

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
CAMPUS GOVERNADOR VALADARES  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA VIDA  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR  
DOUTORADO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**JENIFER CARVALHO GROSSI**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS  
CITOTÓXICO E LARVICIDA DE TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE  
CHALCONAS E SEUS COMPLEXOS METÁLICOS FRENTE A MOSQUITOS  
DO GÊNERO *Aedes***

**GOVERNADOR VALADARES - MG**

**2023**

**JENIFER CARVALHO GROSSI**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS  
CITOTÓXICO E LARVICIDA DE TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE  
CHALCONAS E SEUS COMPLEXOS METÁLICOS FRENTE A MOSQUITOS  
DO GÊNERO *Aedes***

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Jeferson Gomes da Silva

**GOVERNADOR VALADARES - MG**

**2023**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Carvalho Grossi, Jenifer.

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS CITOTÓXICO E LARVICIDA DE TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE CHALCONAS E SEUS COMPLEXOS METÁLICOS FRENTE A MOSQUITOS DO GÊNERO Aedes / Jenifer Carvalho Grossi. -- 2023.

100 p.

Orientador: Jeferson Gomes da Silva

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2023.

1. Tiossemicarbazonas. 2. Chalconas. 3. Atividade larvicida. I. Gomes da Silva, Jeferson, orient. II. Título.

Jenifer Carvalho Grossi

*Síntese, caracterização e avaliação dos potenciais citotóxico e larvicida de tiossemicarbazonas derivadas de chalconas e seus complexos metálicos frente a mosquitos do gênero Aedes*

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em 12 de setembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

**Dr. Jeferson Gomes da Silva** - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Dra. Luísa Helena Perin de Melo**  
Universidade Vale do Rio Doce - UNIVALE

**Dr. Rondinelle Gomes Pereira**  
Faculdade Anhanguera

**Dra. Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Dr. Antônio Frederico de Freitas Gomides**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 12/09/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Jeferson Gomes da Silva, Professor(a)**, em 12/09/2023, às 18:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rondinelle Gomes Pereira, Usuário Externo**, em 12/09/2023, às 18:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luísa Helena Perin de Melo, Usuário Externo**, em 12/09/2023, às 18:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Frederico de Freitas Gomides, Professor(a)**, em 12/09/2023, às 18:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes, Professor(a)**, em 12/09/2023, às 18:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1466160** e o código CRC **B17949FC**.

Dedico este trabalho à minha filha, aos meus pais e meu esposo por toda força e incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por me guiar, proteger, dar sabedoria, força e coragem para seguir em frente e não desistir dessa longa caminhada.

Ao meu orientador pelo exemplo de pessoa, paciência, conselhos, presença, otimismo, orientação, dedicação, por dividir seus conhecimentos e principalmente, pela amizade durante todo o processo. Serei eternamente grata por tudo!

Aos meus pais, Edner e Jaqueline, pelo amor, pela minha educação e por ter me ensinado os verdadeiros valores da vida. Obrigada pelo incentivo e motivação com os quais vocês impulsionam a minha vida. A vocês que muitas vezes renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, compartilho a alegria desse momento.

Ao meu marido, Jordani, pela compreensão, paciência e apoio.

A minha filha, Ana Júlia, por me dar o melhor e maior título da minha vida, ser sua mãe. Obrigada por compreender minha ausência e por me ensinar tanto sobre o amor.

A toda minha família, em especial minha irmã Mariana, por todo apoio e incentivo nessa caminhada.

A todos os meus amigos, vocês foram essenciais ao longo desses anos. Obrigada pelos conselhos, partilhas, incentivos, orações e por estarem presentes nos momentos de desespero.

A minha psicóloga, Amanda Leite, e seu programa MeditAtivaMente que me deram suporte para manter o equilíbrio mental.

A UFJF, ao Departamento de Ciências Básicas da Vida da UFJF-GV, e especialmente aos professores do laboratório de bioquímica pela compreensão e incentivo.

Aos colaboradores do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa.

A todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Mosquitos do gênero *Aedes* têm causado graves problemas de saúde pública por atuarem como vetor de várias arboviroses tais como dengue, chikungunya e zika. A estratégia mais eficiente no controle dessas doenças é o combate ao vetor. No entanto, o número limitado de agentes larvicidas e o surgimento de mosquitos resistentes podem comprometer esse combate. Isso tem motivado a busca por novas moléculas que podem atuar como larvicidas. Chalconas e tiossemicarbazonas são classes de compostos orgânicos que se destacam por suas atividades antimicrobiana e citotóxica. Essa última classe destaca-se ainda por sua capacidade quelante, permitindo a obtenção de complexos com as mais variadas atividades farmacológicas, e em muitos casos sendo os mesmos mais ativos que os ligantes livres. Neste trabalho foram preparadas oito tiossemicarbazonas derivadas de chalconas e seus respectivos complexos de cobre(II) e prata(I), sendo vários desses complexos inéditos. Os compostos foram caracterizados por análise elementar, medidas condutimétricas, espectros eletrônicos e de infravermelho e análises termogravimétricas. A citotoxicidade desses compostos foi avaliada pela viabilidade celular de linhagens de macrófagos murinos RAW 264.7 e J774 A.1 e *Aedes albopictus* C6/36 em concentrações variando de 0,01 a 100  $\mu\text{M}$ . Para as tiossemicarbazonas e os complexos de Cu(II) selecionados foram avaliadas a sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* a partir do estágio L4 até a fase adulta, a morfologia das células do intestino médio das larvas após o tratamento por 24 h e a marcação da caspase-3 por imunofluorescência. Os complexos de Cu(II) foram cerca de 10 vezes mais citotóxico que as tiossemicarbazonas livres contra todas as linhagens testadas. Já para a maioria dos complexos de Ag(I) sua citotoxicidade não foi superior as tiossemicarbazonas livres, mesmo o seu sal apresentando efeito citotóxico na maior concentração testada. Alguns dos compostos selecionados levaram a um aumento da mortalidade das larvas, sendo observados danos as células do intestino médio, contudo sem marcação positiva de caspase-3. Os resultados demonstram que a estratégia de complexar as tiossemicarbazonas ao cobre(II) levou a um aumento da atividade citotóxica e que alguns compostos apresentaram um promissor potencial larvicida contra mosquitos do gênero *Aedes*.

**Palavras-chave:** tiossemicarbazonas, chalconas, atividade larvicida.

## ABSTRACT

Mosquitoes of the *Aedes* genus have caused serious public health problems by acting as vectors for several arboviruses such as dengue, chikungunya and zika. The most efficient strategy to control these diseases is to combat the vector. However, the limited number of larvicidal agents and the emergence of resistant mosquitoes may compromise this fight. This has motivated the search for new molecules that can act as larvicides. Chalcones and thiosemicarbazones are classes of organic compounds that stand out for their antimicrobial and cytotoxic activities. This last class also stands out for its chelating capacity, allowing the production of complexes with the most varied pharmacological activities, and in many cases being more active than free ligands. In this work, eight thiosemicarbazones derived from chalcones and their respective copper(II) and silver(I) complexes were prepared, several of which were new. The compounds were characterized by elemental analysis, conductimetric measurements, electronic and infrared spectra and thermogravimetric analyses. The cytotoxicity of these compounds was evaluated by cell viability of murine macrophage lines RAW 264.7 and J774 A.1 and *Aedes albopictus* C6/36 at concentrations ranging from 0.01 to 100  $\mu\text{M}$ . For selected thiosemicarbazones and Cu(II) complexes, the survival of *Aedes aegypti* larvae from the L4 stage to adulthood, the morphology of larval midgut cells after treatment for 24 h and caspase-3 labeling by immunofluorescence were evaluated. The Cu(II) complexes were about 10 times more cytotoxic than free thiosemicarbazones against all strains tested. For the majority of Ag(I) complexes, their cytotoxicity was not greater than that of free thiosemicarbazones, even though their salt had a cytotoxic effect at the highest concentration tested. Some of the selected compounds led to an increase in larvae mortality with damage to midgut cells, however without positive caspase-3 labeling. The results demonstrate that the strategy of complexing thiosemicarbazones with copper(II) led to an increase in cytotoxic activity and that some compounds showed promising larvicidal potential against mosquitoes of the genus *Aedes*.

**Keywords:** thiosemicarbazones, chalcones, larvicidal activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Representação genérica para as ariltiossemicarbazonas (A) e fenoximetiltiossemicarbazonas (B) estudadas por Silva e col. (2015)  | 15 |
| Figura 2 – Estágios de desenvolvimento do <i>Aedes aegypti</i>  | 17 |
| Figura 3 – Representação esquemática do sistema digestivo da larva de <i>Aedes aegypti</i>  | 18 |
| Figura 4 – Dados entre 2011 e 2021 sobre as atividades biológicas dos complexos com tiossemicarbazonas bidentadas   | 23 |
| Figura 5 – Reação de formação de uma tiossemicarbazona  | 23 |
| Figura 6 – Representação estrutural de uma chalcona   | 24 |
| Figura 7 – Resumo dos principais experimentos realizados para a tiossemicarbazona 14. (A) Estrutura química de 14 e seu valor de dose letal a 50% dos indivíduos após tratamento por 48 h. (B) Gráfico da velocidade percorrida em pixel/s monitorada para os indivíduos expostos aos controles (água e DMSO) e 14 por 3, 5 e 24 horas. (C) Imagens das células do intestino médio das larvas coradas com eosina e hematoxilina após exposição ao controle água e 14 por 24 horas | 27 |
| Figura 8 – Fluxograma contendo as etapas realizadas neste trabalho  | 31 |
| Figura 9 – Representação genérica da reação aplicada na preparação das tiossemicarbazonas derivadas de chalconas  | 32 |
| Figura 10 – Representação genérica para as reações ocorridas durante a preparação dos complexos de Cu(II) e Ag(I) contendo as tiossemicarbazonas derivadas de chalcona  | 33 |
| Figura 11 – Representação química da provável estrutura das tiossemicarbazonas estudadas neste trabalho   | 41 |
| Figura 12 – Representação química da provável estrutura dos complexos de Cu(II) estudados neste trabalho  | 42 |
| Figura 13 – Representação química da provável estrutura dos complexos de Ag(II) estudados neste trabalho  | 43 |
| Figura 14 – Espectros eletrônicos de HL3, Cu3 e Ag3 em dimetilsulfóxido   | 48 |
| Figura 15 – Espectros na região do infravermelho de HL1, Cu1 e Ag1 (A) e HL2, Cu2 e Ag2 (B), em pastilhas KBr   | 50 |
| Figura 16 – Avaliação da viabilidade celular das tiossemicarbazonas HL1 a HL6 e seus complexos de Cu(II) e Ag(I) em macrófagos RAW 264.7 após 48 horas de cultura   | 53 |
| Figura 17 – Avaliação da viabilidade celular das tiossemicarbazonas HL7 e HL8, seus complexos de Cu(II) e Ag(I) e os sais CuCl <sub>2</sub> e AgNO <sub>3</sub> em macrófagos RAW 264.7 após 48 horas de cultura  | 54 |
| Figura 18 – Avaliação da viabilidade celular das tiossemicarbazonas HL1 a HL6 e seus complexos de Cu(II) e Ag(I) em macrófagos J774A.1 após 48 horas de cultura   | 55 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 19 – Avaliação da viabilidade celular das tiossemicarbazonas HL7 e HL8, seus complexos de Cu(II) e Ag(I) e os sais CuCl <sub>2</sub> e AgNO <sub>3</sub> em macrófagos J774A.1 após 48 horas de cultura   | 56 |
| Figura 20 – Avaliação da viabilidade celular das tiossemicarbazonas HL1 a HL8 e seus complexos de Cu(II) e Ag(I) em células de <i>Aedes albopictus</i> C6/36 após 48 horas de cultura  | 58 |
| Figura 21 – Avaliação da viabilidade celular dos sais CuCl <sub>2</sub> e AgNO <sub>3</sub> em células de <i>Aedes albopictus</i> C6/36 após 48 horas de cultura   | 59 |
| Figura 22 – Avaliação da sobrevivência de larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 24 h de exposição às tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II) na concentração de 10 µM  | 61 |
| Figura 23 – Sobrevivência das larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas e não expostas (controles água e DMSO) às tiossemicarbazonas HL1 e HL2 e seus complexos de Cu(II) (Cu1 e Cu2) na concentração de 10 µM   | 62 |
| Figura 24 – Sobrevivência das larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas às tiossemicarbazonas HL3 – HL8 e seus complexos de Cu(II) (Cu3 – Cu8) na concentração de 10 µM  | 63 |
| Figura 25 – Curva dos estágios de desenvolvimento de <i>Aedes aegypti</i> em função do tempo de exposição aos grupos controle (água de clorada e DMSO)   | 64 |
| Figura 26 – Avaliação da sobrevivência de larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 24 h de exposição às tiossemicarbazonas HL2 e HL5 e seus complexos de Cu(II) (Cu2 e Cu5) variando a concentração de 0,1 a 100 µM   | 66 |
| Figura 27 - Sobrevivência das larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas e não expostas (DMSO) às tiossemicarbazonas HL2 e HL5 e seus complexos de Cu(II) nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µM  | 67 |
| Figura 28 - Histologia do intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas e não expostas aos compostos selecionados por 24 h  | 69 |
| Figura 29 – Número de células positivas para caspase-3 marcadas após a exposição dos intestinos médios das larvas de <i>Aedes aegypti</i> aos grupos controle (água e DMSO 1% v/v) e compostos selecionados. Os dados são apresentados como média ± SE | 71 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Alguns mecanismos relacionados à citotoxicidade de tiossemicarbazonas e seus derivados  | 26 |
| Tabela 2 – Dados de cor, aspecto, rendimento médio da reação e temperatura de fusão para as tiossemicarbazonas HL1 – HL8 e seus respectivos complexos de Cu(II) (Cu1 – Cu8) e Ag(I) (Ag1 – Ag8)  | 44 |
| Tabela 3 – Dados de análise elementar (% C, % H e % N) para as tiossemicarbazonas HL1 – HL8 e seus respectivos complexos de Cu(II) (Cu1 – Cu8) e Ag(I) (Ag1 – Ag8)   | 45 |
| Tabela 4 – Dados de condutividade da solução, massa molar e condutividade molar calculada para as tiossemicarbazonas HL1 – HL8 e seus respectivos complexos de Cu(II) (Cu1-Cu8) e Ag(I) (Ag1-Ag8)  | 47 |
| Tabela 5 – Valores calculados de concentração dos compostos testados necessário para inibir a viabilidade em 50% das células (CI <sub>50</sub> ) de macrófagos murinos RAW 264.7 e J774A.1 e <i>Aedes albopictus</i> C6/36 após 48 horas de tratamento | 60 |
| Tabela 6 – Dados estatísticos da análise do estimador de Kaplan-Meier obtidos a partir das curvas de sobrevivência dos compostos testados após 24 horas de exposição das larvas de <i>Aedes aegypti</i> ao tratamento                                  | 65 |
| Tabela 7 – Dados estatísticos da análise do estimador de Kaplan-Meier obtidos a partir das curvas de sobrevivência dos compostos Cu2 e HL5 após 24 horas de exposição das larvas de <i>Aedes aegypti</i> ao tratamento                                 | 67 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                     |  |
|---------------------|--|
| <i>A. aegypti</i>   | <i>Aedes aegypti</i>   |
| <i>A albopictus</i> | <i>Aedes albopictus</i>  |
| AgNO <sub>3</sub>   | Nitrato de prata   |
| CuCl <sub>2</sub>   | Cloreto de cobre(II)   |
| DL <sub>50</sub>    | Dose letal em 50% dos indivíduos                                       |
| DMF                 | Dimetilformamida   |
| DMSO                | Dimetilsulfóxido   |
| DNA                 | Ácido desoxirribonucleico  |
| FIOCRUZ             | Fundação Oswaldo Cruz  |
| CI <sub>50</sub>    | Concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular       |
| IGR                 | <i>Insect Growth Regulator</i> - reguladores de crescimento de insetos |
| KBr                 | Brometo de potássio  |
| L1                  | Primeiro estágio larval  |
| L2                  | Segundo estágio larval   |
| L3                  | Terceiro estágio larval  |
| L4                  | Quarto estágio larval  |
| MTT                 | <i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>                              |
| OMS                 | Organização Mundial de Saúde   |
| SUS                 | Sistema Único de Saúde   |
| TG                  | Termogravimétrica  |
| WHO                 | <i>World Health Organization</i>                                       |

