties¹⁵ and can be prepared via an intermediary in the synthesis of tyrphostins, which are active in cancer cell lines.¹⁶ Similarly, aminopyridines are potent antibacterial agents¹⁷ and the phenanthroline-3-carbonitrile precursor analogues have larvicidal activity against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*.¹⁸

The synthesis of benzylidenemalononitrile derivatives occurs via the Knoevenagel condensation. Synthesis in aqueous solvent has experienced remarkable growth, but this synthesis usually requires catalysts such as organic bases, Lewis acids,¹⁹ ionic liquids,²⁰ organometallic catalysts,²¹ and functionalized biopolymers under microwave irradiation.²² In continuation of our work on new catalyst-free synthetic strategies,^{23,24} we developed an efficient and easy methodology that use only water and glycerol at room temperature to prepare benzylidenemalononitrile derivatives with potential larvicidal activity against *Aedes aegypti*.

2. Materials and methods

2.1. General methods

2.2. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

The reactions analyses were conducted using a gas chromatograph (GC2010 Ultra Shimadzu Corporation, Japan) equipped with an auto-sampler injection AOC-20i (Shimadzu). Electron capture detection used as detector (Shimadzu MS2010 Plus), electronic impact of 70 eV and fragments detected from 50-500 Da. Separations were performed on a fused silica capillary column (DB-5MS 5% 30 m × 0.25 mm internal diameter, 0.25 mm film thickness) in a stream of helium 1.0 mL min⁻¹. Injector temperature was 230 °C, ion source 200 °C, 270 °C of interface and split ratio 5. The oven temperature program started at 100 °C with

an increase of 7 °C min⁻¹ to 200 °C and 20 °C min⁻¹ to 300 °C lasting for 2 min.

2.3. Fourier Transform Infrared (FTIR)

FTIR spectra were recorded on a Bomem MB-100 spectrometer samples were prepared as thin films on KBr disks. The transmittance was expressed in cm⁻¹ of band between 4000 to 400 cm⁻¹.

2.4. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

NMR spectra were recorded on an Agilent Technologies 500/54 Premium Shielded or Agilent Technologies 400/54 Premium Shielded spectrometer. The samples were solubilized in CDCl₃ (99.9%) or CD₃OD (99.9%) and chemical shifts expressed in ppm relative to internal standard TMS or deuterated solvents. The chemical shifts were given in ppm and coupling constants (*J*) in Hz. The description of signals includes: s = singlet, d = doublet, t = triplet and m = multiplet.

2.5. Chemical reagents

Benzaldehyde **1a** (99.5%), 4-methoxybenzaldehyde **1b** (98%), 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde **1c** (99%), 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde **1d** (98%), 4-chlorobenzaldehyde **1e** (97%), 4-fluorobenzaldehyde **1f** (98%), 3-nitrobenzaldehyde **1g** (98%) and malononitrile (99%) (Table 2) were purchased of Sigma-Aldrich and used without further purification. Glycerol (98%) and ethanol (99%) were purchased of Vetec. Deuterated solvents were purchased from Cambridge Isotope Laboratories.

2.6. Synthesis of the benzylidenemalononitrile derivatives (2a-g)

The benzylidenemalononitrile products (**2a-g**) were prepared via Knoevenagel condensation (Table 2) from a mixture of appropriate aldehydes **1a-g** (3 mmol) and malononitrile (3.5 mmol) in 5 mL of water and glycerol (1:1) in a 25 mL round bottomed flask. The solution was maintained with magnetic stirring for 24 h at room temperature. The reaction was monitored by silica TLC plates, and bands were visualized under ultraviolet (UV) light, using hexane and acetyl acetate (7:3) as the eluent. At the end of the reaction, the precipitate was filtered and washed with ice water (50 mL). The product was recrystallized in ethanol overnight. All resulting compounds **1a-g** were obtained in good yields and characterized by melting point, ¹H NMR, FT-IR, and GC-MS analysis (Supplementary information).

2.7. Physical and spectroscopic data

2-benzylidenemalononitrile (**2a**): Molecular formula: C₁₀H₆N₂; MW: 154.05 g/mol; White solid; M.p. 85 °C; Yield 0.461 g (99%); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.92 (m, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.64 (m, 1H), 7.54 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ 159.9, 134.6, 130.8, 129.6, 113.6, 112.5, 82.7; IR (KBr, cm⁻¹): 3032, 2224, 1683, 756, 677; MS (70 eV, %): *m/z* 154 (100), 127 (90), 103 (60).

2-(4-methoxybenzylidene)malononitrile (**2b**): C₁₁H₈N₂O; MW: 184.06 g/mol; Yellow solid; M.p. 122 °C; Yield 0.480 g (84%); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.88 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.63 (s, 1H), 7.0 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): 164.72, 158.75, 133.14, 123.24, 114.80, 114.05, 112.84, 78.69, 55.69; IR (KBr, cm⁻¹): 3026, 2986, 2221, 1605; MS (70 eV, %): *m/z* 184 (100), 161 (13), 141 (25), 114 (42).

2-(3,4,5-trimethoxybenzylidene)malononitrile (2c): $C_{13}H_{12}N_2O_3$; MW: 244.08 g/mol; Yellow solid; M.p. 148 °C; Yield 0.724 g (99%); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, ppm): 7.63 (t, $J=0.5$ Hz, 1H), 7.24 (s, 2H), 7.17 (d, $J=0.5$ Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.89 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$, ppm): 159.32, 153.35, 144.03, 125.89, 113.94, 113.15, 108.31, 80.59, 61.21, 56.34, 29.66.; IR (KBr, cm^{-1}): 3018, 2220, 1504, 1257, 1041. MS (70 eV, %): m/z 244 (100), 229 (74), 201 (37), 186 (21), 158 (32), 115 (32).

2-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene)malononitrile (2d): $C_{11}H_8N_2O_2$; MW: 200.02 g/mol; White solid; M.p. 136 °C; Yield 0.504 g (84%); 1H NMR (500 MHz, CD_3OD , ppm): δ 7.94 (s, 1H), 7.57-7.56 (d, 1H, $J=2.5$ Hz), 7.43 (m, 1H), 7.07 (d, 1H, $J=8.5$ Hz), 3.95 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD , ppm): 159.76, 153.71, 146.92, 126.05, 124.67, 115.22, 114.45, 113.38, 111.19, 76.87, 55.05; IR (KBr, cm^{-1}): 3427, 3022, 2976, 2225, 226, 1026. MS (70 eV, %): m/z 200 (100), 157 (95), 129 (29), 102 (50).

2-(4-chlorobenzylidene)malononitrile (2e): $C_{10}H_5ClN_2$; MM: 188.01 g/mol; White solid; M.p. 176 °C; Yield 0.4455 g (79%); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 7.88-7.85 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.55-7.52 (d, $J=8.5$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$, ppm): 158.26, 141.15, 131.83, 130.07, 129.27, 113.42, 112.32, 83.37; IR (KBr, cm^{-1}): 3095, 3032, 2225, 1683, 827. MS (70 eV, %): m/z 188 (71), 153 (100).

2-(4-fluorobenzylidene)malononitrile (2f): $C_{10}H_5FN_2$; MW: 172.04 g/mol; White solid; M.p. 135°C; Yield 0.4128 g (80%); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 7.98-7.96 (m, 2H), 7.75 (s, H), 7.27-7.23 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, ppm): 166.11 (d, $^1J_{C-F}=207$ Hz), 157.98, 133.37, 127.18, 117.18, 113.40, 112.22, 82.05; IR (KBr, cm^{-1}): 3074, 3041, 2229, 1508. MS (70 eV, %): m/z 172 (100), 145 (96), 121 (54).

2-(4-nitrobenzylidene)malononitrile (2g): $C_{10}H_5N_3O_2$; MW: 199.04 g/mol; White solid; M.p. 106 °C; Yield 0.423 g (71 %); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 8.38-8.36 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 8.07-8.04 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.87 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, ppm): 56.82, 150.33, 135.76, 131.27, 124.60, 112.58, 111.55, 87.52; IR (KBr, cm^{-1}): 3045, 2225, 1527, 1356. MS (70 eV, %): m/z 199 (75), 153 (100), 141 (33), 123 (86).

2.8. Larvicidal activity

2.8.1. Collection and maintenance of target vector

The larvicidal experiments used third instar larvae of *Aedes aegypti* Rockefeller strain from the Arthropoda Laboratory of the Federal University of Amapá. The assay was conducted under controlled conditions with a temperature between 25 ± 2 °C, relative humidity of $75 \pm 5\%$, and photoperiod of 12 hours.

2.8.2. Larvicidal activity in vivo

Compounds **2a-g** were dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO) at different concentrations (15.0, 12.5, 10.0, 5.00, and 2.50 ppm) from a stock solution of 1.500 ppm. Negative controls were performed using distilled water containing the same amount of DMSO (1%). All experiments were performed in triplicate with 10 larvae in each replicate. The mortality rate of the larvae was determined at 24 and 48 h of exposure. Larvae were considered dead when they did not respond to stimuli or did not rise to the solution surface relative to the control. The bioassay experiments were conducted according to World Health Organization (WHO) standards with modifications.²⁵

2.9. Statistical analysis

The lethal concentration LC_{50} and LC_{90} (determined in 24 and 48 h incubation) for compound **2e** were calculated using Probit analysis with Software StatGraphic Centurium XV version 15.2.11. When the control mortality of the treated groups was between 5-20%, the analysis was corrected according to WHO²⁵ formula: mortality (%) = $X - Y/X \times 100$, where X = percent survival in the untreated control and Y = percent survival in the treated sample.

2.10. Molecular docking between the compound **2e** and the acetylcholinesterase

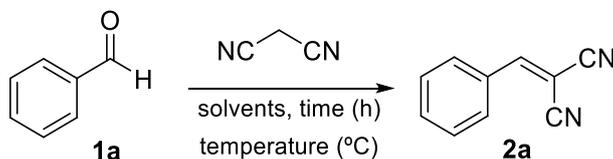
The crystallographic structure of acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster* deposited in complex form under code 1DX4 with a resolution of 3.64 Å was selected from the Protein Data Bank (PDB). To validate the docking, the Mean Square Deviation (RMSD) was calculated using the Discovery Studio (DS) Visualizer for the crystallographic structure, and the docking simulation was performed using GOLD 4.1. The RMSD was considered relevant for results below 2 Å; the RMSD for 1XD4

complex ligand was 0.7732 Å.²⁶ The amino acids of the active site were selected as described in the literature: TYR71; TRP83; GLY149; PHE330; Y370; TRP472; and HIS480.²⁷

3. Results and discussion

The reaction of benzaldehyde **1a** with 1 equiv. of malononitrile at room temperature in water for 24 h resulted in trace yield of Knoevenagel adduct **2a** (Table 1, entry 1). When the reaction was performed using a mixture of water and glycerol (1:1) as solvents and at room temperature the product **2a** was formed with 99% yield (Table 1, entry 2). Glycerol is a green co-solvent in several reactions in organic synthesis. Beyond to increase the solubility of organic reagents, facilitates the separation of the reaction product. The yield using glycerol as solvent at 24 h was of only 54% (Table 1, entry 3) due to glycerol's high viscosity. However, when the reaction was performed in a mixture of water and glycerol at 50 °C for 12 h (Table 1, entry 3), the product **2a** was formed with 75% yield. These experiments showed that the success of the reaction was dependent on the solvent effects.

Table 1. Optimization of synthesis of benzylidenemalononitrile **2a** via the Knoevenagel condensation using water and glycerol as solvents



Entry	Time (h)	Solvents	Temperature (°C)	Yield (%) 2a
1	24	Water	r.t.	Trace
2	24	Water:Glycerol	r.t.	99
3	24	Glycerol	r.t.	54
4	12	Water:Glycerol	50	75
5	12	Water:Glycerol	r.t.	90

r.t. = room temperature (30 °C ± 2 °C)

The water and glycerol mixture at room temperature outperforms conventional organic solvents like toluene, DMF, and ethanol. The condition reaction (Table 1, entry 2) encouraged us to apply this method for the synthesis of others benzylidenemalononitrile compounds (Table 2). Aldehydes **1a-g** with different functional groups were used to evaluate the influence of the substituent groups. In all cases, the formation of benzylidenemalononitrile compounds **2a-g** occurred via the Knoevenagel reaction.

All Knoevenagel adducts **2a-g** were obtained in good yields (71-99%). In general, the aromatic aldehydes readily condensed with malononitrile. Xu and co-authors reported the formation of these compounds in excellent yields of 99%; however, this reaction occurred in the presence of 10% polystyrene-supported DABCO as the catalyst in methanol at room temperature for 60 min.²⁸ In another study, Sonawane and co-authors showed the formation of benzylidenemalononitrile compounds in 98% yield using 5 mol% Ni(NO₃)₂·6H₂O at room temperature in water for 20 min.²⁹ Compounds **2a-g** were characterized by FTIR, GC-MS, and NMR and compared to literature data (Supplementary Information).