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>   | <b>13</b> |
| 1.1      | ASPECTOS GERAIS DA BIOLOGIA DO <i>Aedes</i>   | 16        |
| 1.2      | INFORMAÇÕES GERAIS DO <i>Aedes</i> E FORMAS DE CONTROLE   | 19        |
| 1.3      | AS TIOSSEMICARBAZONAS: PROPRIEDADES QUÍMICAS E FARMACOLÓGICAS   | 22        |
| 1.4      | MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NOVOS COMPOSTOS   | 27        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b>  | <b>30</b> |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL  | 30        |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS   | 30        |
| <b>3</b> | <b>METODOLOGIA</b>  | <b>31</b> |
| 3.1      | PREPARAÇÃO DOS COMPOSTOS  | 31        |
| 3.1.1    | <b>Preparação das tiossemicarbazonas</b>  | <b>32</b> |
| 3.1.2    | <b>Preparação dos complexos de Cu(II)</b>   | <b>33</b> |
| 3.1.3    | <b>Preparação dos complexos de Ag(I)</b>  | <b>34</b> |
| 3.2      | CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS  | 34        |
| 3.2.1    | <b>Ponto de fusão</b>   | <b>34</b> |
| 3.2.2    | <b>Análise elementar</b>  | <b>34</b> |
| 3.2.3    | <b>Medidas condutimétricas</b>  | <b>34</b> |
| 3.2.4    | <b>Espectros eletrônicos na região do ultravioleta visível</b>  | <b>35</b> |
| 3.2.5    | <b>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho</b>  | <b>35</b> |
| 3.2.6    | <b>Análises termogravimétricas</b>  | <b>35</b> |
| 3.3      | BIOENSAIOS  | 36        |
| 3.3.1    | <b>Avaliação da citotoxicidade celular por MTT</b>  | <b>36</b> |
| 3.3.1.1  | <i>Cultura celular</i>  | 36        |
| 3.3.1.2  | <i>Avaliação da viabilidade celular por MTT</i>   | 36        |
| 3.3.2    | <b>Análise da sobrevivência de larvas de <i>Aedes aegypti</i> do estágio L4 durante e após exposição por 24h aos compostos selecionados</b> | <b>37</b> |
| 3.3.2.1  | <i>Obtenção das larvas</i>  | 37        |
| 3.3.2.2  | <i>Ensaio de sobrevivência</i>  | 38        |
| 3.3.3    | <b>Histologia do intestino médio</b>  | <b>38</b> |
| 3.3.4    | <b>Imunofluorescência</b>   | <b>39</b> |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   | <b>41</b> |
| 4.1      | CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS  | 44        |
| 4.1.1    | <b>Propriedades físicas dos compostos</b>   | <b>44</b> |
| 4.1.2    | <b>Análise elementar</b>  | <b>45</b> |
| 4.1.3    | <b>Medidas condutimétricas</b>  | <b>46</b> |
| 4.1.4    | <b>Espectros eletrônicos na região do ultravioleta-visível</b>  | <b>47</b> |
| 4.1.5    | <b>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho</b>  | <b>49</b> |
| 4.1.6    | <b>Análises termogravimétricas</b>  | <b>51</b> |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.2   | BIOENSAIOS  | 52 |
| 4.2.1 | Avaliação da viabilidade celular por MTT  | 52 |
| 4.2.2 | Ensaio de sobrevivência   | 60 |
| 4.2.3 | Histologia do intestino médio das larvas de <i>A. aegypti</i>   | 68 |
| 4.2.4 | Análise da imunofluorescência para marcação de caspase-3 em células do intestino médio de larvas de <i>A. aegypti</i> | 70 |
| 5     | CONCLUSÃO   | 72 |
|       | REFERÊNCIAS   | 73 |
|       | APÊNDICE A  | 83 |
|       | APÊNDICE B  | 87 |
|       | APÊNDICE C  | 90 |
|       | APÊNDICE D  | 99 |

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por vetores têm sido responsáveis por mais de 700 mil mortes por ano em todo o mundo (WHO, 2020). Somente devido a dengue, estima-se que anualmente mais de 3,9 bilhões de pessoas em mais de 120 países corram o risco de contrair a doença e cerca de 40 000 pessoas morram por complicações dessa arbovirose (WHO, 2020).

Nos países tropicais, as condições climáticas favorecem a proliferação e desenvolvimento dos mosquitos do gênero *Aedes*. No Brasil, a principal espécie e também principal vetor de arboviroses é o *Aedes aegypti* (MENDONÇA, 2009). Outra espécie com potencial de transmissão de arboviroses é o *Aedes albopictus*. Ela apresenta uma ampla distribuição em regiões de clima temperado, bem como nos países tropicais, sendo de hábitos preferencialmente silvestres, se adaptando ao ambiente suburbanos com uma certa cobertura vegetal (LIMA-CAMARA et al., 2006). Essa espécie apresenta características morfológicas e proliferativas semelhantes ao *A. aegypti* (SILVA, 2019).

O *A. aegypti* é um sério problema de saúde pública no Brasil, sendo o mais conhecido transmissor dos vírus da dengue, febre amarela e desde 2014 passou a disseminar também os vírus da chikungunya e zika (SOUZA-NETO et al., 2019). De acordo com o Boletim Epidemiológico nº 1 (BRASIL, 2023), emitido pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, até o mês de dezembro de 2022, foram registrados no Brasil 1 450 270 casos prováveis de dengue (cerca de 679,9 casos por 100 mil habitantes); 174 517 casos prováveis de chikungunya (cerca de 81,8 casos por 100 mil habitantes) e ainda 9 204 casos prováveis de zika com cerca de 4,3 casos por 100 mil habitantes. O fato de não existirem vacinas para a prevenção da chikungunya e zika, atrelado à indisponibilidade de vacina contra a dengue na rede pública de saúde no Brasil, fazem com que o controle vetorial seja a principal estratégia para mitigar a transmissão dessas doenças no país.

Vários compostos químicos têm sido empregados como medida de controle de mosquitos, sendo os mais importantes aqueles pertencentes às classes dos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides (RANSON et al., 2010; ZARA et al., 2016). Essas substâncias são utilizadas em formulações para o combate dos insetos adultos (adulticidas), aplicadas na forma de aerossol (fumacê), ou em formulações larvicidas utilizadas no controle focal (BRASIL, 2009). O uso de larvicidas

tem se mostrado como melhor alternativa do que os adulticidas por serem mais efetivos e persistentes, uma vez que a sua ação se restringe ao local aplicado. Além dos larvicidas serem mais seguros para o ser humano e para o meio ambiente (WHO, 1996).

Contudo, o uso intensivo de inseticidas tem propiciado o desenvolvimento de resistência, a contaminação do meio ambiente e surtos de outras espécies (BRAGA, 2007; VALLE, 2007). O registro crescente de populações de *A. aegypti* resistentes aos inseticidas disponíveis no mercado têm motivado o desenvolvimento de novos compostos que sejam eficazes contra o vetor, menos tóxicos ao meio ambiente e que tenham mecanismos de ação diferentes dos já descritos.

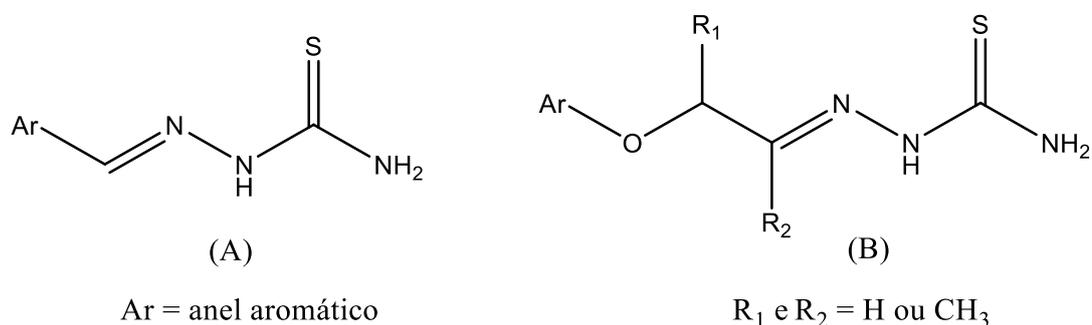
As tiossemicarbazonas são uma classe de moléculas sintéticas que têm atraído grande interesse da comunidade científica tanto por suas propriedades químicas quanto por seu vasto repertório de atividades biológicas (JAMAL et al., 2019; ACHARYA et al, 2020). Os efeitos biológicos podem ser justificados pela modulação do caráter lipofílico das moléculas, por meio de modificações estruturais em seu esqueleto e/ou substituintes ligados a essa cadeia, bem como a capacidade dessas moléculas ligar a íons metálicos (BERALDO; GAMBINO, 2004; PELOSI, 2010; ACHARYA et al, 2020). Dentre as atividades relacionadas para esses compostos, se destacam a antiviral (FERNANDES; SILVA; OLIVEIRA, 2020), antibacteriana (SOUZA et al., 2019; BISCEGLIE et al., 2020), antifúngica (HASSAN et al., 2020), antiprotozoária (CHELLAN et al., 2019; IBÁÑEZ-ESCRIBANO, 2022), citotóxica (PITUCHA et al., 2021; AHMED, ALMALKI, 2021) e inseticida (SILVA et al., 2015).

Apesar disso, a atividade larvicida das tiossemicarbazonas ainda é pouco investigada. Um importante estudo com essa abordagem foi conduzido por Silva e col. (2015) que avaliaram a atividade larvicida de ariltiossemicarbazonas e fenoximetiltiossemicarbazonas frente à larvas de *A. aegypti* (Figura1). Os autores reportaram que a proteína transportadora de esterol 2 de *A. aegypti* seria o alvo potencial desses compostos. Concluíram que a modificação química na porção proveniente do aldeído, o logaritmo do coeficiente de partição e o momento dipolar da molécula interferem na atividade larvicida. Contudo, não apresentaram dados sobre a extensão dos danos às larvas, nem exploraram o mecanismo de ação das moléculas.

Em um estudo realizado por Grossi (2018), foi avaliada a atividade larvicida de tiossemicarbazonas derivadas de benzaldeído, acetofenona e benzofenona frente à larvas de *A. aegypti*. As análises do comportamento de nado demonstraram que os

compostos diminuíram a atividade locomotora das mesmas e na morfologia das células do intestino médio das larvas foram observadas alterações do tecido. Por meio de ensaios de imunofluorescência, se constatou que a exposição de larvas a algumas tiossemicarbazonas impactou as células do intestino médio causando redução nas células regenerativas, sem haver, entretanto, a ativação de caspases, peroxidases e proteínas de cadeia leve 3 associada a microtúbulos, não evidenciando o mecanismo que levou às alterações celulares. Esses resultados atestaram o efeito citotóxico dos compostos, mas a degeneração celular não pôde ser associada aos processos de apoptose e autofagia. Dentre os compostos analisados, os melhores resultados foram obtidos com tiossemicarbazonas derivadas de benzofenona. Diante disso, surgiu a hipótese que a atividade larvívica pode estar associada aos efeitos citotóxicos comumente relacionados às tiossemicarbazonas.

Figura 1 – Representação genérica para as ariltiossemicarbazonas (A) e fenoximetiltiossemicarbazonas (B) estudadas por Silva e col. (2015)



Fonte: Adaptado de Silva e col., 2015.

Neste trabalho foram estudadas tiossemicarbazonas derivadas de chalconas, que semelhantemente às benzofenonas, apresentam uma extensão da cadeia lateral na porção proveniente da cetona, que poderiam resultar em compostos com potencial atividade larvívica, bem como seus complexos de Cu(II) e Ag(I), tendo em vista que complexos tendem a ser mais ativos que seus ligantes.