The benzylidenemalononitrile compounds **2a-g** were tested against *Aedes aegypti* larvae at different concentrations (15, 12.5, 10, 5, and 2.5 ppm). Of these, the compound **2e** had the most promising larvicidal properties (Figure 1).

Electron-rich compound such as 2-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene)malononitrile **2c** exhibited low larvicidal activity profile. Similar data was observed for 2-(3,4,5-

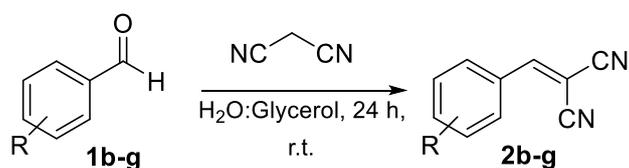
trimethoxybenzylidene)malononitrile **2d**. The compound **2b** showed better larvicidal mortality in comparison to their analogues approximately 30% at 12 ppm with 48 h of incubation.

Among the halogenated compounds, the 2-(4-chlorobenzylidene)malononitrile **2e** had the best larvicidal mortality with LC₅₀ values of 9.42 and 9.44 at 24 h and 48 h, respectively. The LC₉₀ were 15.02 and 15.05 at 24 h and 48 h, respectively for the adduct **2e** (Table 3). This result confirmed the strong influence of the electronic and steric effects on the substituents on the benzylidenemalononitrile derivatives in the larvicidal activity of *Aedes aegypti*. Similarly, Da Silva and coworkers studied the larvicidal activity in a biurets series. They noted that activity for the fluorine *para*-substituent was lower than the chlorine.³⁰

The 2-(4-fluorobenzylidene)malononitrile **2f** showed a mortality rate lower than 5%. The 2-(3-nitrobenzylidene)malononitrile **2g** has a strongly electron withdrawing substituent attached to the aromatic ring, and it did not exhibit mortality against *Aedes aegypti* larvae at 12 ppm.

Acetylcholinesterase (AChE) plays an important role in transmitting the signal/message to central nervous system, and it a critical mosquito enzyme, and AChE is the molecular target for many insecticides including organophosphate and carbamate compounds.³⁴ Thus, molecular docking was used to identify the mode of interaction between linkers at the enzyme or receptor/binding site via specific key interactions. This can predict the binding affinity between the protein-linker complexes.³⁵

Table 1. Synthesis of benzylidenemalononitrile derivatives **2b-g** via Knoevenagel reaction in water and glycerol at room temperature for 24 h.



Entry	Aldehyde (1b-h)	Product (2b-g)	Yield (%)	M.p. [M.p. of literature]
1	 1b	 2b	87	122 °C [114 - 116°C] ³²
2	 1c	 2c	84	136 °C [134-136 °C] ³²
3	 1d	 2d	99	148 °C [149-150 °C] ³³
4	 1e	 2e	79	170 °C [166-167 °C] ³³
5	 1f	 2f	80	130°C [125 - 126 °C] ²⁰
6	 1g	 2g	71	113 °C [107-109 °C] ³³

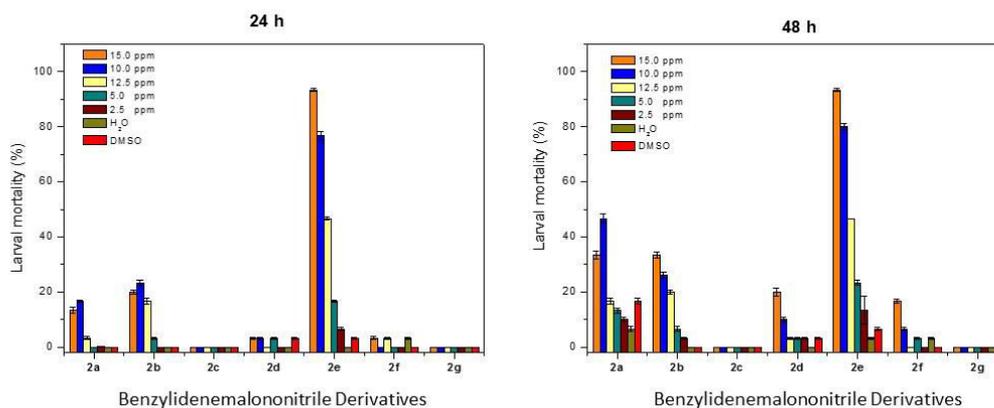


Figure 1. Larvicidal activity of benzylidenemalononitrile derivatives on *Aedes aegypti* larvae at 24 h and 48 h

Table 3. Larvicidal activity (LC₅₀ and LC₉₀) of 2-(4-chlorobenzylidene)malononitrile **2e** by *Aedes aegypti*

Adduct 2e	<i>Aedes aegypti</i>	
	24 h	48 h
LC ₅₀ [*]	9.42	9.44
C.L. ^{**}	7.32 – 11.44	7.34 – 11.47
LC ₉₀ [*]	15.02	15.05
C.L. ^{**}	12.70 - 20.14	12.72 - 20.19

*LC₅₀ and LC₉₀ in ppm. **C.L. = Confidence limit.

Figure 2 shows the profile of interaction between the compound **2e** and the amino acid residues of an AChE. The score was 48.9795 with five bonds at three different amino acids. These included HIS480, which is a hydrogen bond between the H16 atom of the adduct **2e** and O3458 of the HIS480 amino acid with a distance of 2.51 Å. Hydrophobic interactions were also observed

between the TYR370 amino acid with the aromatic ring and chlorine atom Cl11 with a distance of 4.06 Å this also interacted with aromatic ring (4.38 Å) of the ligand **2e**. There were two hydrophobic interactions between TRP83 and the aromatic ring of compound **2e** and with the pyrrolidine and the aromatic rings, and the distances were 3.75 Å and 4.65 Å, respectively.

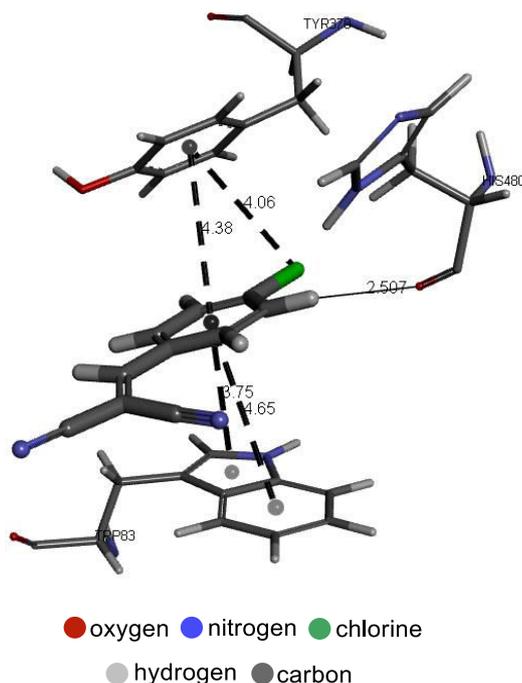


Figure 2. Simulation of molecular docking between the enzyme AChE (represented by the amino acids of the active site) and compound **2e**

4. Conclusion

In this study, new synthetic strategies using water and glycerol as the solvents for the preparation of benzylidenemalononitrile derivatives offered good yields in the room temperature. The larvicidal activity of these compounds were evaluated on *Aedes aegypti* larvae. The LC_{50} value was 9.42 at 24 h for adduct **2e**. These results suggested that compound **2e** can be obtained from an eco-friendly reaction in good yields and is a potential larvicidal molecule.

Acknowledgments

The authors thank the Foundation of the State of Amapá for financial support PAPESQ/UNIFAP EDITAL Nº 015/2015.

References

- ¹ Smith, L.; Kasai, S.; Scott, J. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2016**, *133*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ² Dubrulle, M.; Mousson, L.; Moutailler, S.; Vazeille, M.; Failloux. A Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: Saliva is infectious as soon as two days after oral infection. *Plos One* **2009**, *4*, 1. [CrossRef]
- ³ Nunes, M.; Faria, N.; de Vasconcelos, J.; Golding, N.; Kraemer, M.; de Oliveira, L.; Azevedo, R.; da Silva, D.; da Silva, E.; da Silva, S.; Carvalho, V.; Coelho, G.; Cruz, A.; Rodrigues, S.; Vianez, J.; Nunes, B.; Cardoso, J.; Tesh, R.; Hay, S.; Pybus, O.; Vasconcelos, P. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *Bmc Medicine* **2015**, *13*, 1. [CrossRef]
- ⁴ Lo Presti, A.; Cella, E.; Angeletti, S.; Ciccozzi. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of Chikungunya virus: An updating review. *Infection Genetics and Evolution* **2016**, *41*, 270. [CrossRef] [PubMed]

- ⁵ Hazin, A.; Poretti, A.; Cruz, D. C. S.; Tenorio, C.; Van, A.; Pena, L. J.; Brito, C.; Gil, L. H.; Miranda-Filho, D. B.; Marques, E. T.; Martelli, C. M.; Alves, J. G.; Huisman, T. A. Computed tomographic findings in microcephaly associated with Zika virus. *New England Journal of Medicine*, **2016**, *374*, 2193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶ Miranda-Filho, D. B.; Martelli, C. M. T.; Ximenes, R. A. A.; Araújo, T. V. B.; Rocha, M. A. W.; Ramos, R. C. F.; Dhalia, R.; França, R. F. O.; Júnior, E. T. A. M.; Rodrigues, L. C. Initial description of the presumed congenital Zika syndrome. *American Journal of Public Health* **2016**, *106*, 598. [[PubMed](#)]
- ⁷ Vontas, J.; Kioulos, E.; Pavlidi, N.; Morou, E.; Della Torre, A.; Ranson, H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2012**, *104*, 126. [[CrossRef](#)]
- ⁸ Kushwah, R.; Dykes, C.; Kapoor, N.; Adak, T.; Singh, O. Pyrethroid-resistance and presence of two knockdown resistance (kdr) mutations, F1534C and a novel mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. *Plos Neglected Tropical Diseases* **2015**, *9*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹ Lima, E.; Paiva, M.; de Araujo, A.; da Silva, E.; da Silva, U.; de Oliveira, L.; Santana, A.; Barbosa, C.; Neto, C.; Goulart, M.; Wilding, C.; Ayres, C.; Santos, M. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceara, Brazil. *Parasites & Vectors* **2011**, *4*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁰ Crampton, J.; Warren, A.; Lycett, G.; Hughes, M.; Comley, I.; Eggleston, P. Genetic manipulation of insect vectors as a strategy for the control of vector-borne disease. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **1994**, *88*, 3. [[PubMed](#)]
- ¹¹ Oliveira, A.; Duarte, J.; Amado, J.; Cruz, R.; Rocha, C.; Souto, R.; Ferreira, R.; Santos, K.; da Conceição, E.; de Oliveira, L.; Kelecom, A.; Fernandes, C.; Carvalho, J. Development of a Larvicidal nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel oil. *Plos One* **2016**, *11*, 1. [[CrossRef](#)]
- ¹² Oliveira, A.; Duarte, J.; Cruz, R.; Souto, R.; Ferreira, R.; Peniche, T.; da Conceição, E.; de Oliveira, L.; Faustino, S.; Florentino, A.; Carvalho, J.; Fernandes, C. *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) control. *Journal of Nanobiotechnology* **2017**, *15*, 1. [[CrossRef](#)]
- ¹³ Nkya, T. E.; Akhouayri, I.; Kisinza, W.; David, J. P. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **2013**, *43*, 407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁴ Arora, S.; Balotra, S.; Pandey, G.; Kumar, A. Binary combinations of organophosphorus and synthetic pyrethroids are more potent acetylcholinesterase inhibitors than organophosphorus and carbamate mixtures: An *in vitro* assessment. *Toxicology Letters* **2017**, *268*, 816. [[CrossRef](#)]
- ¹⁵ Shehab, W. S.; Ghoneim, A. A. Synthesis and biological activities of some fused pyran derivatives. *Arabian Journal of Chemistry* **2016**, *9*, 966. [[CrossRef](#)]
- ¹⁶ Wells, G.; Seaton, A.; Stevens, M. F. G. Structural studies on bioactive compounds. Oxidation of typhostin protein tyrosine kinase inhibitors with hypervalent iodine reagents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 1550. [[PubMed](#)]
- ¹⁷ Huang, J.; Zhou, J.; Song, S.; Song, H.; Chen, Z.; Yi, W. A new and efficient ZnCl₂-catalyzed synthesis and biological evaluation of novel 2-amino-3,5-dicyano-4-aryl-6-aryl-aminopyridines as potent antibacterial agents against *Helicobacter pylori* (HP). *Tetrahedron* **2015**, *71*, 8628. [[CrossRef](#)]
- ¹⁸ Bharathi, A.; Roopan, S.; Rahuman, A.; Rajakumar, G. *In Vitro* Larvicidal and antioxidant activity of dihydrophenanthroline-3-carbonitriles. *Biomedical Research International* **2014**, *2014*, 2. [[CrossRef](#)]
- ¹⁹ Wang, H.; Wang, C.; Yang, Y.; Zhao, M.; Wang, Y. H₃PW₁₂O₄₀/mpg-C₃N₄ as an efficient and reusable bifunctional catalyst in one-pot oxidation-Knoevenagel condensation tandem reaction. *Catalysis Science & Technology* **2017**, *7*, 405. [[Link](#)]
- ²⁰ Li, G.; Xiao, J.; Zhang, W. Efficient and reusable amine-functionalized polyacrylonitrile fiber catalysts for

- Knoevenagel condensation in water. *Green Chemistry* **2012**, *14*, 2234. [Link]
- ²¹ De Resende Filho, J. B. M.; Pires, G. P.; De Oliveira Ferreira, J. M. G.; Teotonio, E. E. S.; Vale, J. A. Knoevenagel condensation of aldehydes and ketones with malononitrile catalyzed by amine compounds-tethered Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles. *Catalysis Letters* **2017**, *147*, 167. [Link]
- ²² Jimenez, D. E. Q.; Ferreira, I. M.; Yoshioka, S. A.; Fonseca, L. P.; Porto, A. L. M. Silk fibroin functionalized with CuSO₄ on Knoevenagel condensation under microwave radiation. *Current Microwave Chemistry* **2017**, *4*, 1. [Link]
- ²³ Gallo, R.; Ferreira, I.; Casagrande, G.; Pizzuti, L.; Oliveira-Silva, D.; Raminelli, C. Efficient and eco-friendly synthesis of iodinated aromatic building blocks promoted by iodine and hydrogen peroxide in water: A mechanistic investigation by mass spectrometry. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53*, 5372. [CrossRef]
- ²⁴ Ferreira, I. M.; Casagrande, G. A.; Pizzuti, L.; Raminelli, C. Ultrasound-promoted rapid and efficient iodination of aromatic and heteroaromatic compounds in the presence of iodine and hydrogen peroxide in water. *Synthetic Communication* **2014**, *44*, 2094. [CrossRef]
- ²⁵ WHO, World Health Organization, *Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides; Communicable Disease Control, Prevention and Eradication, WHO Pesticide Evaluation Scheme*, Geneva, Switzerland **2005**. [Link]
- ²⁶ Erickson, J.; Jalaie, M.; Robertson, D.; Lewis, R.; Vieth, M. Lessons in molecular recognition: The effects of ligand and protein flexibility on molecular docking accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 45. [PubMed]
- ²⁷ Harel, M.; Kryger, G.; Rosenberry, T.; Mallender, W.; Lewis, T.; Fletcher, R.; Guss, J.; Silman, I.; Sussman, J. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Science* **2000**, *9*, 1063. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁸ Xu, D. Z.; Shi, S.; Wang, Y. Polystyrene-immobilized DABCO as a highly efficient and recyclable organocatalyst for the Knoevenagel condensation reaction. *RSC Advances* **2013**, *3*, 23075. [CrossRef]
- ²⁹ Sonawane, J. P.; Chaudhari, S. B.; Patil, S. S.; Sonawane, M. V. A facile and efficient green protocol for the Knoevenagel condensation in aqueous media. *International Journal of Chemical & Physical Sciences* **2015**, *4*, 60. [Link]
- ³⁰ da Silva, J. B. P.; Navarro, D. M. A. F.; da Silva, A. G.; Santos, G. K. N.; Dutra, K. A.; Moreira, D. R.; Ramos, M. N.; Espindola, J. W. P.; de Oliveira, A. D. T.; Brondani, D. J.; Leite, A. C. L.; Hernandez, M. Z.; Pereira, V. R. A.; da Rocha, L. F.; de Castro, M. C. A. B.; de Oliveira, B. C.; Lan, Q.; Merz, K. M. Thiosemicarbazones as *Aedes aegypti* larvicidal. *European Journal Medicinal Chemistry* **2015**, *100*, 162. [CrossRef] [PubMed]
- ³¹ Turpaev, K.; Ermolenko, M.; Cresteil, T.; Drapier, J. Benzylidenemalononitrile compounds as activators of cell resistance to oxidative stress and modulators of multiple signaling pathways. A structure-activity relationship study. *Biochemical Pharmacology* **2011**, *82*, 535. [CrossRef] [PubMed]
- ³² Swaringen, R.; Yeowell, D.; Wisowaty, J.; Elsayad, H.; Stewart, E.; Darnofall, M. Reaction of orthoformates with acidic methines. *Journal of Organic Chemistry* **1979**, *44*, 4825. [CrossRef]
- ³³ Sharghi, H.; Ebrahimpourmoghaddam, S.; Doroodmand, M. Iron-doped single walled carbon nanotubes as an efficient and reusable heterogeneous catalyst for the synthesis of organophosphorus compounds under solvent-free conditions. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 4708. [CrossRef]
- ³⁴ Reagan, A.D.; Stalin, A.; Paulraj, M.G.; Balakrishna, K.; Ignacimuthu, S.; Al-Dhabi, N.A. *In silico* molecular docking of niloticin with acetylcholinesterase 1 (AChE1) of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae): a promising molecular target. *Medicinal Chemistry Research* **2016**, *25*, 1411. [CrossRef]

³⁵ Gupta, S.; Mohan, C. G. Dual binding site models and sequential virtual screening. *Biomed Research International* **2014**, 2014, 1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANASTAS, P.T.; WARNER, J.C. **Green Chemistry: theory and Practice**. New York: Oxford University Press, 1998.
- BHATT, S.; GETHING, P.W.; BRADY, O.J.; MESSINA, J.P.; FARLOW, A.W.; MOYES, C.L. **The global distribution and burden of dengue**. *Nature*, 2013.
- COSTA, P.; FERREIRA, V.; ESTEVES, P.; VASCONCELLOS, M. **Ácidos e bases em química orgânica**. Porto Alegre, Bookman, 2005.
- CUNHA, S.; COSTA, O. B. dos S. da; SANTANA, L. L. B. de; LOPES, W. A. Acetanilida: Síntese verde sem solvente. **Química Nova**, v.38, n. 6, p. 874-876, 2015.
- CUNHA, S.; SANTANA, L.L.B. **Condensação de Knoevenagel de Aldeídos Aromáticos com o Ácido de Meldrum em Água: Uma aula experimental de química orgânica verde**. *Química Nova*, 2012.
- FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. **Green Chemistry, Sustainable Economy and Quality of Life**. *Revista Virtual Química*, 2013.
- GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L.M. G. E. **Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti***. *Revista virtual de Química*, Rio De Janeiro, 2013.
- GOMES, F. B. C. ***Aedes aegypti***. Estudo Técnico. 2016.
- ISOBE, K.; HOSHI, T.; SUZUKI, T.; HAGIWARA, H. **Molecular Diversity**, p.317, 2005.
- KNOEVENAGEL, E. Ueber eine darstellungsweise der glutarsaure. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v.27, p. 2345-2346, 1894.
- KWAK, G.; FUJIKI, M. Colored and luminous aliphatic polyester via one-pot intra and intermolecular Knoevenagel reactions. **Macromolecules**, v.37, p. 2021-2025, 2004.
- LARHED, M.; HALLBERD, A. Microwave-assisted high-speed chemistry: A new technique in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 6, n. 8, p. 406-416, 2001.
- LEFEVRE, A. M. C.; LEFEVRE, F.; SCANDAR, S. A. S.; YASUMARO, S.; SAMPAIO, S. M. P. *Rev. Bras. Epidemiol*, v.6, p.359, 2003.
- LENARDÃO, E.J.; FREITAG, R.A.; DABDOUB, M.J.; BATISTA, A.C.F.; SILVEIRA, C.C. **Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa**. *Química Nova*, 2003.
- MARQUES, M. V.; BISOL, T. B.; Sá, M. M. Reações multicomponentes de Biginelli e de Mannich nas aulas de Química Orgânica experimental. Uma abordagem didática de conceitos da Química Verde. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1696-1699, 2012.
- MARQUES, M.R.C.; SOUZA, S.P.L.; MATTOS, M.C.S. **Desenvolvimento Sustentável e**

pensamento complexo – Estudo de caso: O uso de argilas como catalisadores. Química Nova, 2012.

MARCH, J. Advanced organic chemistry: reactions, mechanism and structure. New Jersey: **Wiley-Interscience**, p. 2374, 1992.

MISHRA, S.; HAJRA, A. Copper-catalyzed oxidative annulation between 2-aminopyridine and arylidenemalonitrile leading to 4-oxo-pyridol [1, 2-a] pyrimidine-3-carbonitrile. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 41, p. 5651-5655, 2015.

NICOLAU, E. S.; ALVES, P. B.; NOGUEIRA, P. C L. **Atividade inseticida de óleo essenciais de Pelargonium graveolens L'Herit E Lippia alba (Mill) N. E. Brown sobre Spodoptera frugiperda (J.E. Smith)**. Química Nova, Piracicaba, 2013.

OPANASENKO, M. **Comparison of the catalytic activity of MOFs and zeolites in Knoevenagel condensation**. Catalysis Science e Technology, 2013.

PINTO, C. P.; SILVA, B. V.; **A Química Perto de Você: Experimentos de Química Orgânica**, Sociedade Brasileira de Química: São Paulo, 2012.

PITANGA, A.F. **A inserção das Questões Ambientais no Curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal de Sergipe**. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2015.

RAMESH, R.; LALITHA, A. Synthesis of pyran annulated heterocyclic scaffolds: A highly convenient protocol using dimethylamine. **Research on Chemical Intermediates**, v. 41, n. 10, p. 8009-8017, 2015.

SMITH, M. B.; MARCH, J. March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure. **New York: John Wiley**, 2001. 2374p.

TIETZE, L. F. U. Beifuss, in Comprehensive Organic Synthesis. Pergamon Press: **Oxford**, vol.2, p. 341-392 1991.