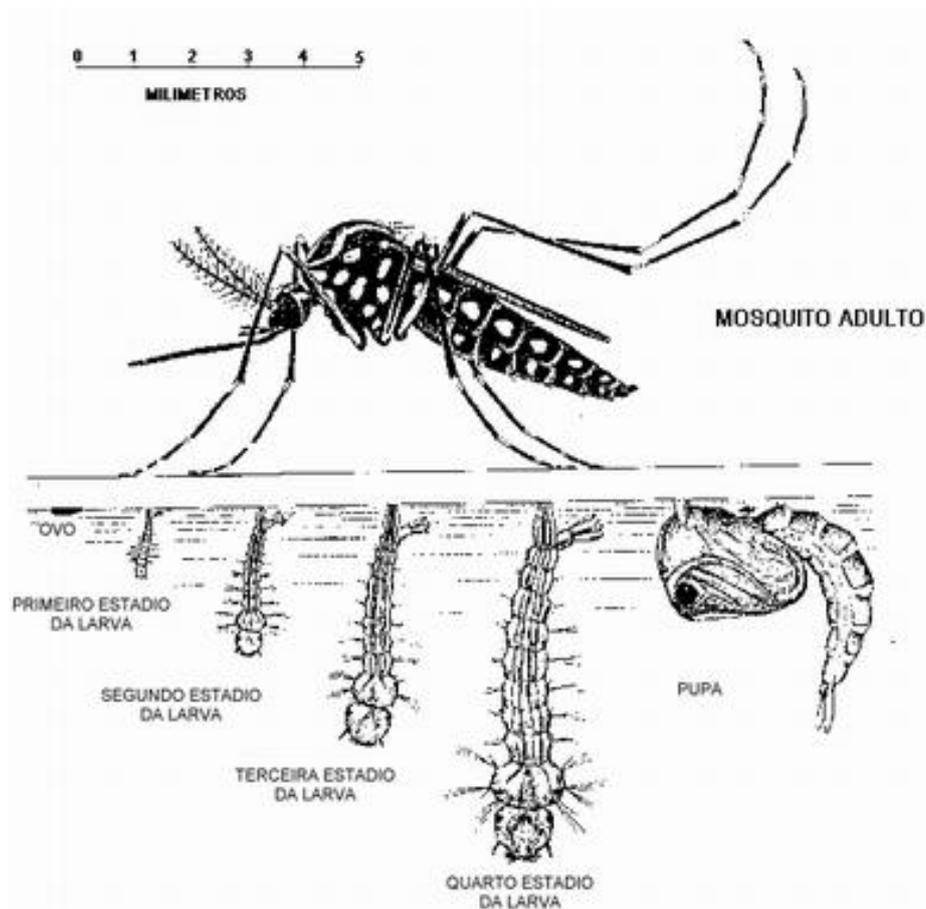
## 1.1 ASPECTOS GERAIS DA BIOLOGIA DO *Aedes*.

O desenvolvimento de novos compostos com ação biológica deve se fundamentar no conhecimento da Química e da Biologia, para permitir que seja atingido o efeito farmacodinâmico desejado e melhorar as características farmacocinéticas da formulação. Portanto, conhecer a biologia e a fisiologia das espécies de mosquitos do gênero *Aedes* é fundamental para auxiliar na identificação dos potenciais alvos e determinar os danos causados. Como os mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* são espécies que apresentam muitas características semelhantes, vamos apresentar as características do *A. aegypti* por ser o principal vetor das arboviroses no Brasil.

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é conhecido como mosquito da dengue, pertence ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, família Culicidae (subfamília Culicinae) e gênero *Aedes*. Anatomicamente, a espécie *A. aegypti* possui um padrão de cor característico, apresentando o corpo escuro com listras e manchas brancas no abdômen e pernas (REY, 2001). As fêmeas são antropofílicas, se alimentam de sangue humano, e por esta razão se adaptaram às áreas urbanas (PIOVEZAN et al., 2019). Esses insetos são holometabólicos, apresentam metamorfose completa, com o ciclo de vida compreendido em quatro estágios: ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto (Figura 2) (BRASIL, 2001; FOSTER & WALKER, 2019). Já foram desenvolvidos inseticidas capazes de interferir em cada uma das diferentes fases de desenvolvimento do *A. aegypti*. Entretanto, o surgimento de populações de mosquitos resistentes é uma realidade e constitui um alerta para a necessidade de novos compostos capazes de controlar a proliferação desses vetores.

O ciclo de vida do mosquito tem início quando as fêmeas depositam seus ovos individualmente nas paredes internas dos criadouros, próximos à lâmina de água (BRASIL, 2001). As fêmeas armazenam os espermatozoides em uma espermateca, e com isso a copulação ocorre apenas uma vez, realizando várias posturas com mais de 100 ovos por ciclo (ABREU et al., 2015; CARVALHO & MOREIRA, 2017). Após a postura, se houver condições favoráveis, o desenvolvimento do embrião ocorre em dois dias. Os ovos podem resistir à dessecação por mais de um ano (BRASIL, 2001; SERRA et al., 2018), representando um sério obstáculo à erradicação desses insetos, já que podem ser transportados a longas distâncias mesmo em recipientes secos e permanecerem viáveis por um longo período (BRASIL, 2001).

Figura 2 – Estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti*



Fonte: Adaptado de: <<https://baudeideiasdaivanise.blogspot.com/2008/03/cincias-dengue.html>>. Acesso em: 17 Jul. 2023.

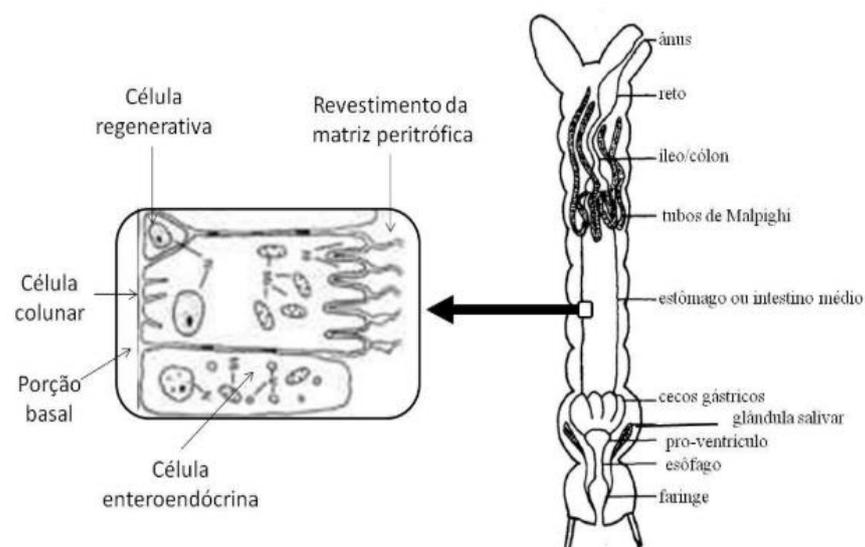
O ciclo de vida do mosquito tem início quando as fêmeas depositam seus ovos individualmente nas paredes internas dos criadouros, próximos à lâmina de água (BRASIL, 2001). As fêmeas armazenam os espermatozoides em uma espermateca, e com isso a copulação ocorre apenas uma vez, realizando várias posturas com mais de 100 ovos por ciclo (ABREU et al., 2015; CARVALHO & MOREIRA, 2017). Após a postura, se houver condições favoráveis, o desenvolvimento do embrião ocorre em dois dias. Os ovos podem resistir à dessecação por mais de um ano (BRASIL, 2001; SERRA et al., 2018), representando um sério obstáculo à erradicação desses insetos, já que podem ser transportados a longas distâncias mesmo em recipientes secos e permanecerem viáveis por um longo período (BRASIL, 2001).

A fase larvária é caracterizada por quatro estádios evolutivos (L1, L2, L3 e L4). Anatomicamente as larvas têm o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen, e

deslocam-se fazendo movimentos em forma de “S”. São bastante sensíveis a movimentos bruscos e apresentam fotofobia, ou seja, na presença de um feixe de luz se dirigem rapidamente para o fundo do recipiente buscando refúgio. Para respirar, vão até a superfície da água e assumem posição vertical. Por se tratar do período de crescimento, as larvas passam a maior parte do tempo alimentando-se da matéria orgânica acumulada nas laterais ou no fundo de recipientes (BRASIL, 2001).

As larvas se alimentam pela movimentação das escovas orais que fazem com que a água flua e traga partículas orgânicas para serem prontamente ingeridas ou então trituradas pelas mandíbulas antes da ingestão (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Esses materiais passam a preencher a região do lúmen e sofrem os efeitos das enzimas digestivas, sendo absorvidos no intestino médio (mesentério) que é o principal órgão desse sistema (Figura 3). O epitélio intestinal apresenta células cilíndricas altas com microvilosidades na porção apical e várias invaginações de membrana na região basolateral. Além das células digestivas são observados outros dois tipos celulares: as células regenerativas e as enteroendócrinas (BILLINGSLEY, 1990; DENECKE et al., 2018).

Figura 3 – Representação esquemática do sistema digestivo da larva de *Aedes aegypti*



Fonte: Adaptado de CONSOLI e OLIVEIRA, 1994.

A duração da fase larvária depende da disponibilidade de alimento, condições ambientais favoráveis e densidade de larvas, sendo a fase mais vulnerável do ciclo. O Ministério da Saúde recomenda que as ações para a erradicação do *A. aegypti* tenham como alvo preferencial a fase larvária, por representar o estágio de maior vulnerabilidade (BRASIL, 2001).

As larvas se tornam pupas após os quatro estádios larvais, em um período de aproximadamente cinco dias após a eclosão (NELSON, 1986). As pupas são anatomicamente divididas em cefalotórax e abdômen, o que confere a elas um formato semelhante a uma vírgula (BRASIL, 2001). Esta fase é caracterizada pela metamorfose que evidencia o início da fase adulta e por não se alimentarem. A fase dura cerca de três dias e neste período permanecem na superfície da água para facilitar sua emergência quando se tornarem insetos adultos (NELSON, 1986).

A fase adulta é aquela em que o *A. aegypti* é mais conhecido. Os mosquitos adultos vivem em torno de 30 a 35 dias (BRASIL, 2001). Machos e fêmeas se alimentam de néctar e seiva de plantas e as fêmeas requerem ainda sangue para o amadurecimento dos ovos (CARVALHO & MOREIRA, 2017; VALZANIA et al., 2019). O acasalamento ocorre logo nos primeiros dias da fase adulta e em seguida, as fêmeas fazem o repasto sanguíneo para a maturação dos seus ovos. Durante seu ciclo de vida, os ataques aos humanos ocorrem geralmente nas primeiras horas da manhã ou ao anoitecer (BRASIL, 2001). A picada é quase indolor, provavelmente devido à atividade da enzima adenosina desaminase que está presente na saliva destes insetos. A transmissão dos arbovírus para o homem ocorre durante o repasto sanguíneo realizado por fêmeas infectadas (RIBEIRO; CHARLAB; VALENZUELA, 2001).

## 1.2 INFORMAÇÕES GERAIS DO *Aedes* E FORMAS DE CONTROLE.

O *A. aegypti* têm origem africana e o *A. albopictus* tem origem asiática. Ambos apresentam distribuição cosmopolita, ou seja, podem ser encontradas em várias regiões do planeta. A migração humana parece ter contribuído com a distribuição do mosquito pelo mundo (POWELL; TABACHNICK, 2013).

Um dos fatores que contribuem para essa distribuição é a elevada resistência dos ovos à dessecação, podendo permanecer viáveis por até 492 dias na seca e

eclodirem após contato com a água (ZARA et al., 2016). Outro fator é sua adaptação ao ambiente urbano.

Dentre as características que explicam o sucesso adaptativo desse inseto em todas as regiões do Brasil e a sua elevada competência vetorial estão os hábitos do inseto e o clima do país. Além disso, condições como a falta de saneamento e o descarte irregular de lixo contribuem para a proliferação do mosquito e com o estabelecimento de epidemias (SANTOS et al., 2019). O fato de muitos agravos de saúde estarem relacionados ao *A. aegypti* tem estimulado discussões a respeito dos métodos de controle vetorial.

As estratégias recomendadas no controle de mosquitos do gênero *Aedes* pela Organização Mundial da Saúde (OMS) são a remoção de recipientes que acumulam água em edificações e áreas públicas, o uso de larvicidas e a aplicação espacial e residual de inseticidas (OPAS, 2019). Essas estratégias são adotadas no Brasil (BRASIL, 2002), e em casos de epidemias ainda se aplica o uso de formulações na forma de aerossol (fumacê) para o controle vetorial. Contudo, essa ação é pouco efetiva a longo prazo, já que é fortemente influenciada pelas correntes de ar e hábitos do inseto (BRASIL, 2009; PAHO, 2019). Isso torna o uso de larvicidas a estratégia mais viável de combate ao vetor a longo prazo. Os larvicidas químicos atualmente recomendados pela OMS e pelo Ministério da saúde são o temefós, o novaluron, o diflubenzuron e o piriproxifeno (BRASIL, 2001; BRASIL, 2009).

O organofosforado temefós é o larvicida de primeira escolha no combate de criadouros, aplicado inclusive nos reservatórios de água destinada ao consumo humano (CAMARGO, 1998). Seu alvo é a enzima acetilcolinesterase, cuja inibição provoca o bloqueio neuromuscular ocasionando em paralisia e morte (BRAGA; VALLE, 2007). Esse composto tem se mostrado eficaz para o controle do *A. aegypti*, contudo, já existem diversos registros de populações resistentes em todo o mundo (GAMBARRA et al., 2013; GRISALES et al., 2013).

Outra categoria de larvicidas são os reguladores do crescimento de insetos, conhecidos como IGRs (do inglês, *Insect Growth Regulator*). Sua ação envolve o retardo do desenvolvimento, resultando em aberrações morfogênicas e falhas gerais nos processos reprodutivos (MULLA, 1995). De acordo com o mecanismo de ação, os IGR são classificados como: análogos do hormônio juvenil, agonistas da ecdisona e inibidores da síntese de quitina, um polissacarídeo presente no exoesqueleto dos insetos (DHADIALLA et al., 1998). As benzoilfenilureias (novaluron e diflubenzuron)

são exemplos de inibidores da síntese de quitina muito utilizadas no controle focal do *A. aegypti* no Brasil. O piriproxifeno é um análogo do hormônio juvenil que interfere no sistema endócrino dos insetos, impedindo a emergência de adultos. Seu uso é recomendado pela OMS, inclusive em água potável (CHAVASSE; YAP, 1997; (HUSTEDT et al., 2020). De modo geral, os IGRs atuam de forma mais específica do que outros inseticidas, pois seu alvo são estruturas inexistentes nos vertebrados, sendo por isso menos tóxicos para mamíferos (GRAF, 1993).

Apesar da variedade de moléculas disponíveis, a resistência de populações de *A. aegypti* a diferentes inseticidas já são uma realidade em todo o mundo. Algumas causas da resistência estão relacionadas ao uso indiscriminado ou incorreto da dose, da diluição, inseto alvo errado, dentre outros. O uso indiscriminado dos inseticidas exerce pressão seletiva sobre os vetores e favorece a seleção de insetos resistentes (VARGAS et al., 2022).

Cabe salientar que a origem da resistência desses insetos é genética e ocorre devido a mutações nos genes nas proteínas-alvo dos inseticidas ou por alterações metabólicas (LI et al., 2007; LIU, 2015). Assim como as características típicas da espécie, as mutações genéticas que tornam os insetos resistentes aos inseticidas também podem ser herdadas pela prole. Como consequência, a frequência dos genes de resistência será maior nas gerações futuras, uma vez que os insetos com tais mutações apresentam maior chance de sobrevivência (BEATY; MARQUARDT, 1996).

Dentre os mecanismos de resistência metabólica já investigados estão a ativação de enzimas esterases (carboxilesterases) capazes de hidrolisar as moléculas dos inseticidas; as glutathione S-transferases que desintoxicam o organismo dos insetos; as monoxigenases, que intensificam o metabolismo oxidativo e as acetilcolinesterases, que em insetos resistentes apresentam baixa afinidade com os inseticidas (VARGAS, 2020).

Durante muito tempo, somente o temefós era utilizado no Brasil. O composto era adicionado na água potável para o controle das larvas de *A. aegypti*, de acordo com as recomendações da OMS (WHO,1997). Mas em 1990 foram relatadas as primeiras alterações no *status* de suscetibilidade dos insetos ao inseticida (MACORIS et al., 1999). Em razão disso, em 1999 o Ministério da Saúde criou a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência do *A. aegypti* aos Inseticidas (MoReNAa) que tinha por objetivo monitorar a resistência dos insetos vetores aos principais inseticidas no país (VALLE; BELINATO; MARTINS, 2015; BRAGA; VALLE, 2007).

O Ministério da Saúde realiza o monitoramento periódico da suscetibilidade de populações de *A. aegypti* tratadas com os inseticidas recomendados pelo Programa de Controle da Dengue. Quando a resistência é constatada, é feita a indicação de troca do princípio ativo nos municípios avaliados. Diante da necessidade crescente de novos compostos que sejam eficazes para o combate do *A. aegypti* seria interessante explorar a atividade larvicida de outros compostos. Nesse sentido, as tiossemicarbazonas podem ser uma opção importante, uma vez que o potencial citotóxico dessas moléculas já foi demonstrado em vários estudos na literatura (BERALDO; GAMBINO, 2004; COSTA, 2021; PITUCHA et al., 2021).

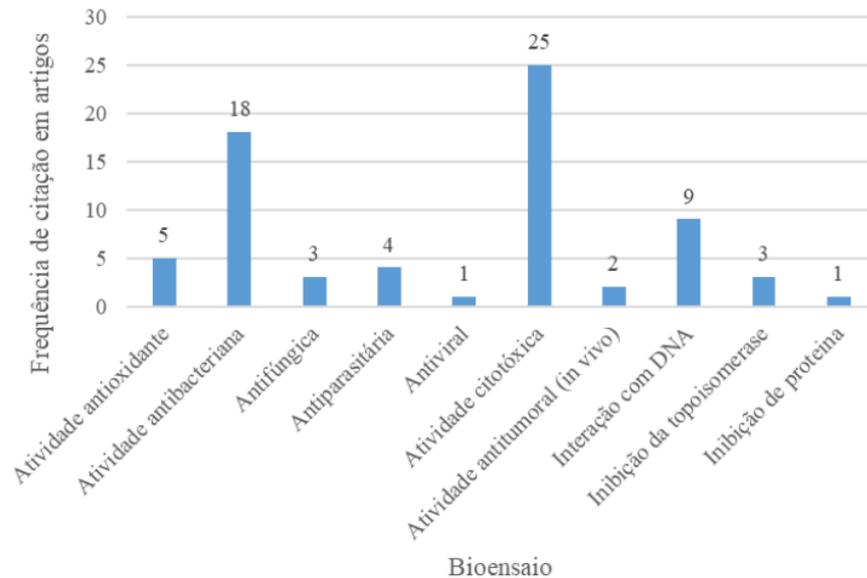
### 1.3 AS TIOSSEMICARBAZONAS: PROPRIEDADES QUÍMICAS E FARMACOLÓGICAS

As tiossemicarbazonas têm atraído interesse de muitos pesquisadores por constituírem uma classe de compostos sintéticos com grande potencial farmacológico (VARMA et al., 2021; AHMED; ALMALKI, 2021; NAVEEN et al., 2020, BAI et al., 2021). Dentre as atividades biológicas associadas a esses compostos estão a antibacteriana (HASSAN et al., 2020), a citotóxica (PITUCHA et al., 2021), a antimalárica (SAVIR et al., 2020), a antifúngica (HASSAN et al., 2020). Comparando mais de 100 trabalhos entre 2011 e 2021 envolvendo avaliação da atividade biológica de complexos de tiossemicarbazonas foi observado que a maioria deles avalia a atividade citotóxica, como mostrado na figura 4 para os complexos com tiossemicarbazonas bidentadas, onde o ligante se coordena ao metal por dois átomos (nitrogênio e enxofre) (COSTA, 2021).

Outras características importantes desses compostos são a facilidade de obtenção dessas substâncias, os altos rendimentos da reação, a elevada quimiosseletividade e a versatilidade para modificações em sua estrutura química (TENÓRIO et al., 2005; DU et al., 2002). Essa última característica pode justificar o amplo perfil farmacológico desses compostos (BERALDO; GAMBINO, 2004; KANSO et al., 2021). Elas podem formar ainda ligações covalentes com íons metálicos por meio de seus átomos de nitrogênio e enxofre (PRABHAKARAN, et al., 2008). Por esta razão, há registros de muitos complexos formados entre tiossemicarbazonas e metais com variados modos de coordenação (CASAS; GARCIA-TASENDE; SORDO, 2000). A coordenação com metais pode resultar em efeitos sinérgicos tanto do metal, quanto

das tiossemicarbazonas, potencializando as suas propriedades farmacológicas (BERALDO; GAMBINO, 2004; SILVA, 2020; KANSO et al., 2021).

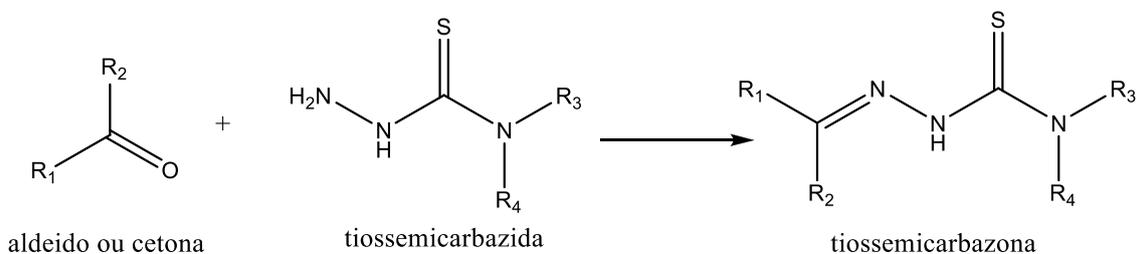
Figura 4 - Dados entre 2011 e 2021 sobre as atividades biológicas dos complexos com tiossemicarbazonas bidentadas



Fonte: Adaptado de Costa (2021).

A estrutura base das tiossemicarbazonas é representada pelo esqueleto  $C=N-N-C(=S)-N$  (LOBANA et al., 2009). A forma mais simples de obtenção destes compostos consiste em uma reação de condensação de uma tiossemicarbazida com um aldeído ou com uma cetona (Figura 5).

Figura 5 – Reação de formação de uma tiossemicarbazona

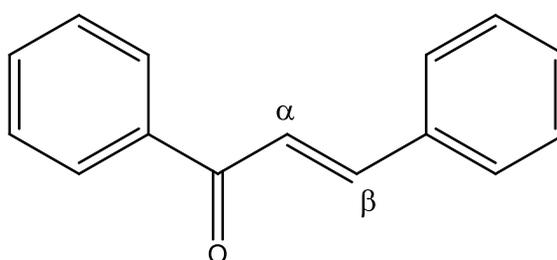


$R_1 = H$  e  $R_2 =$  grupo alquila ou arila (aldeídos);  $R_1$  e  $R_2 =$  grupo alquila ou arila (cetonas) e  $R_3$  e  $R_4 = H$ , grupos alquila ou arila.

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

As tiossemicarbazonas podem ser obtidas a partir de vários precursores contendo carbonila, sendo um deles as chalconas (SILVA et al., 2013). Esses compostos tem em sua estrutura química a presença de dois grupos aromáticos ligados entre si por uma carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada (Figura 5). As chalconas naturais são metabólitos amplamente encontrados nas plantas (LEAL et al., 2021), exibindo uma extensa lista de propriedades farmacológicas, sendo algumas delas: atividade citotóxica, antiinflamatória, antimicrobiana, antioxidante, dentre outras (SINGH; ANAND; KUMAR, 2014).

Figura 6 – Representação estrutural de uma chalcona



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Considerando as propriedades biológicas já conhecidas das chalconas e das tiossemicarbazonas, a combinação dessas estruturas químicas poderia resultar em compostos com propriedades farmacológicas bastante interessantes. Ademais, a coordenação dessas moléculas com metais também pode ser uma estratégia interessante para potencializar sua atividade biológica.

Um estudo realizado por Kalaiarasi e col. (2021) demonstrou que a atividade citotóxica das tiossemicarbazonas foi intensificada com a coordenação com rutênio(II), sendo todos os complexos mais ativos que a cisplatina frente às linhagens de adenocarcinoma (MCF-7) e câncer pulmonar (A549).

A respeito do mecanismo de ação das tiossemicarbazonas, estudos sugerem que são capazes de interagir com o DNA, além de inibir a atividade enzimática por meio da formação de complexos de cátions metálicos endógenos ou através de reações redox (BERALDO; GAMBINO, 2004). Os íons metálicos ligados a algumas tiossemicarbazonas podem interagir com ácidos nucleicos, impedindo a sua

replicação, e com a membrana dos microrganismos, comprometendo a sua integridade (SANTINI et al., 2013).

A enzima ribonucleotídeo redutase é outro alvo potencial das tiossemicarbazonas. Por ser responsável pela síntese de desoxirribonucleotídeos necessários para a síntese do DNA, se for inibida, a divisão celular ficará comprometida (CORY, 1988; LOUIE; MEADE; LIPPARD, 1999; BERALDO; GAMBINO, 2004). Essa enzima possui duas subunidades, a R1 e a R2, sendo a R2 estabilizada por um centro de ferro não-heme, essencial para a sua atividade catalítica (FINCH et al., 1999, Natarajan e Mathews, 2011). A complexação do ferro não-heme pelas tiossemicarbazonas desestabiliza a sua estrutura e resulta na inibição enzimática (ĐILOVIĆ et al., 2008). Outra enzima que pode ser afetada por esses compostos é a enzima topoisomerase II, cuja inibição acarreta bloqueio a processos relacionados a replicação do DNA (OLIVEIRA et al., 2017).

Mecanismos de ação diferentes dos já mencionados foram propostos em pesquisas sobre a ação citotóxica de derivados de tiossemicarbazonas sobre células neoplásicas. Santos-Pirath e col. (2021) reportaram que dentre 38 tiossemicarbazonas testadas, aquela que apresentou maior redução da viabilidade celular na concentração de 100  $\mu\text{M}$  frente as células neoplásicas linfoides Jurkat e Daudi não alterou o ciclo celular, mas induziu a morte celular com envolvimento mitocondrial por meio de alterações nos fatores reguladores de apoptose, com o aumento da expressão da caspase-3. Já o estudo conduzido por Pitucha e col. (2021) demonstrou que a exposição de células de melanoma às tiossemicarbazonas coordenadas com Cu(II) resultou em danos ao DNA e modificações na expressão de enzimas antioxidantes em células expostas aos compostos. Na tabela 1 são apresentados alguns mecanismos que justificariam a citotoxicidade das tiossemicarbazonas frente a linhagens de células tumorais humanas.

Diferente dos estudos avaliando o potencial citotóxico das tiossemicarbazonas, poucas são as publicações relacionando a atividade larvicida dessa classe. Entre os trabalhos encontrados podemos destacar o de Mesquita, Tadei e Bastos (2018), que reportaram a atividade larvicida do composto benzoiltiossemicarbazona e seu complexo com níquel(II) em larvas das espécies de *A. aegypti* e *Anopheles darlingi*, e o de Silva e col. (2015), que demonstra a atividade larvicida das moléculas ariltiossemicarbazonas e fenoximetiltiossemicarbazonas frente a larvas de *A. aegypti*.