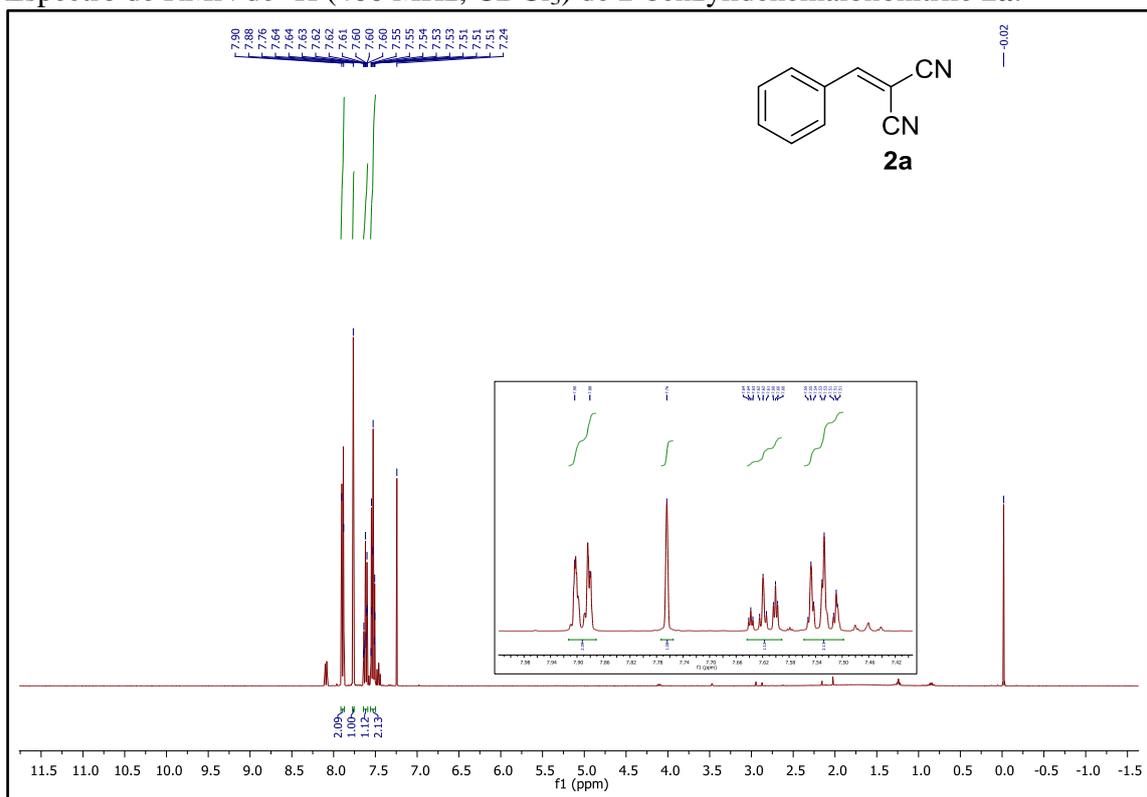
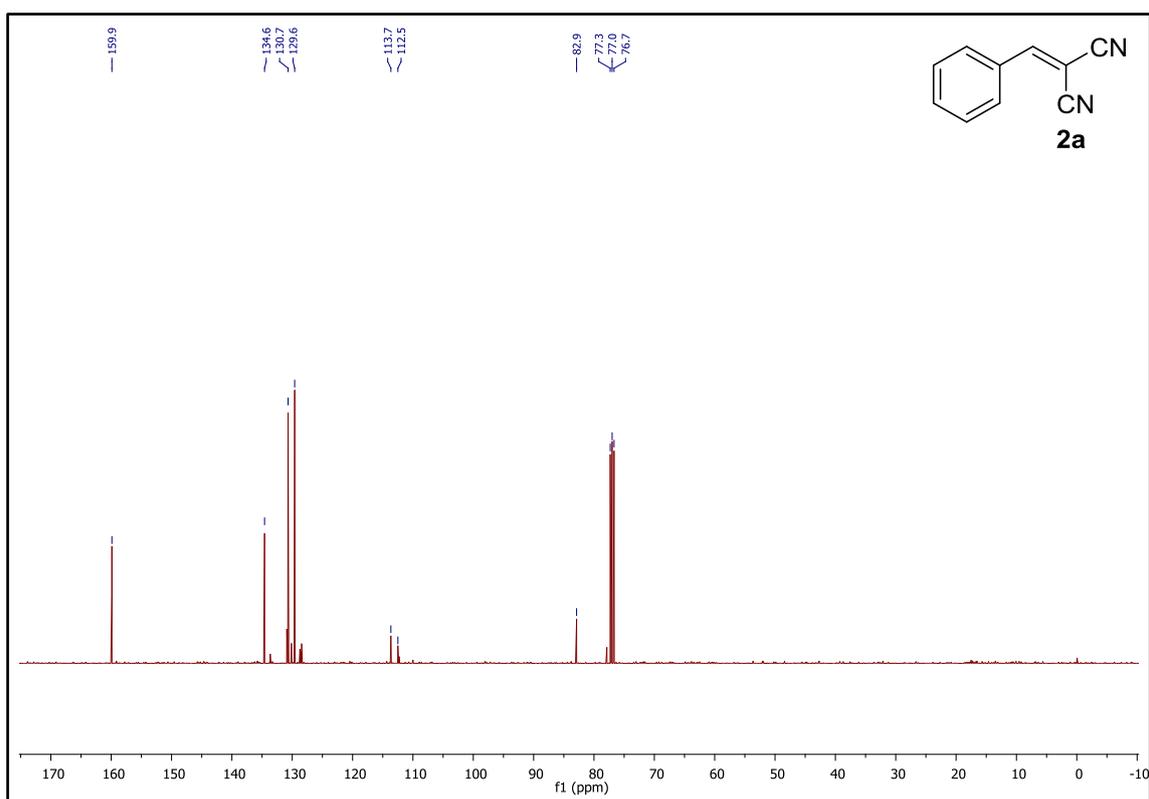
VILCHES, A; GIL P. D. **Papel de la Química y su enseñanza em la construcción de um futuro sostenible. Educación Química**. En línea, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. Fact sheet, 2009.

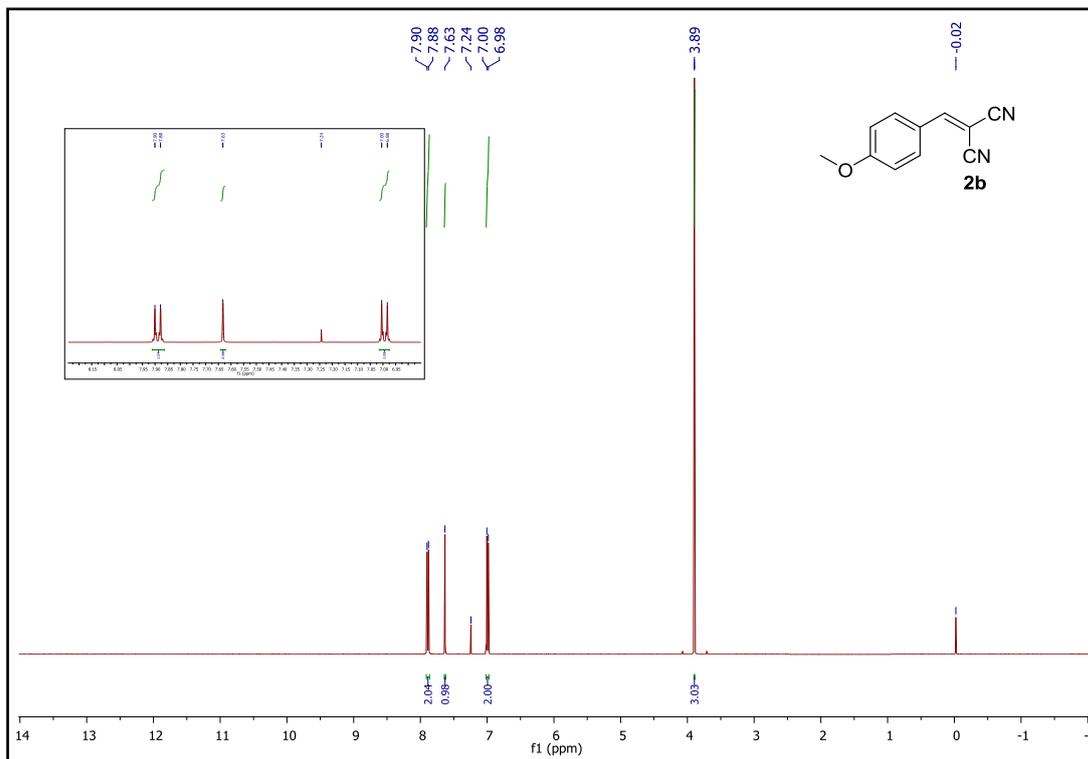
ZANIN, L. L.; JIMENEZ, D. E. Q.; PORTO, A. L. M.; FONSECA; L. P. Knoevenagel condensation reactions of cyano malonitrile e derivatives under microwave radiation. **Current Organic Chemistry**, v. p. 519-532, 2018.

ZANIN, L. L. **Síntese de adutos de Knoevenagel e H4- Cromenos por irradiação Microondas e Reações de Biotransformação**. Dissertação (Química Organica e Biologica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 16, 2018.

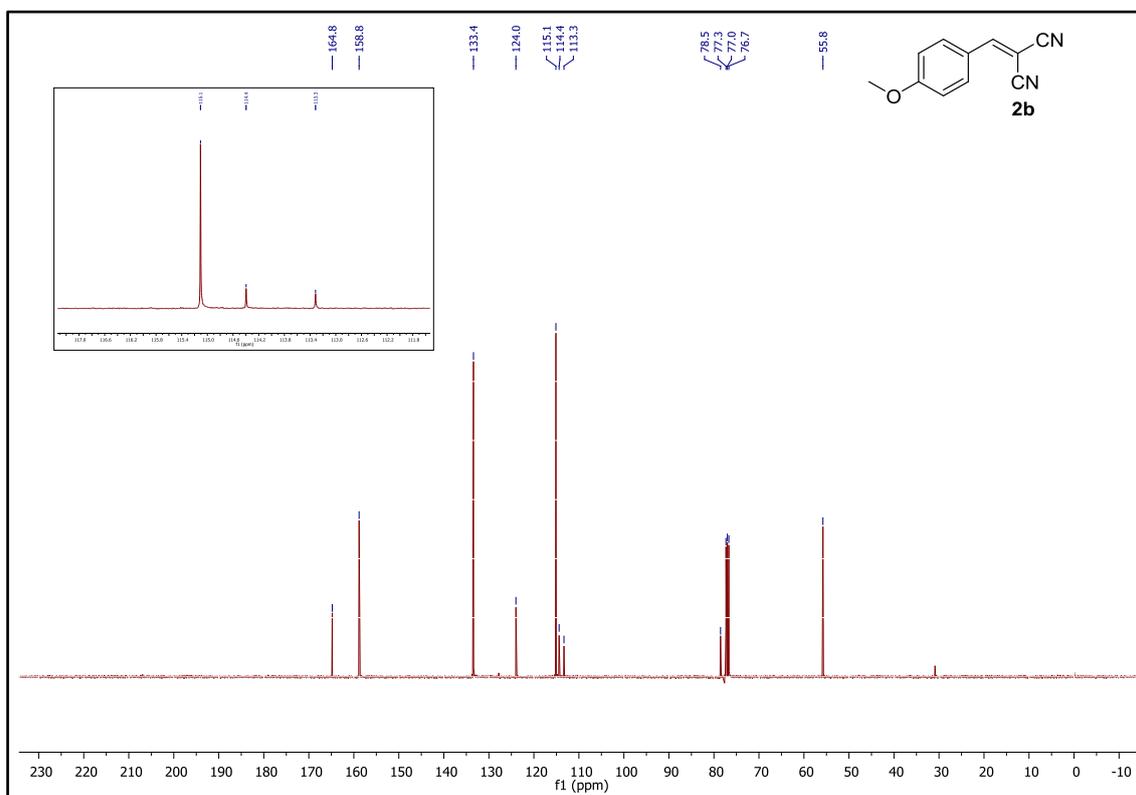
APÊNDICE

Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 2-benzylidenemalononitrile **2a**.Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de 2-benzylidenemalononitrile **2a**

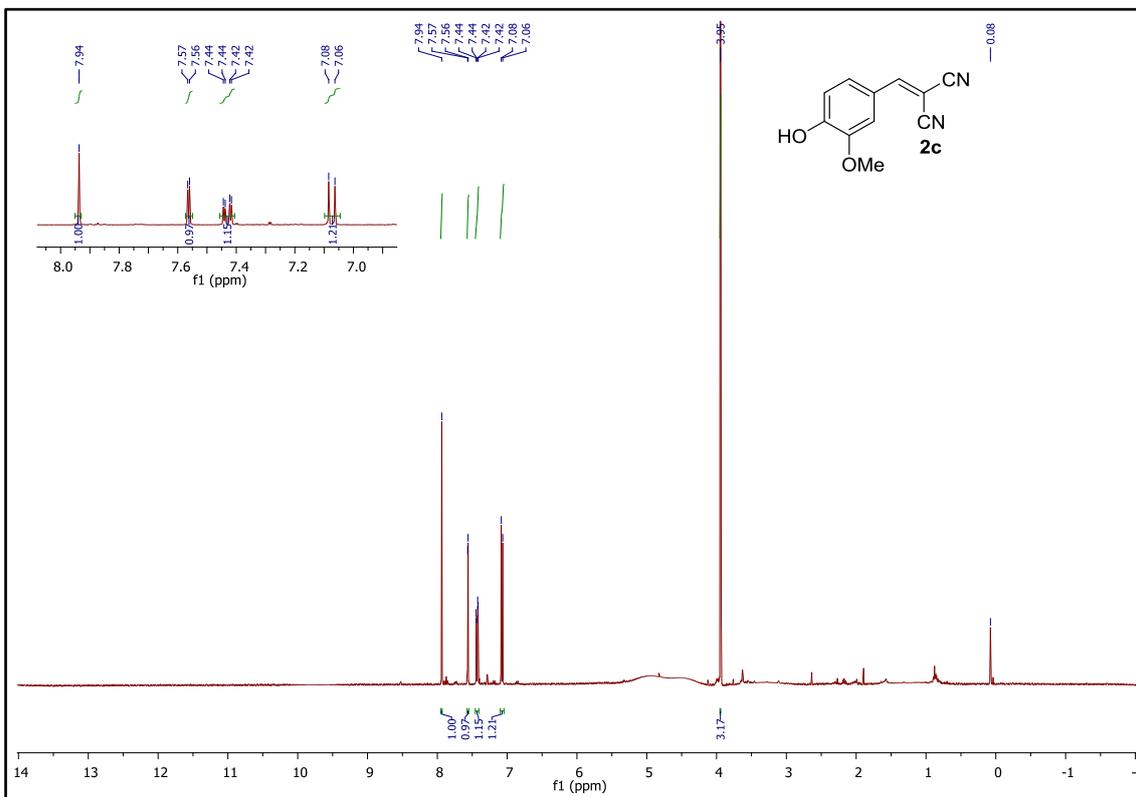
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 2-(4-methoxybenzylidene) malononitrile **2b**.