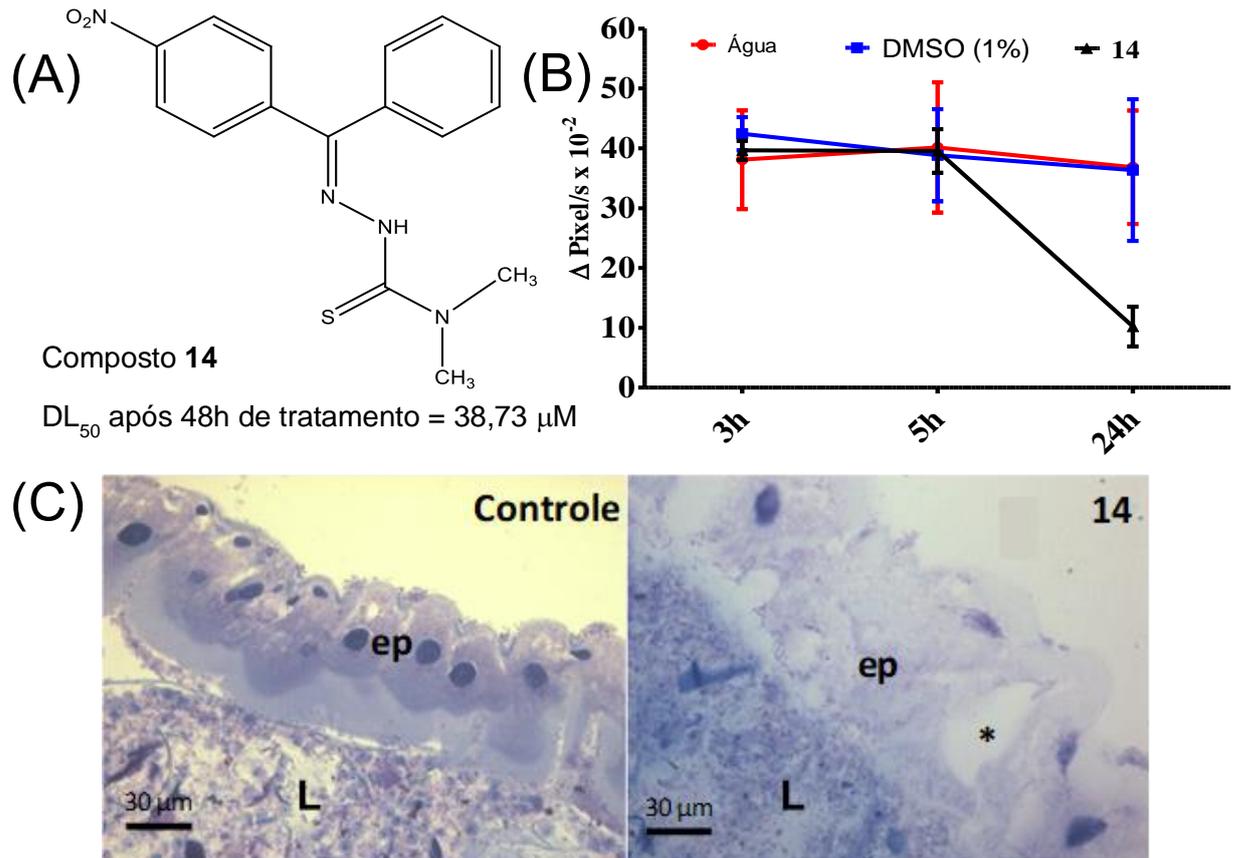
Tabela 1 – Alguns mecanismos relacionados à citotoxicidade de tiossemicarbazonas e seus derivados

| <b>Material biológico testado</b>                      | <b>Mecanismos de toxicidade</b>   | <b>Referência</b>    |
|--|---|----------------------|
| Células de adenocarcinoma humano (MCF-7)               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Estabilização dos complexos topoisomerase II – DNA</li> <li>- Possível interação com o DNA formando ligações cruzadas inter-helicoidais</li> </ul>                     | Chen et al., 2004    |
| Células de leucemia humana (HL60, U937, KG1a e Jurkat) | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ativação da apoptose</li> <li>- Perda da função mitocondrial</li> <li>- Parada do ciclo celular na fase G2/M</li> <li>- Defeito no alinhamento cromossômico</li> </ul> | Cabrera et al., 2015 |
| Células de câncer de bexiga humano (T-24)              | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Parada do ciclo celular na fase S</li> <li>- Disfunção mitocondrial</li> <li>- Ativação da apoptose</li> </ul>   | Yu et al., 2019      |
| Células de melanoma humano (SK-MEL-28)                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Danos ao DNA</li> <li>- Ativação da apoptose</li> <li>- Parada do ciclo celular na fase G2/M</li> <li>- Diminuição da expressão de enzimas antioxidantes</li> </ul>    | Pitucha et al., 2021 |

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Em um estudo anterior Grossi (2018) avaliou a toxicidade de tiossemicarbazonas derivadas de benzaldeído, acetofenona e benzofenona frente a larvas de *A. aegypti*, sendo observado que apenas as tiossemicarbazonas derivadas de benzofenona foram ativas. Com isso, foi possível sugerir que a preparação de compostos com um grupo mais volumoso no carbono imínico, caso das tiossemicarbazonas derivadas de chalconas, poderia ser uma estratégia para melhorar a atividade larvicida dentro dessa classe. Além disso, foi possível observar um comprometimento na atividade locomotora das larvas sobreviventes em relação aos grupos controle após serem tratadas com os compostos. Além de alterações morfológicas nas células do intestino médio das larvas de *A. aegypti*, como exemplificado pelos resultados da tiossemicarbazona 14 na figura 7.

Figura 7 - Resumo dos principais experimentos realizados para a tiossemicarbazona 14. (A) Estrutura química de 14 e seu valor de dose letal a 50% dos indivíduos após tratamento por 48 h. (B) Gráfico da velocidade percorrida em pixel/s monitorada para os indivíduos expostos aos controles (água e DMSO) e 14 por 3, 5 e 24 horas. (C) Imagens das células do intestino médio das larvas coradas com eosina e hematoxilina após exposição ao controle água e 14 por 24 horas



Legenda: ep = células do epitélio. \* = vacúolos citoplasmáticos. L= lúmen.

Fonte: Adaptado de GROSSI (2018).

#### 1.4 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NOVOS COMPOSTOS

Os métodos empregados para análise da atividade larvídica de novos compostos são preconizados pela OMS (WHO, 2005). Para investigar se um determinado composto é um potencial agente larvídica, os ensaios devem ser realizados com larvas de *A. aegypti* nos estádios de desenvolvimento L3 e/ou L4. Uma das dificuldades encontradas nesse tipo de experimento é a necessidade de um grande número de indivíduos para os testes e a necessidade de várias repetições para

que os resultados sejam reprodutíveis. Como tentativas para simplificar esse tipo de experimento temos o procedimento de Pridgeon e col. (2009), nele são utilizadas 5 larvas no estágio L1 em cada replicata e o tempo de exposição ao agente tóxico é de 24 h, permitindo uma triagem rápida, com redução de trabalho e utilização de pequeno número de larvas por experimento. Além desses experimentos, outra abordagem seria avaliar se a exposição a um agente tóxico por 24 h poderia acarretar uma redução do tempo de vida durante o desenvolvimento dos indivíduos mesmo na ausência desse agente tóxico (TOMÉ et al., 2014; FERNANDES; et.al, 2019).

Outra forma de analisar a toxicidade dos compostos sobre as larvas é a avaliação de alterações morfológicas em cortes histológicos. A extensão de lesões provocadas por substâncias tóxicas tem sido investigada em células do intestino médio de larvas (VALOTTO et al., 2011; SCUDELER; SANTOS, 2013). Todavia, de acordo com estudos sobre *Drosophila melanogaster* essa análise não deve ser utilizada de forma isolada, pois as células do intestino médio das larvas se dividem pouco e em curtos períodos nos estágios mais desenvolvidos dos insetos, sendo limitada a detecção da proliferação de células regenerativas nesse órgão (MICCHELLI; PERRIMON, 2005). Junto com esse tipo de experimento é possível realizar a marcação de alguns anticorpos específicos diretamente nas células, como observado no trabalho de Fernandes e col. (2019). Esse experimento pode ser exemplificado pela marcação de enzimas do tipo caspases, que são alvos importantes no processo de apoptose e em outros processos celulares. Após sinal específico, as caspases iniciadoras clivam e ativam as caspases efetoras, que possuem vários substratos na célula. A atividade dessas enzimas leva à apoptose e outros eventos de sinalização celular (LI; YUAN, 2008).

Desvendar o mecanismo de ação de um composto bioativo geralmente não é uma tarefa fácil e a prova disso são o inseticida piriproxifeno (SALGADO, 2013) e o fármaco pregabalina (BLOMMEL et al., 2007) que foram liberados para utilização sem a elucidação completa de seus modos de ação. As dificuldades encontradas vão desde a descoberta do alvo molecular até o desenvolvimento de metodologias que atestem a interação do alvo molecular com a substância em teste. Quando o mecanismo de ação é desconhecido, a execução de experimentos comportamentais e testes *in vitro* podem auxiliar na compreensão de como a molécula de interesse atua.

Uma alternativa para avaliação de potenciais efeitos tóxicos são estudos *in vitro* envolvendo o uso de linhagens celulares padronizadas, sendo importante destacar que existem várias formas de avaliar a viabilidade celular, seja pela utilização de corantes que permitem avaliar a integridade da célula ou compostos específicos que avaliam a função de organelas celulares. Um ensaio interessante para avaliação de citotoxicidade é o ensaio de MTT indicado para medir a atividade metabólica celular e indicar a viabilidade das células. Esse ensaio pode ser realizado em diferentes linhagens celulares, inclusive poderia ser adaptado para utilizar em linhagens do gênero *Aedes*. Existem ainda outras técnicas, como citometria de fluxo, que por meio de kits específicos nos permitem obter informações específicas sobre o possível alvo do composto nas células.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial citotóxico e larvicida de tiossemicarbazonas derivadas de chalconas e seus complexos de Cu(II) e Ag(I) em mosquitos do gênero *Aedes*.

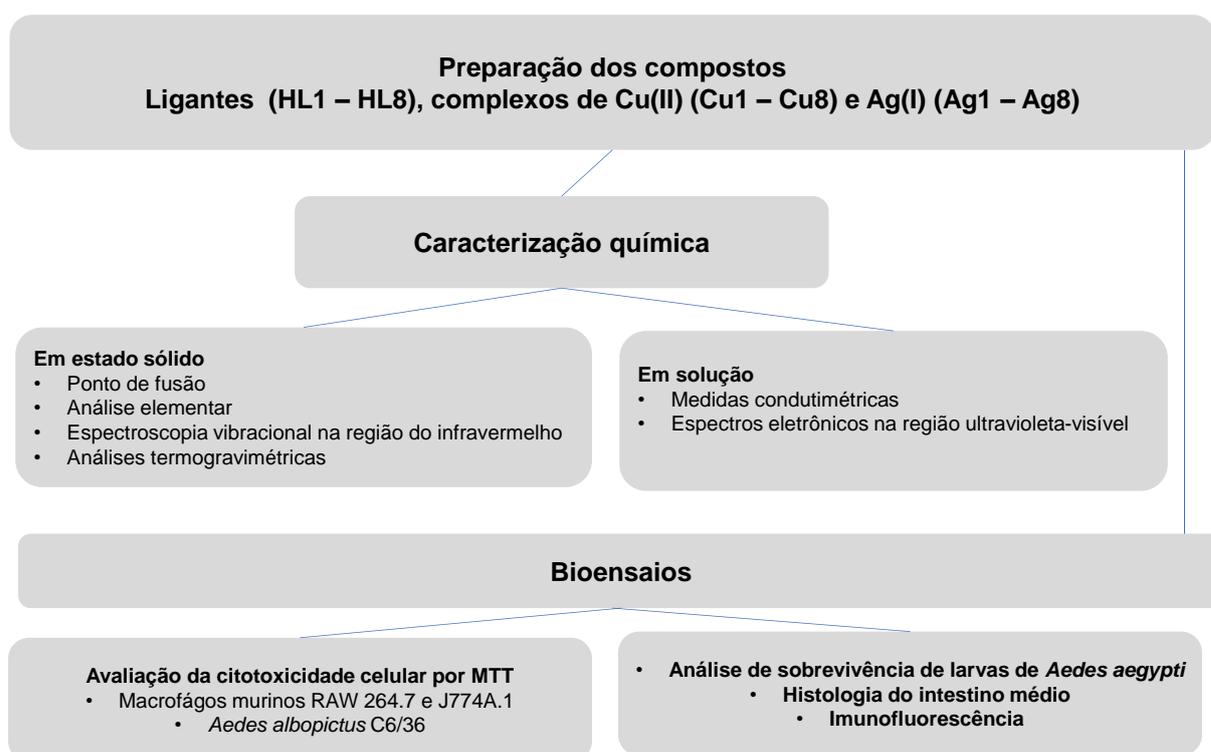
### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar tiossemicarbazonas derivadas de chalconas e seus complexos de Cu(II) e Ag(I).
- Avaliar atividade citotóxica desses compostos em diferentes concentrações em células de macrófagos murinos e *Aedes albopictus*.
- Avaliar a atividade larvicida dos compostos selecionados em *Aedes aegypti* no estágio L4.
- Avaliar alterações morfológicas dos compostos selecionados em larvas de *Aedes aegypti*.
- Avaliar o potencial dos compostos selecionados em ocasionar a apoptose celular por meio da marcação de caspase-3 por imunofluorescência em larvas de *Aedes aegypti*.

### 3 METODOLOGIA

O estudo foi organizado conforme o esquema apresentado na Figura 8. O trabalho encontra-se dividido em duas partes, sendo uma parte química e outra biológica. Na parte química foi descrita a caracterização dos compostos preparados e na parte biológica foram relacionados os dados referentes a avaliação citotóxica e larvicida. Devido a necessidade de adequação de alguns experimentos realizados em parceria, foi necessário a seleção dos compostos que foram avaliados na parte biológica.

Figura 8 - Fluxograma contendo as etapas realizadas neste trabalho



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 3.1 PREPARAÇÃO DOS COMPOSTOS

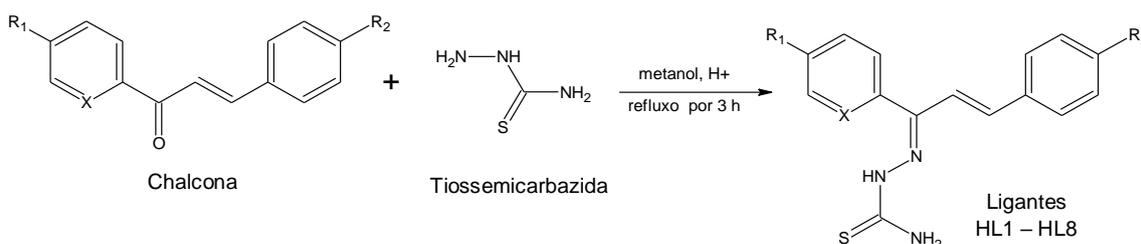
Os reagentes e solventes usados na preparação dos compostos foram adquiridos das marcas Merck, Aldrich, J.T. Baker e Synth em alto grau de pureza

(>97%), sendo utilizados sem nenhum tratamento prévio. As chalconas utilizadas foram preparadas e caracterizadas anteriormente (SANTOS, 2021). As pesagens foram feitas em uma balança analítica Shimadzu AUY220 ou Weblaborsp M212Ai, ambas com sensibilidade de 0,0001 g.

### 3.1.1 Preparação das tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas foram obtidas a partir da reação de chalconas e tiossemicarbazida catalisada por ácido (Figura 9), foi utilizada a metodologia proposta por Silva (2013). Em um balão de fundo redondo de 100 mL foi adicionado 5 mmol da chalcona desejada e 5 mmol de tiossemicarbazida em 20 mL de metanol e 2 mL de água. A mistura foi agitada e duas gotas de ácido clorídrico foram adicionadas para catalisar a reação. O sistema foi mantido sob agitação constante e refluxo por três horas. Ao fim deste período a solução foi resfriada e a suspensão formada foi filtrada a vácuo.

Figura 9 – Representação genérica da reação aplicada na preparação das tiossemicarbazonas derivadas de chalconas



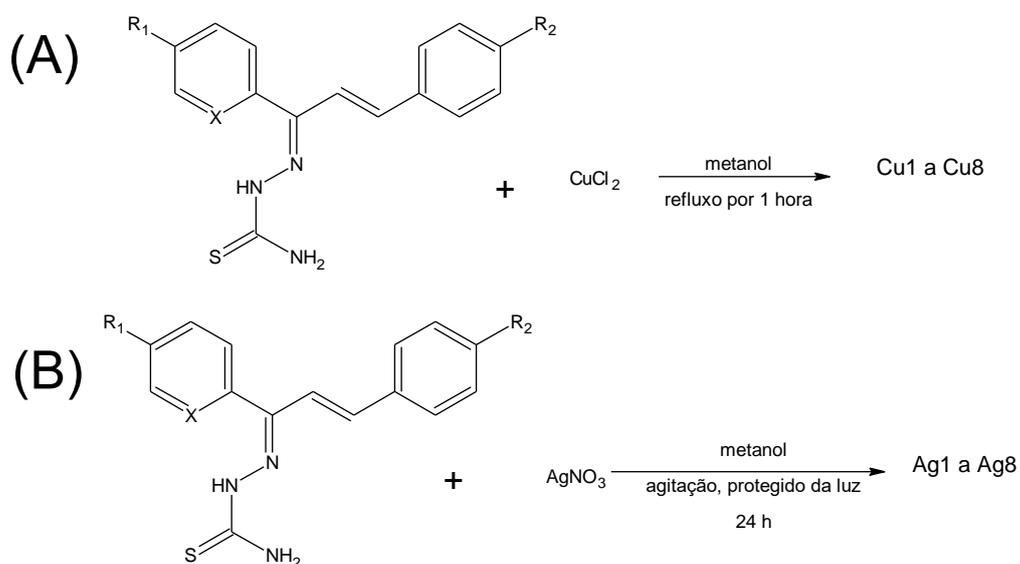
| Composto | X  | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>                   |
|----------|----|-----------------|----------------------------------|
| HL1      | CH | H               | H                                |
| HL2      | N  | H               | H                                |
| HL3      | CH | NO <sub>2</sub> | H                                |
| HL4      | CH | H               | NO <sub>2</sub>                  |
| HL5      | N  | H               | NO <sub>2</sub>                  |
| HL6      | CH | NO <sub>2</sub> | NO <sub>2</sub>                  |
| HL7      | CH | NO <sub>2</sub> | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> |
| HL8      | CH | NO <sub>2</sub> | OCH <sub>3</sub>                 |

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 3.1.2 Preparação dos complexos de Cu(II)

Os complexos de Cu(II) foram preparados a partir da reação de tiossemicarbazonas com cloreto de cobre(II) (CuCl<sub>2</sub>) em metanol (Figura 10A), a metodologia utilizada foi proposta por Silva (2013). Em um balão de fundo redondo de 100 mL foi adicionado 2 mmol da tiossemicarbazona desejada e 2 mmol de cloreto de cobre(II) em 25 mL de metanol. A mistura foi mantida sob agitação e refluxo por 1 h. A suspensão obtida foi filtrada a vácuo e lavada com metanol.

Figura 10 – Representação genérica para as reações ocorridas durante a preparação dos complexos de Cu(II) e Ag(I) contendo as tiossemicarbazonas derivadas de chalcona



| Composto | X  | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>                   |
|----------|----|-----------------|----------------------------------|
| HL1      | CH | H               | H                                |
| HL2      | N  | H               | H                                |
| HL3      | CH | NO <sub>2</sub> | H                                |
| HL4      | CH | H               | NO <sub>2</sub>                  |
| HL5      | N  | H               | NO <sub>2</sub>                  |
| HL6      | CH | NO <sub>2</sub> | NO <sub>2</sub>                  |
| HL7      | CH | NO <sub>2</sub> | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> |
| HL8      | CH | NO <sub>2</sub> | OCH <sub>3</sub>                 |

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 3.1.3 Preparação dos complexos de Ag(I)

Os complexos de Ag(I) foram preparados a partir da reação de tiossemicarbazonas com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) em metanol (Figura 10B), adaptando o procedimento de Rocha (2019). Em um balão de fundo redondo de 100 mL foi adicionado 2 mmol da tiossemicarbazona desejada e 2 mmol de nitrato de prata em 25 mL de metanol. A mistura foi mantida sob agitação por 24 h em temperatura ambiente. A suspensão obtida foi filtrada a vácuo e lavada com metanol.

## 3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

### 3.2.1 Ponto de fusão

A medida da temperatura de fusão foi realizada no aparelho da Microquímica, modelo MQAPF – 302 na faixa de 30 a 300°C com rampa de aquecimento de 2,5°C/min. A temperatura de fusão foi apresentada como a média entre o início e o fim do evento quando a temperatura variou de até 1°C. Se observado o evento em um tempo maior, foi relacionado esse evento como a temperatura de decomposição. A acetanilida foi utilizada como padrão para observação do ponto de fusão (113 a 115°C).

### 3.2.2 Análise elementar

As análises elementares foram realizadas no Laboratório de Análise Elementar do Departamento de Química da UFV utilizando o instrumento TruSpec Micro da Marca LECO.

### 3.2.3 Medidas condutimétricas

As medidas de condutividade de soluções das tiossemicarbazonas ou seus complexos de Cu(II) ou Ag(I) diluídas em DMSO (2,1 a 4,1 mmol L<sup>-1</sup>) foram realizadas em um condutivímetro Metter Toledo série SevenCompact com célula condutimétrica de mesmo fabricante e constante 0,475505 cm<sup>-1</sup> do mesmo fabricante.

### 3.2.4 Espectros eletrônicos na região do ultravioleta-visível

Os espectros eletrônicos de soluções diluídas (concentrações de 28 a 56 μmol L<sup>-1</sup>) dos compostos em DMSO foram obtidos utilizando o espectrofotômetro Lambda 25 (PerkinElmer) e cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Como branco foi utilizado o próprio solvente (DMSO). Os dados foram tratados usando o programa Microcal Origin 9.0.

### 3.2.5 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho médio (4000 a 400 cm<sup>-1</sup>) dos compostos foram realizados em um equipamento da Perkin Elmer, com transformada de Fourier, modelo Spectrum Two™, a partir de pastilhas contendo KBr. Essas pastilhas foram preparadas macerando, em um gral de ágata, o composto desejado juntamente com o KBr na proporção de ~ 1:100. Esse material foi transferido para o pastilhador e prensado utilizando uma prensa manual. Os espectros foram obtidos como a média de 8 varreduras consecutivas, com resolução de 2 cm<sup>-1</sup> e intervalo de onda de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>. Para a aquisição dos espectros foi utilizado o programa Perkin Elmer Spectrum ES (versão do aplicativo: 10.03.08.0133). Pastilhas de KBr puro foram utilizadas como branco. Os dados foram exportados para edição no programa Microcal Origin 9.0.

### 3.2.6 Análises termogravimétricas

As curvas termogravimétricas (curvas TG) para tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II) e Ag(I) foram obtidas utilizando o equipamento Hitachi STA7200RV. Os experimentos foram realizados com rampa de temperatura de 30°C a 900°C e taxa de aquecimento de 15°C min<sup>-1</sup>. A atmosfera utilizada foi de ar comprimido com fluxo de 300 mL min<sup>-1</sup>. A massa da amostra (~2,0 mg) foi analisada em cadinho de alumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Os dados foram exportados para o Microcal Origin 9.0 para edição.

## 3.3 BIOENSAIOS

### 3.3.1 Avaliação da citotoxicidade celular por MTT

#### 3.3.1.1 Cultura celular

As linhagens celulares de macrófagos murinos RAW 264.7 e J774 A.1 foram cultivadas em garrafas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>, em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de aminoácidos essenciais e 0,5% de solução penicilina (10.000 UI/mL) /estreptomicina (10.000 mg/mL). O tempo de cultivo variou de acordo com a linhagem celular e a quantidade de células obtidas.

As células de larvas de *Aedes albopictus* C6/36 foram cultivadas em meio de Leibovitz L15 (Vitrocell) suplementado com 5% de soro bovino fetal, 1% de aminoácidos essenciais e 0,5% de solução penicilina (10.000 UI/mL)/estreptomicina (10.000 mg/mL). As culturas de células C6/36 foram mantidas em estufa a 28°C e repicadas sempre que atingiam a confluência de 80 a 90% usando um espalhador de células (Cell scraper, Nunc). Em torno de 1/3 da quantidade total de células eram mantidas nas garrafas durante os repiques.

Após atingirem a confluência, as garrafas foram raspadas e as células colocadas em placas de 96 poços na concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL para o ensaio de viabilidade por MTT (CASTRO et al., 2012).

### 3.3.1.2 Avaliação da viabilidade celular por MTT

A viabilidade das células foi determinada por meio do ensaio colorimétrico utilizando o sal brometo de azul de tiazolil tetrazólio (MTT). Para avaliação da viabilidade celular, todas as células foram cultivadas na presença ou ausência das tiossemicarbazonas, seus complexos de Cu(II) e Ag(I) e os sais  $\text{CuCl}_2$  ou  $\text{AgNO}_3$  nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$  por 48 horas. Como controle, as células foram tratadas com DMSO 1% v/v. Após 48 horas de cultivo o sobrenadante foi removido cuidadosamente dos poços de cultura.

Em seguida, foram adicionados 90  $\mu\text{L}$  de RPMI e 10  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL) e as placas com macrófagos murinos RAW 264.7 e J774 A.1 foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ , enquanto as placas com células de *Aedes albopictus* C6/36 foram mantidas a  $28^\circ\text{C}$  em estufa comum. Após um período de 4 horas, a reação foi finalizada com a retirada do meio e a adição de 100  $\mu\text{L}$  de DMSO para a dissolução dos cristais de formazan produzidos. As placas foram levemente agitadas para proporcionar total solubilização e a densidade óptica medida no comprimento de onda de 570 nm no leitor de microplacas Thermo Fisher Scientific Multiskan™. Os testes foram realizados em triplicata em três experimentos independentes.

Os dados foram analisados utilizando o programa Prism 9.0 e gerados os gráficos de viabilidade celular (média  $\pm$  desvio padrão) em função da concentração. Esses dados também foram utilizados para estimar o valor da concentração que inibe o crescimento celular em 50% ( $\text{IC}_{50}$ ). Os dados foram submetidos ao teste One-way ANOVA com post-hoc de Bonferroni, sendo consideradas as diferenças estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$  em relação ao controle DMSO.

### **3.3.2 Análise da sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* do estágio L4 durante e após exposição por 24h aos compostos selecionados**

#### *3.3.2.1 Obtenção das larvas*

Larvas de 4º estágio (L4) de *A. aegypti* (PP-Campos, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil) foram obtidas da colônia mantida no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. As larvas foram criadas em recipientes com água decolorada e alimentadas com ração de tartaruga (Reptolife). Adultos recém-emergidos de ambos os sexos foram alimentados com solução 10% de sacarose, mantidos a  $25 \pm 5^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas.

#### *3.3.2.2 Ensaio de sobrevivência*

O ensaio de sobrevivência foi adaptado de Tomé (2014). Nesse experimento, cerca de 10 mg dos compostos selecionados foram diluídos em 1 mL de DMSO. A partir dessas soluções estoque foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações desejadas no volume final de 20 mL. Essas concentrações foram de 10  $\mu\text{M}$  para o experimento com a concentração fixa ou 0,1, 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$  para o experimento com variação das concentrações. O percentual máximo de DMSO nessas soluções aquosas foi de 1% v/v, portanto uma solução nessa concentração foi utilizada como controle negativo. Além disso, a água decolorada também foi utilizada como controle negativo.

As soluções foram transferidas para placas de acrílico com 12 poços e em cada poço foram colocadas cinco larvas L4 de *A. aegypti*. Esse experimento foi realizado em quadruplicata. Após exposição por 24 h ao composto a ser testado na concentração desejada, foi avaliada a sobrevivência dos indivíduos. Os indivíduos incapazes de se locomover mediante estímulos com um pincel foram considerados mortos e descartados. Os sobreviventes foram transferidos para outra placa contendo água decolorada e a sobrevivência dos indivíduos foi monitorada a cada 24 h, por um período de 12 dias até que todos os indivíduos atingissem a fase adulta. Durante todo

o experimento, as larvas foram alimentadas com 5 mg de alimento, sendo este repostado quando necessário.

O gráfico de sobrevivência após exposição por 24 h aos compostos selecionados e as curvas de sobrevivência após a exposição foram geradas usando o programa Prism 9.0. Utilizando esse programa foi realizada a análise estatística pelo estimador de Kaplan-Meier, sendo a similaridade das curvas determinada pelo teste de Log-Rank.

### **3.3.3 Histologia do intestino médio**

Seis larvas L4 de *A. aegypti* após exposição por 24 h aos compostos selecionados na concentração de 10  $\mu$ M ou aos grupos controle água e DMSO 1% v/v foram dissecadas em solução fisiológica para insetos (0,1 M NaCl, 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e transferidos para solução fixadora de Zamboni (paraformaldeído a 2% contendo 15% de ácido pícrico em tampão fosfato de sódio a 0,1 M), por 2 h em temperatura ambiente. Os intestinos foram desidratados em uma série crescente de etanol (70, 80, 90, 100%) e embebidos em Historesina (Leica Microsystems, Heidelberg Mannheim, Alemanha), seccionados com 5  $\mu$ m de espessura e corados com hematoxilina e eosina. As amostras foram montadas em meio Eukitt (Fluka), analisadas e fotografadas no microscópio Olympus BX-60 acoplado com câmera digital Q-Color3 (Olympus Corp. Tokyo, Japan). As imagens foram tratadas usando o programa ImageJ. Foi aplicado o filtro “unsharp Mask” com raio de 3 pixels e peso da máscara 0.6.