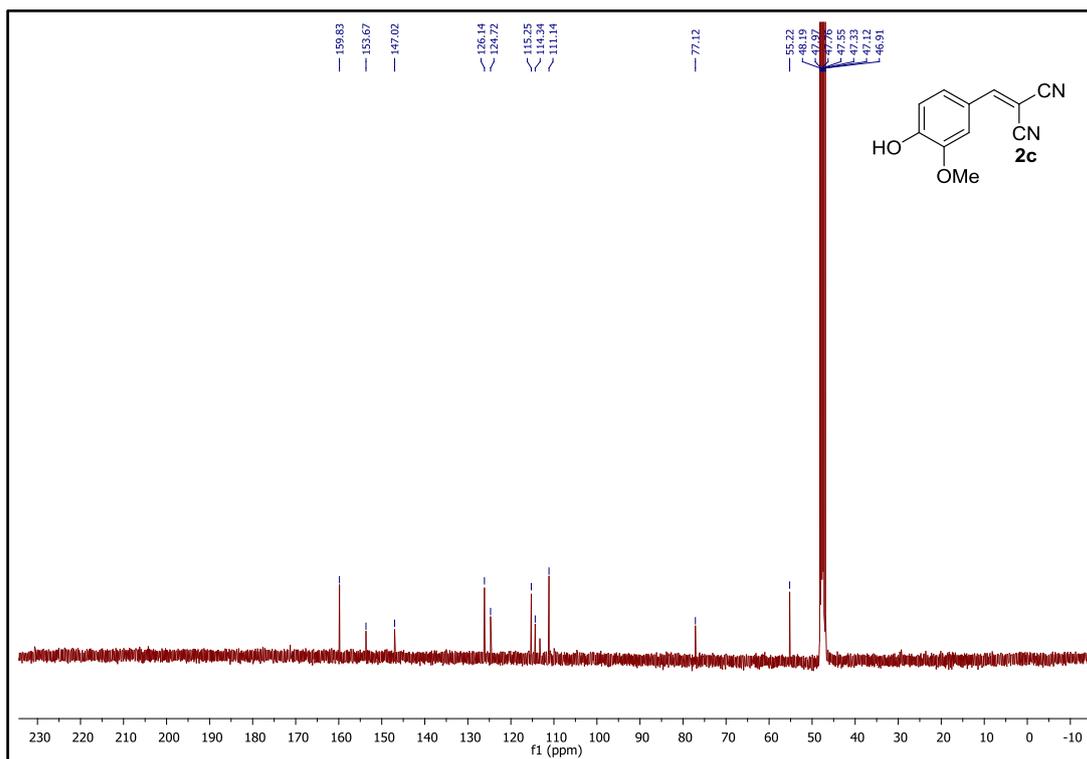
Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de 2-(4-methoxybenzylidene) malononitrile **2b**.

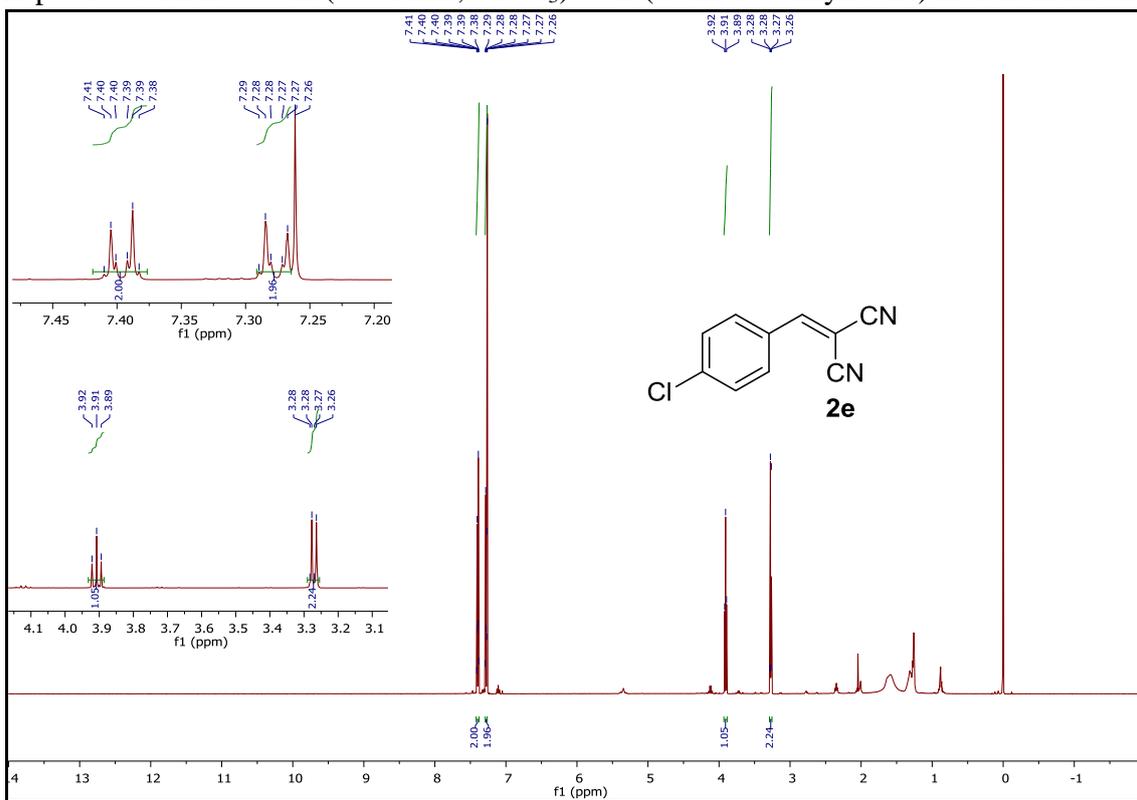
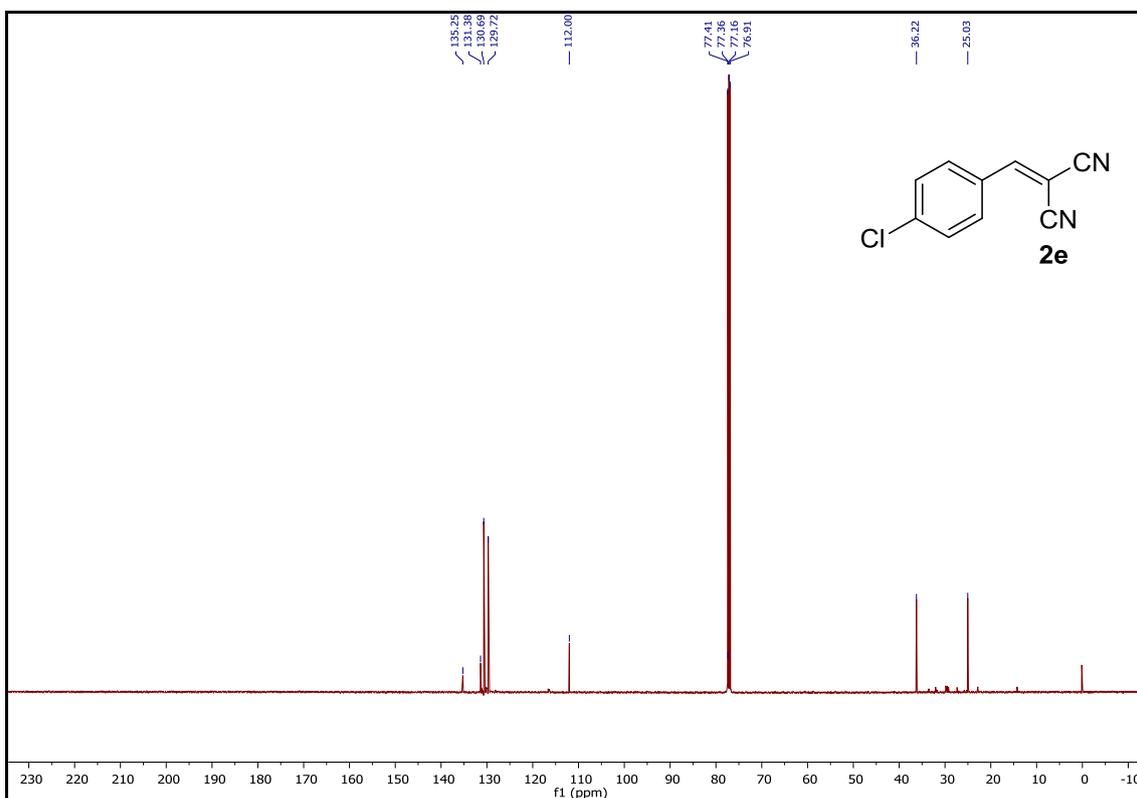


Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) de 2-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene) malononitrile **2c**.

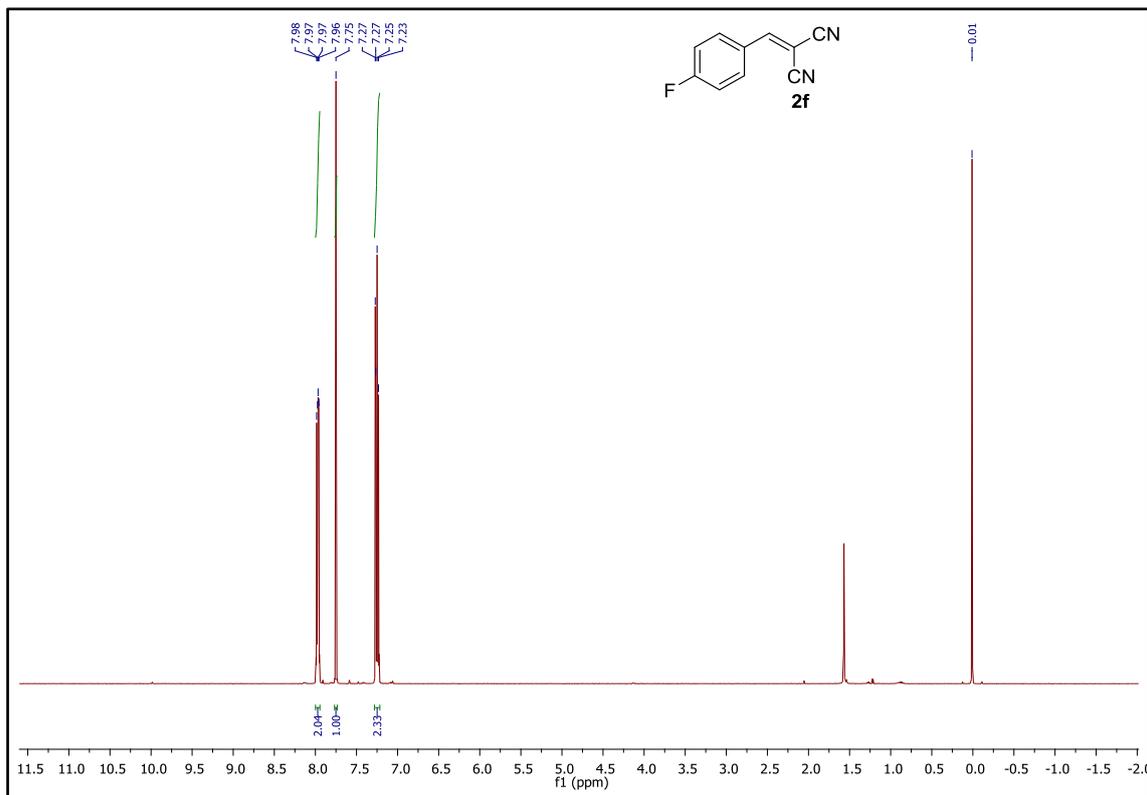


Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) de 2-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene) malononitrile **2c**.

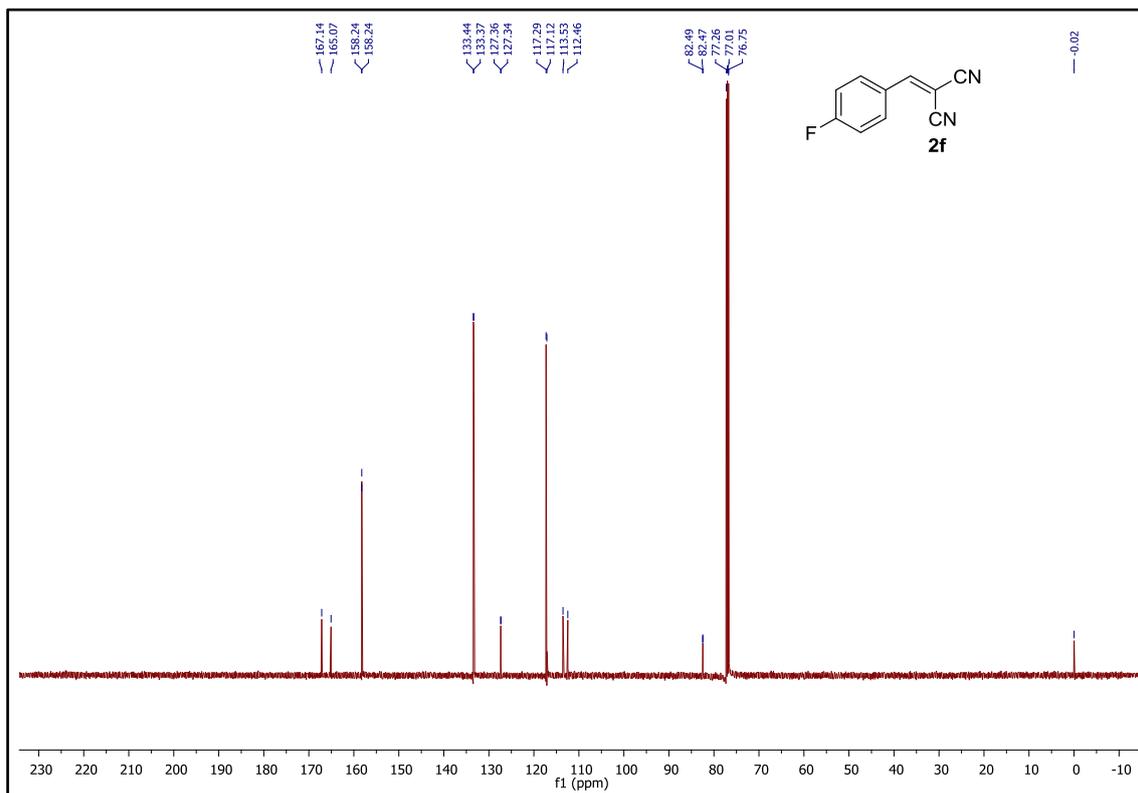


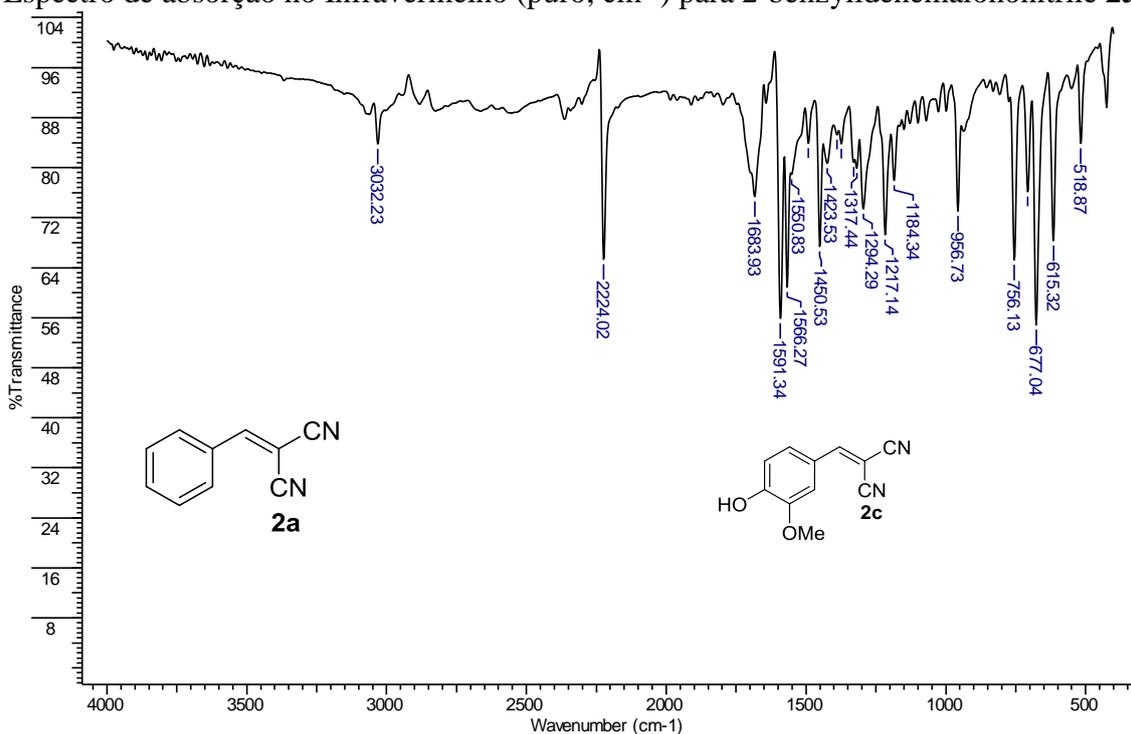
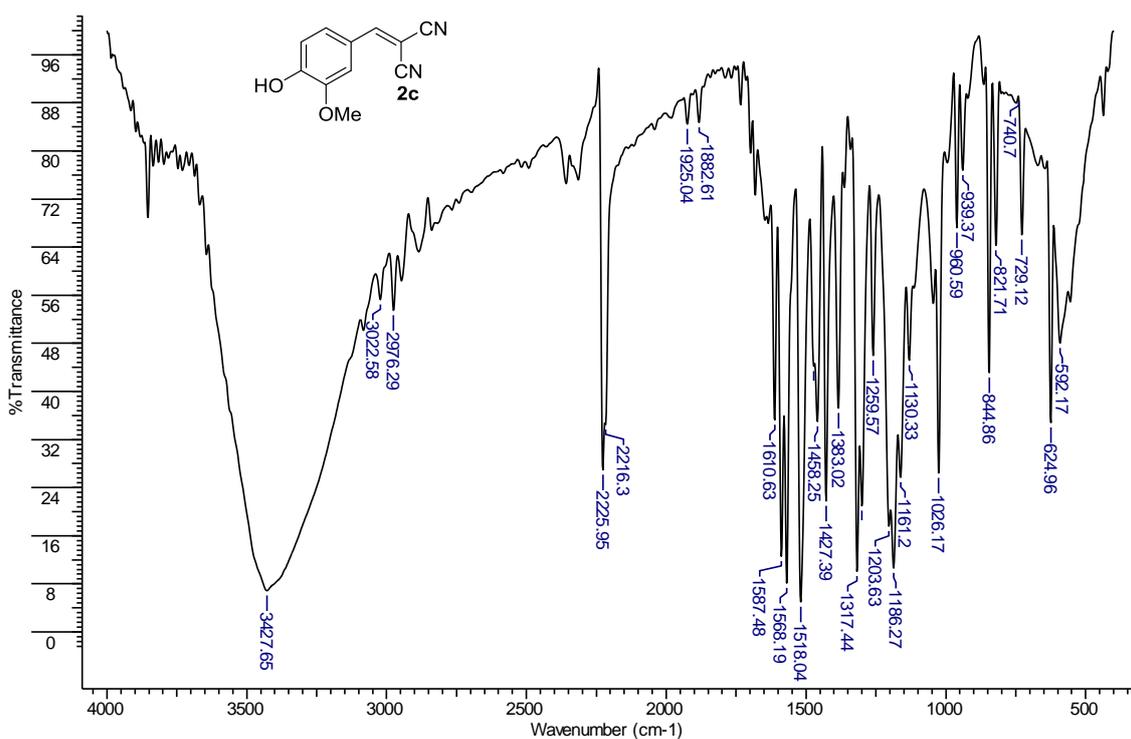
Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 2-(4-chlorobenzylidene) malononitrile **2e**.Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de 2-(4-chlorobenzylidene) malononitrile **2e**.

Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 2-(4-fluorobenzilidene) malononitrile **2f**.

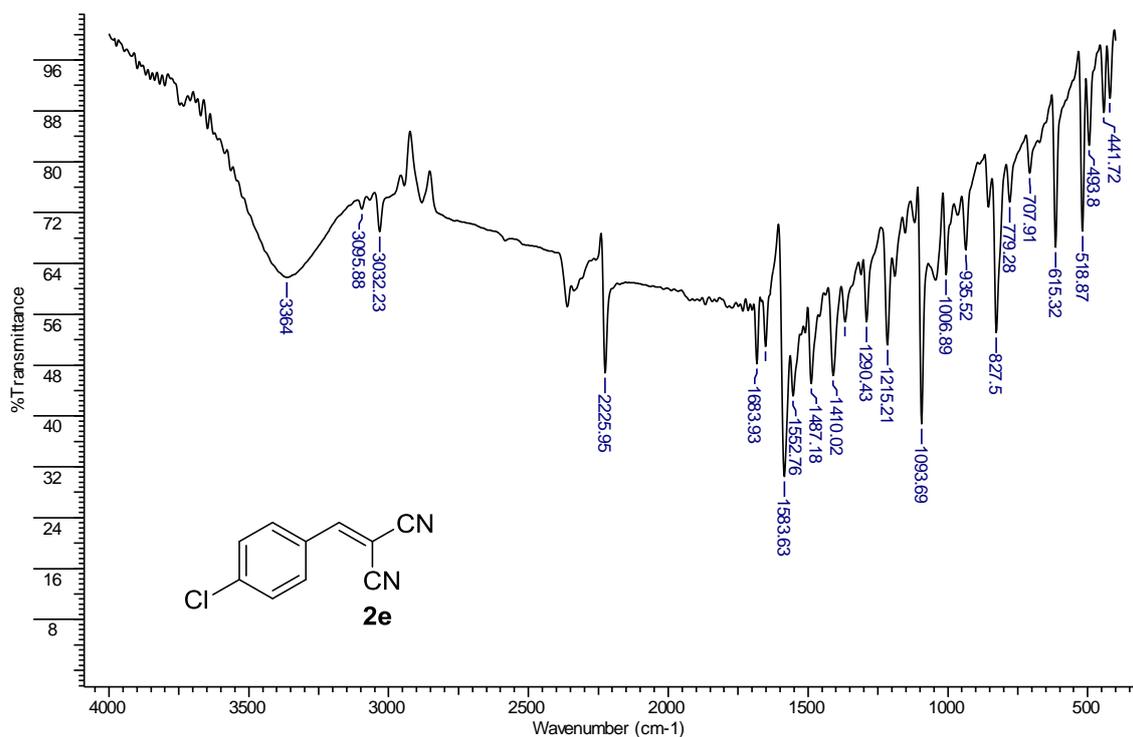


Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de 2-(4-fluorobenzilidene) malononitrile **2f**.

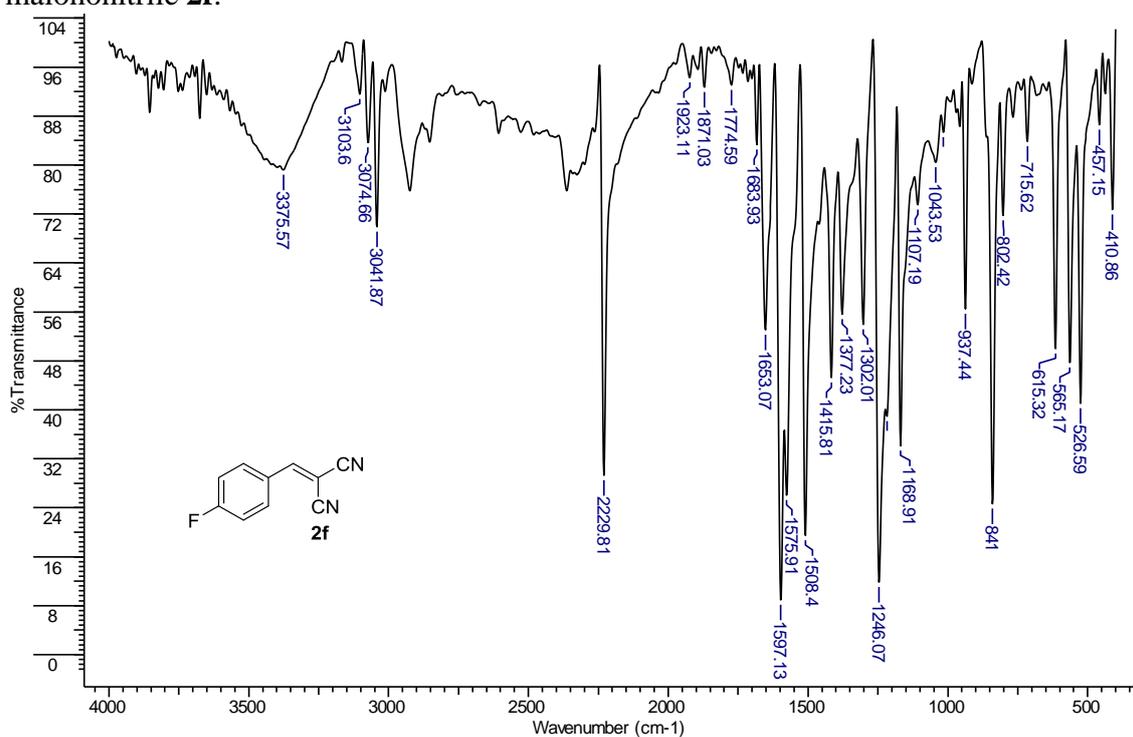


Espectro de absorção no Infravermelho (puro, cm^{-1}) para 2-benzylidenemalononitrile **2a**.Espectro de absorção no Infravermelho (puro, cm^{-1}) para 2-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene) malononitrile **2c**.