### **3.3.4 Imunofluorescência**

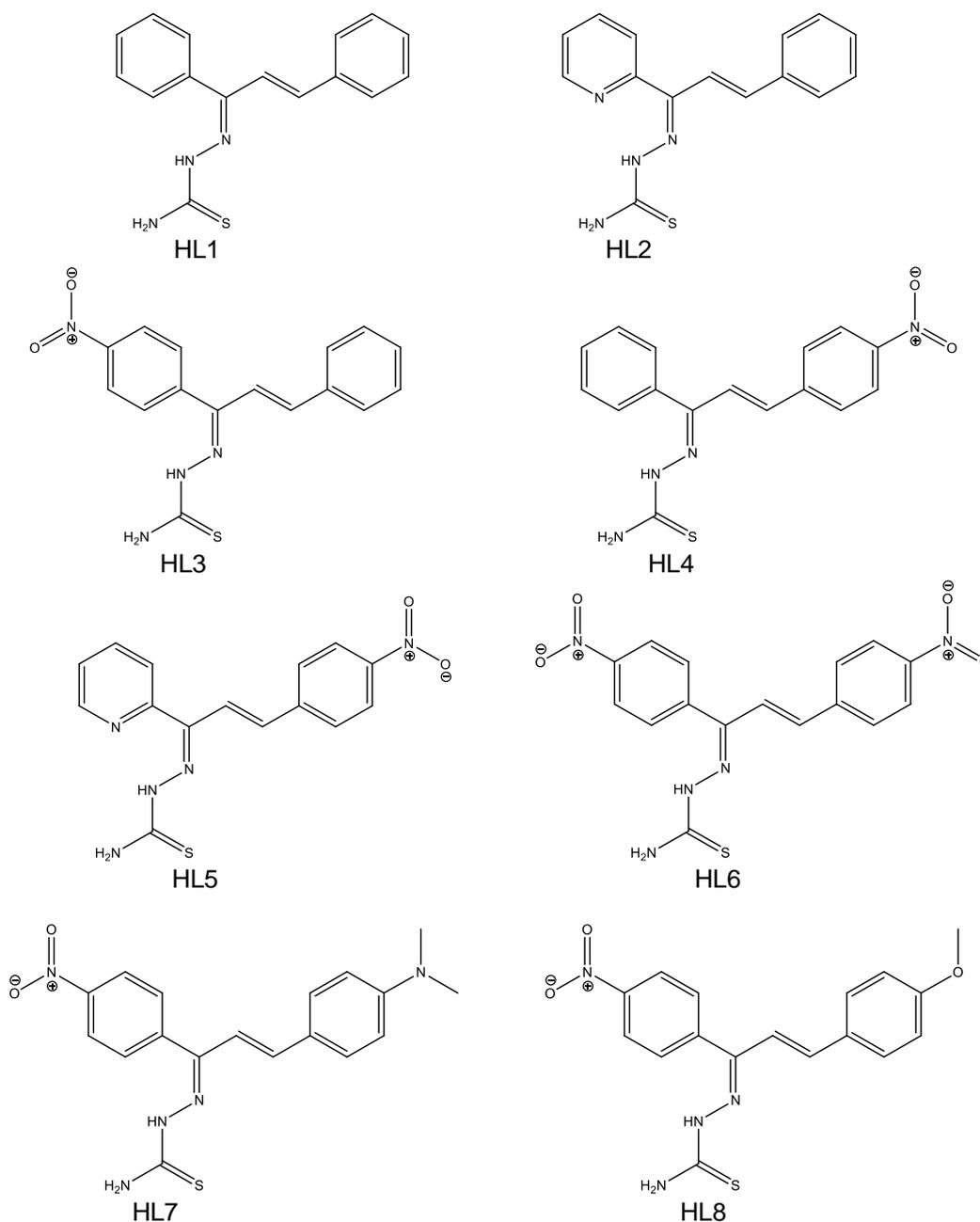
Para realização da imunomarcação, seis intestinos médios de larvas L4 tratadas por 24h com os compostos selecionados na concentração de 10  $\mu$ M ou dos controles (água e DMSO 1% v/v) foram dissecados em solução fisiológica para insetos (0,1M NaCl, 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e transferidos para solução fixadora de Zamboni por 1 h à temperatura ambiente. Após a fixação, os intestinos médios

foram submetidos a três lavagens de 30 min cada, em tampão fosfato contendo 1% de Triton X-100. As amostras foram então incubadas por 48 h a 4°C com solução de anticorpo primário a 1% em tampão fosfato. As amostras foram incubadas separadamente com o anticorpo primário anti-caspase-3 clivada (diluição 1:200) (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EUA) diluídos em 0,1 M tampão fosfato. Após essa etapa, as amostras foram lavadas três vezes (10 min cada) com tampão fosfato e incubadas no escuro por 24 h, a 4°C, com anticorpo secundário anti-coelho conjugado IgG-FITC (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, U.S.A) (1:500). As amostras foram então coradas com diamidino-2-fenilindol (DAPI; Biotium, Inc., Hayward, CA, EUA; 1:500) por 30 min e as lâminas foram montadas em solução de Mowiol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), analisadas e fotografadas no microscópio fluorescente Evos M5000 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA). O número de células positivas para caspase-3 detectadas por lâmina foi contado em todo o intestino usando uma objetiva de 20x. Os dados foram analisados utilizando o programa Prism 9.0 e gerado o gráfico do número de células positivas (média  $\pm$  desvio padrão em relação as seis lâminas preparadas) por grupo testado. Os dados foram submetidos ao teste One-way ANOVA com post-hoc de Bonferroni.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

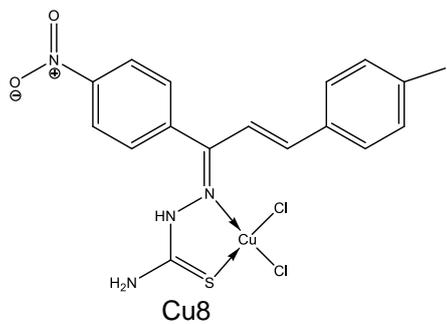
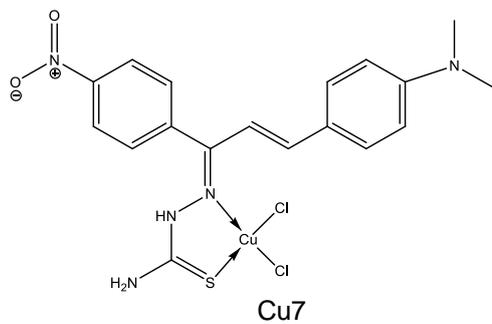
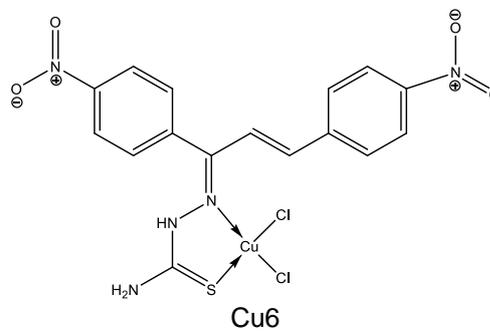
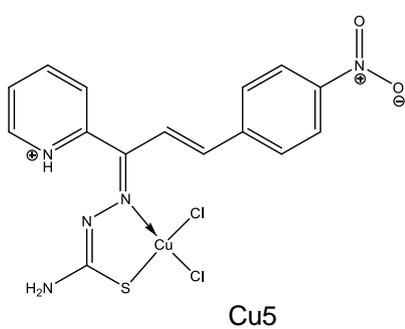
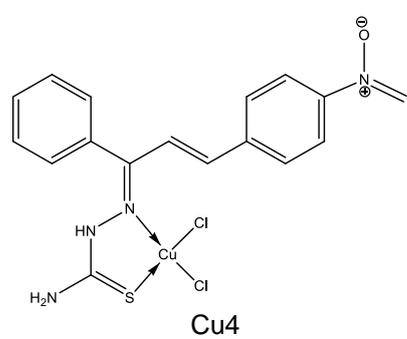
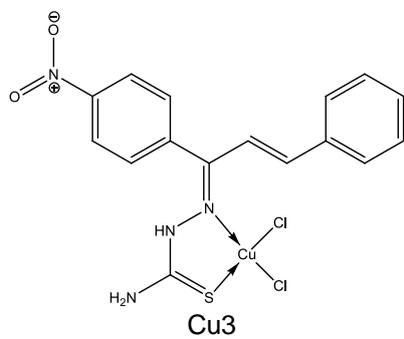
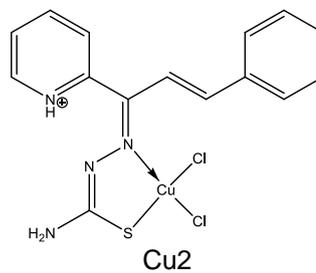
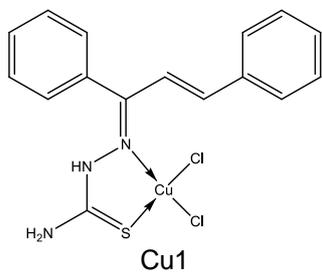
Neste trabalho foram preparadas oito tiossemicarbazonas (HL1 – HL8) e seus respectivos complexos de Cu(II) (Cu1 – Cu8) e Ag(I) (Ag1 – Ag8) cujas prováveis estruturas estão apresentadas nas Figuras 11, 12 e 13. Essas estruturas foram propostas com base nas informações obtidas durante a caracterização, cujos resultados estão apresentados na seção 4.1.

Figura 11 – Representação química da provável estrutura das tiossemicarbazonas estudadas neste trabalho



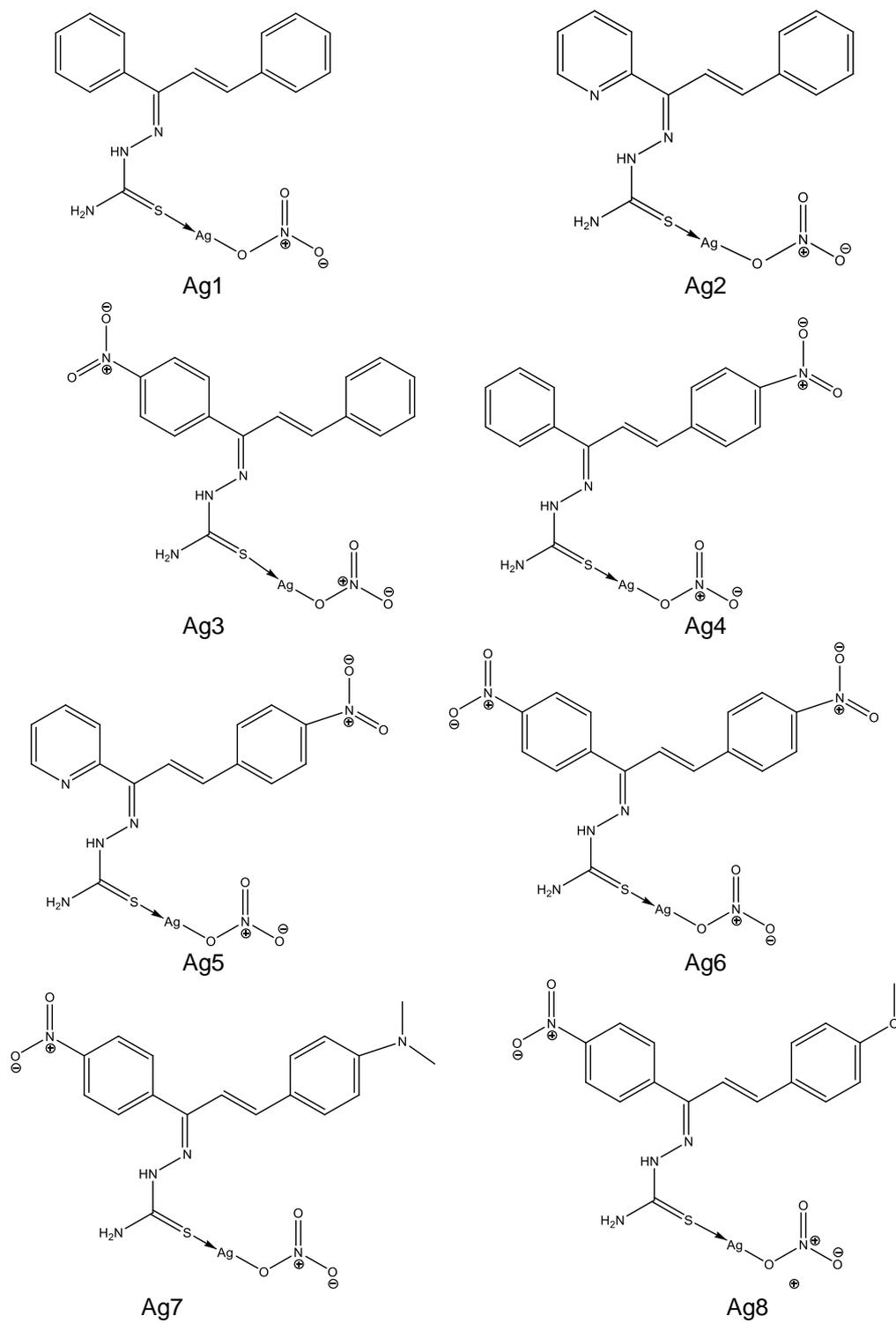
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 12 - Representação química da provável estrutura dos complexos de Cu(II) estudados neste trabalho



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 13 - Representação química da provável estrutura dos complexos de Ag(I) estudados neste trabalho



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

## 4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

### 4.1.1 Propriedades físicas dos compostos

Na tabela 2 estão apresentadas as informações de cor, aspecto, rendimento médio da reação e temperatura de fusão para os compostos obtidos neste trabalho.