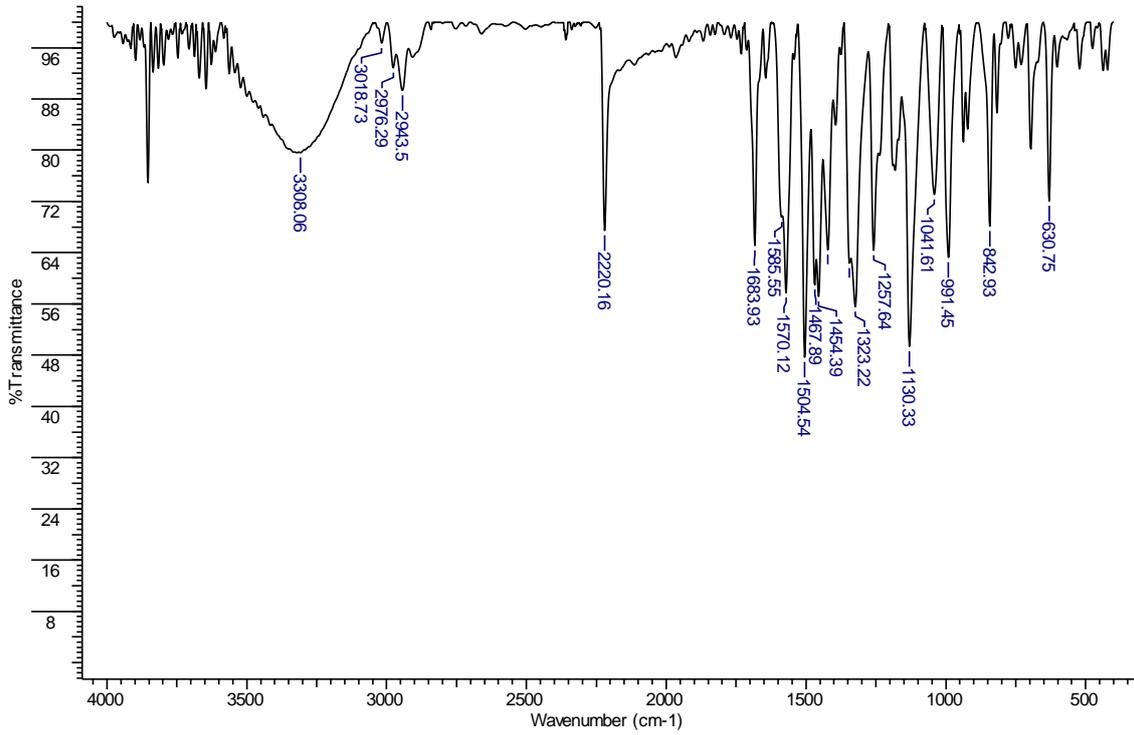
Espectro de absorção no Infravermelho (puro, cm^{-1}) para 2-(4-chlorobenzylidene) malononitrile **2e**.



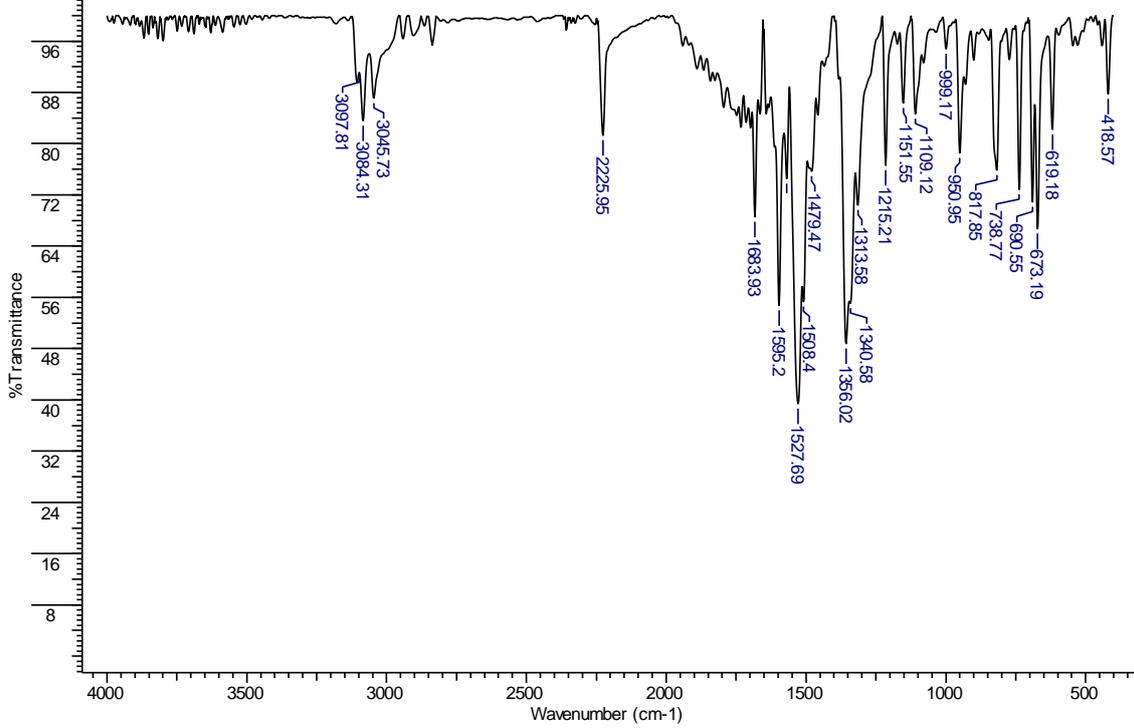
Espectro de absorção no Infravermelho (puro, cm^{-1}) para 2-(4-fluorobenzylidene) malononitrile **2f**.



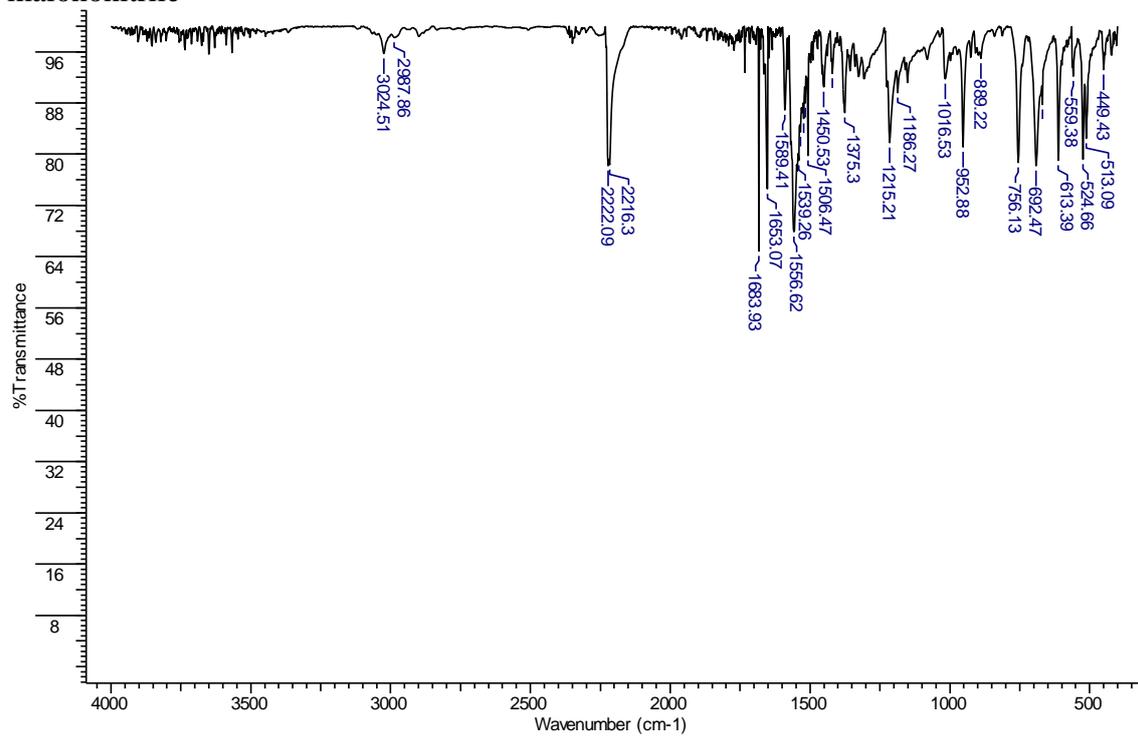
Espectro de absorção no Infravermelho (puro, cm^{-1}) para 2-(4trymethoxybenzylidene) malononitrile

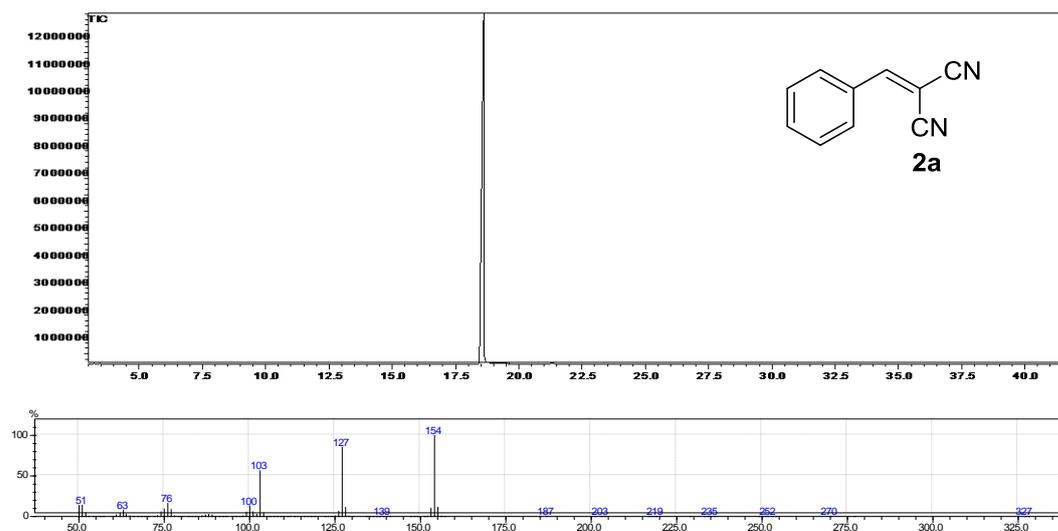
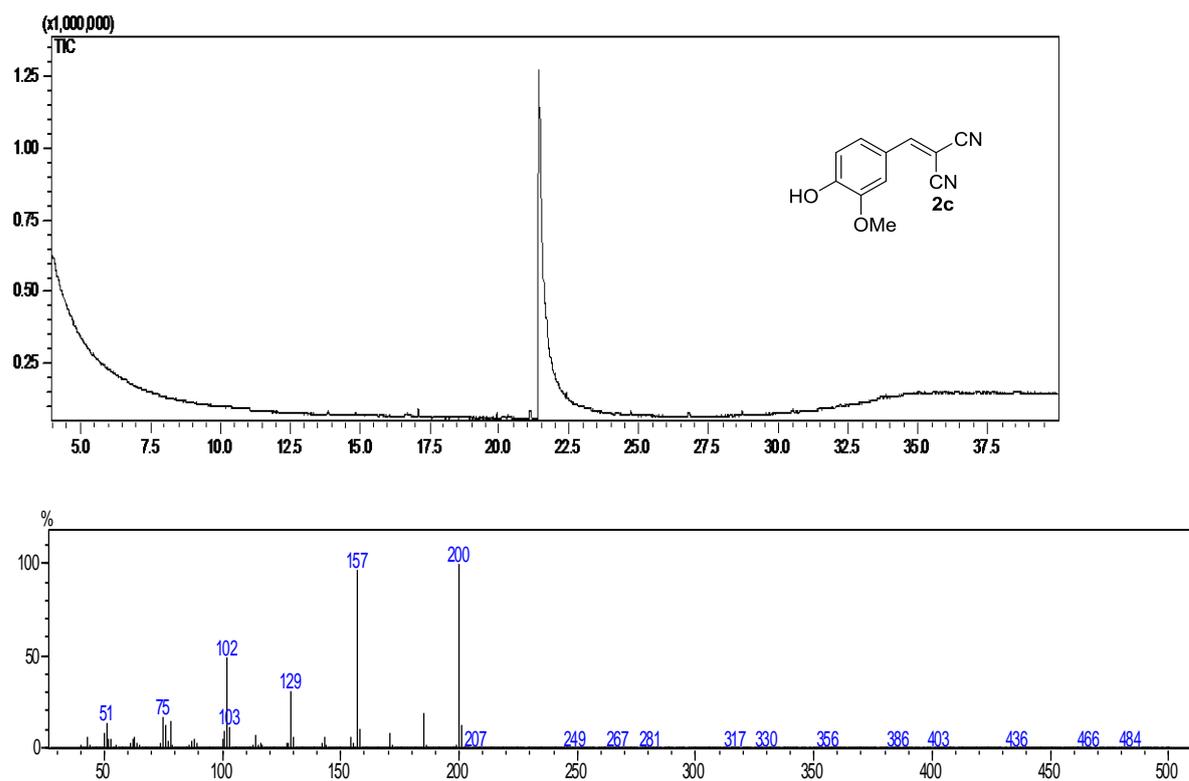


Espectro de absorção no Infravermelho (puro, cm^{-1}) para 2-(3-nitrobenzylidene) malononitrile

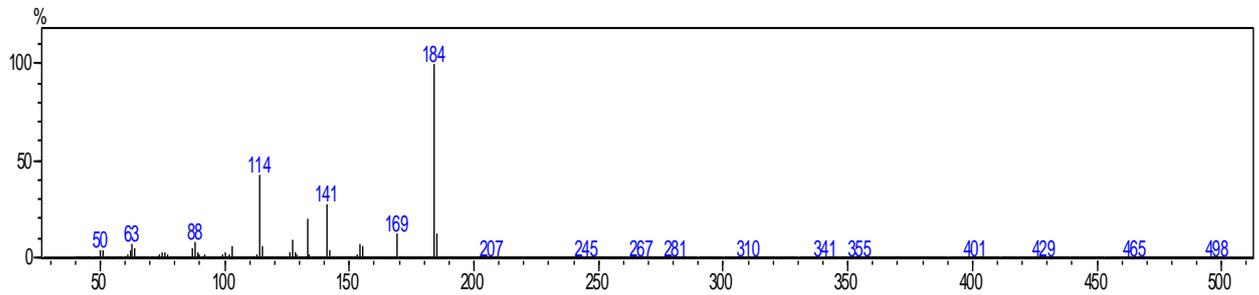
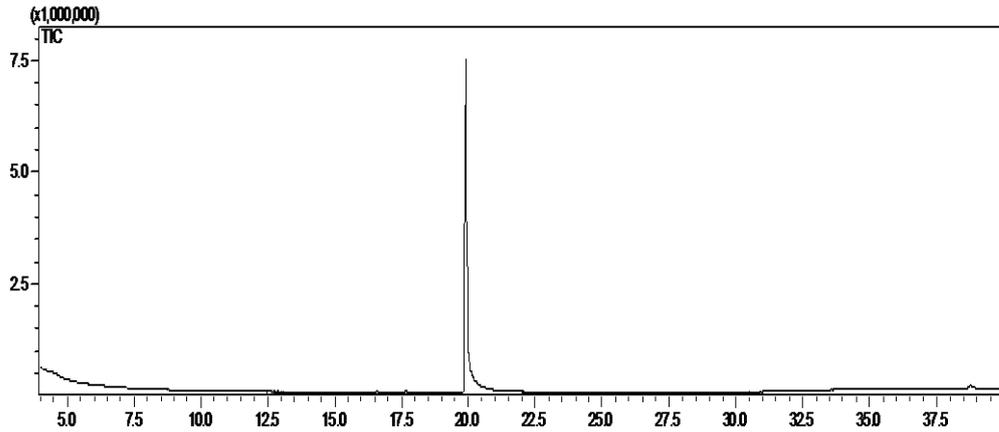


Espectro de absorção no Infravermelho (puro, cm^{-1}) para (E)-2-(2-methyl-3phenylallylidene) malononitrile

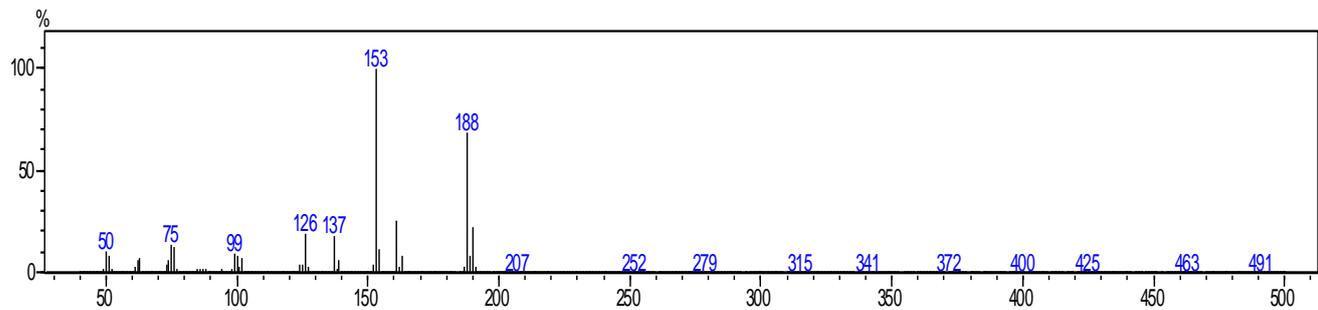
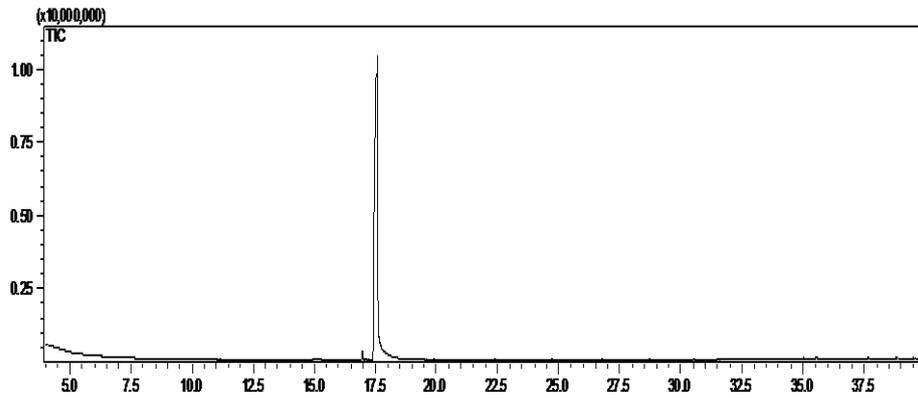


Espectro de massas (70 e V) 2-benzylidenemalononitrile **2a**.Espectro de massas (70 e V) 2-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene) malononitrile **2c**.

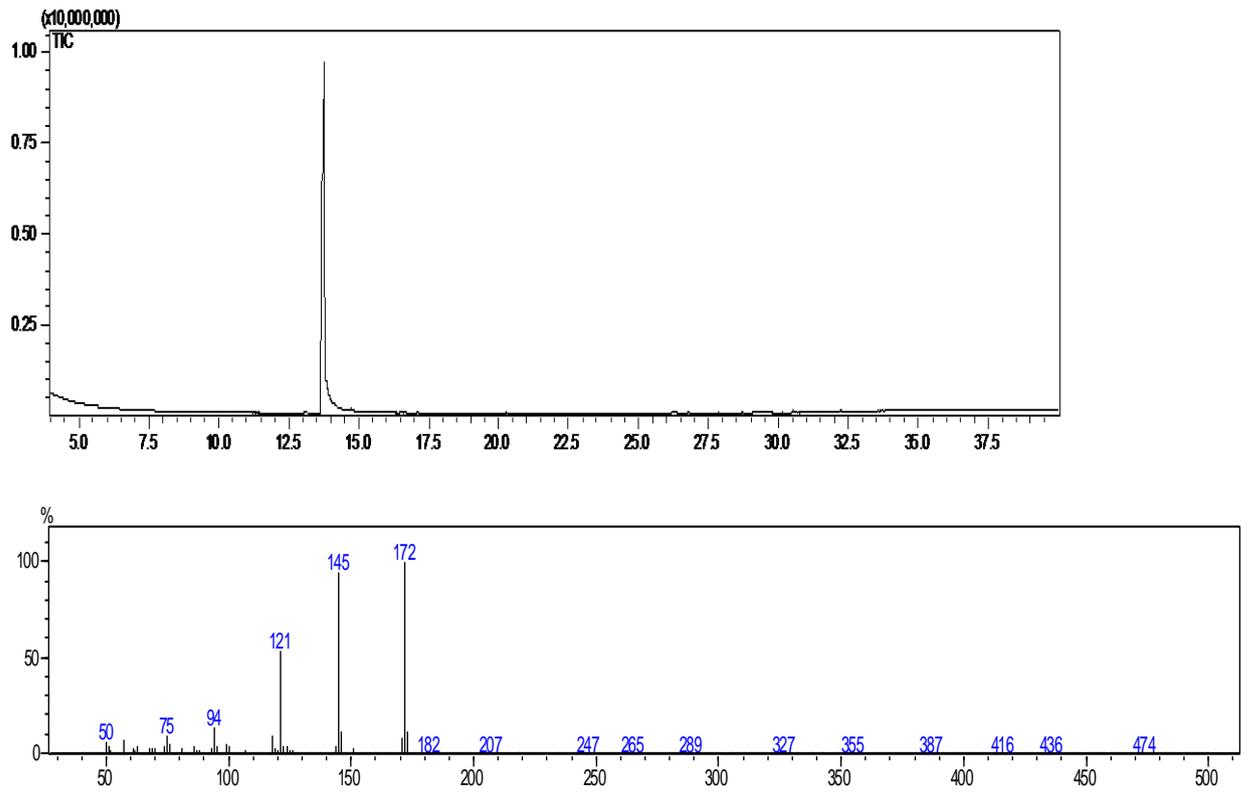
Espectro de massas (70 e V) 2-(4-methoxybenzylidene) malononitrile



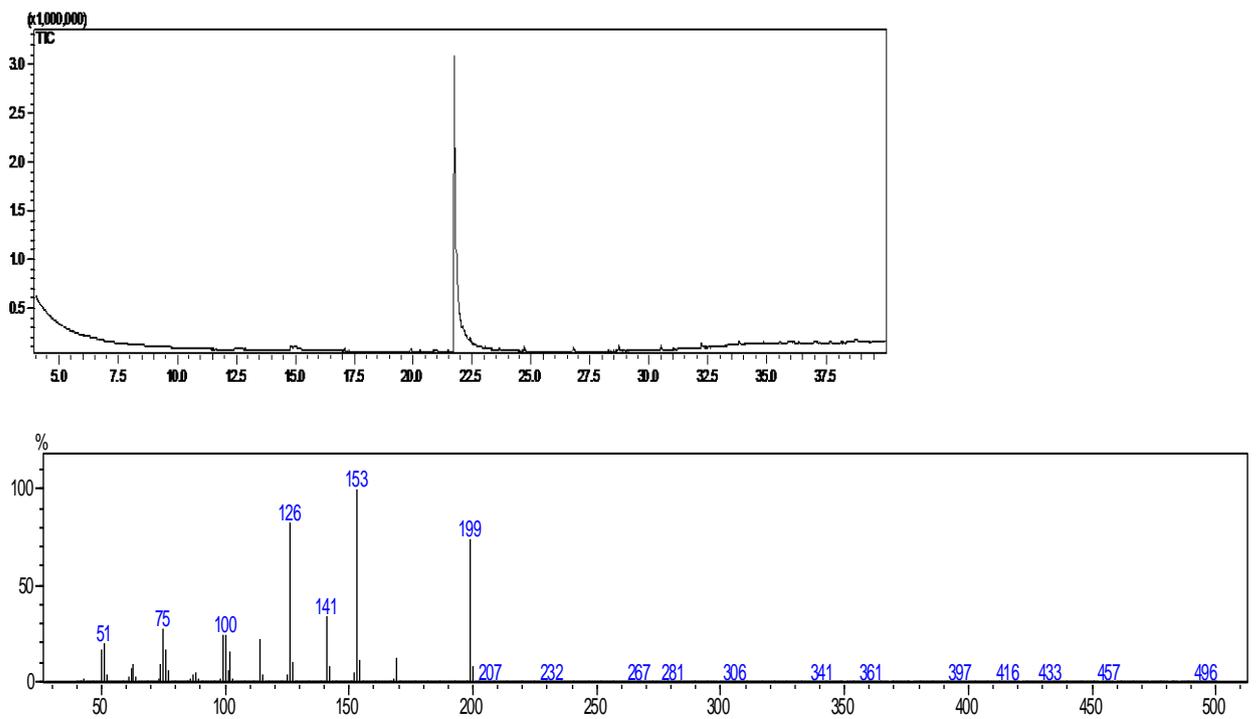
Espectro de massas (70 e V) 2-(4-chlorobenzylidene) malononitrile



Espectro de massas (70 e V) 2-(3-fluorobenzylidene) malononitrile



Espectro de massas (70 e V) 2-(3-nitrobenzylidene) malononitrile



Espectro de massas (70 e V) (E)-2-(2-methyl-3phenylallylidene) malononitrile