Tabela 2 – Dados de cor, aspecto, rendimento médio da reação e temperatura de fusão para as tiossemicarbonas HL1 – HL8 e seus respectivos complexos de Cu(II) (Cu1 – Cu8) e Ag(I) (Ag1 – Ag8)

| Composto   | Cor              | Aspecto       | Rendimento % | Temperatura de fusão (°C) |
|------------|------------------|---------------|--------------|---------------------------|
| <b>HL1</b> | amarelo pálido   | sólido amorfo | 37           | 142                       |
| <b>Cu1</b> | ocre             | sólido amorfo | 56           | 240*                      |
| <b>Ag1</b> | marrom escuro    | sólido amorfo | 27           | 126*                      |
| <b>HL2</b> | branco amarelado | sólido amorfo | 71           | 229                       |
| <b>Cu2</b> | verde escuro     | cristalino    | 97           | 222*                      |
| <b>Ag2</b> | marrom           | sólido amorfo | 79           | 153*                      |
| <b>HL3</b> | amarelo canário  | cristalino    | 54           | 204                       |
| <b>Cu3</b> | canela           | sólido amorfo | 80           | 178*                      |
| <b>Ag3</b> | amarelo pálido   | sólido amorfo | 84           | 149*                      |
| <b>HL4</b> | amarelo          | cristalino    | 85           | 194                       |
| <b>Cu4</b> | sépia            | sólido amorfo | 80           | 222*                      |
| <b>Ag4</b> | verde oliva      | sólido amorfo | 77           | 123*                      |
| <b>HL5</b> | amarelo canário  | cristalino    | 62           | 218                       |
| <b>Cu5</b> | verde oliva      | sólido amorfo | 98           | 268*                      |
| <b>Ag5</b> | marrom           | cristalino    | 94           | 169*                      |
| <b>HL6</b> | amarelo          | sólido amorfo | 79           | 201                       |
| <b>Cu6</b> | canela           | sólido amorfo | 85           | 198*                      |
| <b>Ag6</b> | amarelo limão    | sólido amorfo | 87           | 146*                      |
| <b>HL7</b> | laranja escuro   | cristalino    | 49           | 266*                      |
| <b>Cu7</b> | marrom           | sólido amorfo | 77           | 283*                      |
| <b>Ag7</b> | marrom escuro    | sólido amorfo | 56           | 233*                      |
| <b>HL8</b> | amarelo limão    | sólido amorfo | 88           | 238                       |
| <b>Cu8</b> | marrom terra     | sólido amorfo | 80           | 214*                      |
| <b>Ag8</b> | verde oliva      | sólido amorfo | 91           | 142*                      |

Legenda: \* = temperatura de decomposição.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 4.1.2 Análise elementar

Na tabela 3 estão apresentadas os dados da análise elementar das tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II) e Ag(I). Os dados de análise elementar sugerem a formação de complexos do tipo  $[Cu(HL)Cl_2]$  e  $[Ag(HL)NO_3]$ , confirmando a formação de compostos com relação metal-ligante de 1:1.

Tabela 3 – Dados de análise elementar (% C, % H e % N) para as tiossemicarbazonas HL1 – HL8 e seus respectivos complexos de Cu(II) (Cu1 – Cu8) e Ag(I) (Ag1 – Ag8)

| Composto   | % C                       | % H                       | % N                       | Proposta<br>Tipo<br>(forma molecular)  |
|------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--|
|            | Experimental<br>(teórico) | Experimental<br>(teórico) | Experimental<br>(teórico) |  |
| <b>HL1</b> | 66,48 (68,30)             | 5,24 (5,37)               | 14,67 (14,93)             | HL (C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> S)  |
| <b>Cu1</b> | 47,59 (46,21)             | 3,70 (3,64)               | 10,30 (10,11)             | $[Cu(HL)Cl_2]$ (C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>3</sub> S)                |
| <b>Ag1</b> | 42,39 (43,79)             | 3,80 (3,89)               | 12,12 (12,02)             | $[Ag(HL)NO_3]$ (C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> AgN <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S)                 |
| <b>HL2</b> | 64,44 (63,80)             | 4,87 (5,00)               | 19,25 (19,84)             | HL (C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> S)  |
| <b>Cu2</b> | 43,58 (43,22)             | 3,42 (3,39)               | 12,94 (13,44)             | $[Cu(HL)Cl_2]$ (C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>4</sub> S)                |
| <b>Ag2</b> | 42,74 (41,13)             | 3,75 (3,67)               | 14,63 (14,99)             | $[Ag(HL)NO_3]$ (C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> AgN <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S)                 |
| <b>HL3</b> | 59,64 (58,88)             | 4,31 (4,32)               | 16,56 (17,17)             | HL (C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S)                               |
| <b>Cu3</b> | 43,30 (41,70)             | 3,04 (3,06)               | 12,20 (12,16)             | $[Cu(HL)Cl_2]$ (C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S) |
| <b>Ag3</b> | 37,47 (38,72)             | 2,89 (2,84)               | 13,99 (14,11)             | $[Ag(HL)NO_3]$ (C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> AgN <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S)                 |
| <b>HL4</b> | 60,38 (58,88)             | 4,32 (4,32)               | 16,36 (17,17)             | HL (C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S)                               |
| <b>Cu4</b> | 42,09 (41,70)             | 3,06 (3,06)               | 12,38 (12,16)             | $[Cu(HL)Cl_2]$ (C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S) |
| <b>Ag4</b> | 39,29 (38,72)             | 2,91 (2,84)               | 14,55 (14,11)             | $[Ag(HL)NO_3]$ (C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> AgN <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S)                 |
| <b>HL5</b> | 54,68 (55,03)             | 4,03 (4,00)               | 20,52 (21,39)             | HL (C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S)                               |
| <b>Cu5</b> | 38,91 (39,01)             | 2,90 (2,84)               | 14,66 (15,16)             | $[Cu(HL)Cl_2]$ (C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S) |
| <b>Ag5</b> | 39,85 (39,78)             | 2,78 (2,89)               | 18,79 (18,56)             | $[Ag(HL)NO_3]$ (C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> AgN <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S)                 |
| <b>HL6</b> | 50,48 (51,75)             | 3,61 (3,53)               | 18,69 (18,86)             | HL (C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S)                               |
| <b>Cu6</b> | 38,83 (37,99)             | 2,71 (2,59)               | 13,55 (13,85)             | $[Cu(HL)Cl_2]$ (C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S) |
| <b>Ag6</b> | 35,12 (35,51)             | 2,46 (2,42)               | 15,64 (15,53)             | $[Ag(HL)NO_3]$ (C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> AgN <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S)                 |
| <b>HL7</b> | 59,84 (58,52)             | 5,36 (5,18)               | 19,56 (18,96)             | HL (C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S)                               |
| <b>Cu7</b> | 43,66 (42,90)             | 3,71 (3,80)               | 13,84 (13,90)             | $[Cu(HL)Cl_2]$ (C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S) |
| <b>Ag7</b> | 41,23 (40,09)             | 3,59 (3,55)               | 15,40 (15,58)             | $[Ag(HL)NO_3]$ (C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> AgN <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S)                 |
| <b>HL8</b> | 58,22 (57,29)             | 4,41 (4,52)               | 15,21 (15,72)             | HL (C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S)                               |
| <b>Cu8</b> | 40,88 (41,60)             | 3,28 (3,29)               | 11,62 (11,41)             | $[Cu(HL)Cl_2]$ (C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S) |
| <b>Ag8</b> | 38,81 (38,80)             | 2,99 (3,06)               | 12,77 (13,31)             | $[Ag(HL)NO_3]$ (C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> AgN <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S)                 |

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 4.1.3 Medidas condutimétricas

A condutimetria é um método de análise que se fundamenta na medida da condutividade elétrica de uma solução eletrolítica. A condução da eletricidade através das soluções iônicas ocorre devido à migração de íons positivos e negativos, durante a aplicação de um potencial de corrente alternada (EDEN, 1983). Em complexos de coordenação essas medidas nos permitem calcular a condutividade molar do composto que é uma propriedade característica do material e está relacionada a quantidade de cátions e ânions gerada durante a dissociação iônica dessa espécie na solução, principalmente quando se trata de solventes orgânicos (GEARY, 1971).

Na tabela 4 estão apresentados os valores das condutividades elétricas medidas para as soluções e a condutividade molar calculada para os compostos dissolvidos em DMSO. O sal de brometo de cetiltrimetilamônio foi utilizado para comparação por se comportar como um eletrólito do tipo 1:1 quando dissolvido em DMSO.

Diferente dos ligantes que durante a sua dissolução em DMSO permanecem como moléculas neutras ( $\Lambda_M \sim 0$ ), os complexos se dissociam formando espécies carregadas ( $\Lambda_M > 12,5 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ ). Os dados das medidas condutimétricas sugerem a formação de compostos do tipo  $[\text{Cu}(\text{HL})\text{Cl}_2]$  para Cu1, Cu3, Cu4 e Cu6-Cu8 e do tipo  $[\text{Cu}(\text{HL})\text{Cl}]\text{Cl}$  para Cu2 e Cu5. Enquanto que todos complexos de Ag(I) são do tipo  $[\text{Ag}(\text{HL})]\text{NO}_3$ .

Nos complexos de Cu(II) é muito comum a substituição do ligante cloreto por solventes coordenantes, caso do DMSO, o que justifica a condutividade molar calculada ser maior que zero. Cu2 e Cu5 já foram estudados em dimetilformamida (DMF) por Silva (2013), naquela situação os complexos também apresentaram valores de condutividade molar intermediários entre uma solução não eletrolíticas e de eletrólito 1:1. O aumento no valor da condutividade molar observado nesse estudo em relação ao controle pode ser justificado pelo fato do DMSO ser mais coordenante que o DMF (GEARY, 1971). No caso dos complexos de Ag(I) a ligação entre o íon nitrato e o metal apresenta um forte caráter iônico, por causa disso o seu valor de condutividade molar ficou próximo ao do sal brometo de cetiltrimetilamônio.

Tabela 4 – Dados de condutividade da solução, massa molar e condutividade molar calculada para as tiossemicarbazonas HL1 – HL8 e seus respectivos complexos de Cu(II) (Cu1 – Cu8) e Ag(I) (Ag1 – Ag8)

| Composto                              | Condutividade da solução ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) | Massa molar (g/mol) | Condutividade molar " $\Lambda_M$ " ( $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$ ) |
|---------------------------------------|--|---------------------|---|
| HL1                                   | 1,45   | 281,38              | 0,4   |
| Cu1                                   | 36,2   | 415,83              | 12,5  |
| Ag1                                   | 62,3   | 466,28              | 25,0  |
| HL2                                   | 1,15   | 282,36              | 0,3   |
| Cu2                                   | 69,4   | 416,84              | 23,7  |
| Ag2                                   | 65,7   | 467,27              | 28,4  |
| HL3                                   | 1,82   | 326,37              | 0,5   |
| Cu3                                   | 31,9   | 460,82              | 13,6  |
| Ag3                                   | 68,8   | 496,25              | 28,9  |
| HL4                                   | 1,10   | 326,37              | 0,3   |
| Cu4                                   | 31,4   | 460,82              | 12,5  |
| Ag4                                   | 39,7   | 496,25              | 15,9  |
| HL5                                   | 1,63   | 328,37              | 0,5   |
| Cu5                                   | 68,6   | 461,81              | 25,1  |
| Ag5                                   | 74,1   | 497,23              | 23,6  |
| HL6                                   | 1,85   | 371,37              | 0,6   |
| Cu6                                   | 31,5   | 505,82              | 14,5  |
| Ag6                                   | 51,4   | 541,24              | 23,2  |
| HL7                                   | 2,33   | 369,44              | 0,8   |
| Cu7                                   | 38,6   | 503,89              | 16,8  |
| Ag7                                   | 60,7   | 539,31              | 28,7  |
| HL8                                   | 0,97   | 356,4               | 0,3   |
| Cu8                                   | 36,4   | 490,85              | 15,1  |
| Ag8                                   | 66,1   | 526,27              | 26,4  |
| <b>brometo de cetiltrimetilamônio</b> | 86,4   | 364,45              | 23,9  |

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

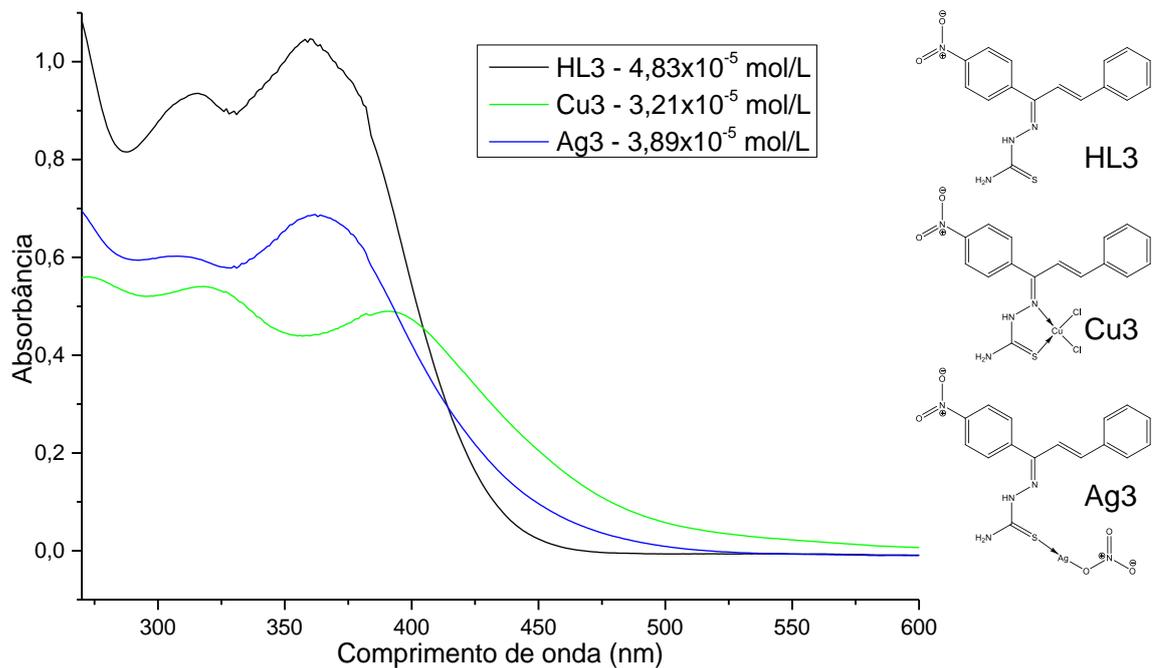
#### 4.1.4 Espectros eletrônicos na região do ultravioleta-visível

A espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta-visível é uma técnica que se baseia na medida da absorção desse tipo de radiação por grupos cromóforos presentes nos compostos. A energia absorvida pode promover a transição eletrônica em compostos orgânicos de elétrons mais externos do seu estado fundamental para o estado excitado e/ou promover transições eletrônicas em metais de transição. Os espectros eletrônicos gerados dessa interação são característicos

dessas moléculas/íons e nos permitem obter informações tanto sobre o tipo de composto como a sua quantidade em uma amostra (MARTINHO, 1994).

Os espectros eletrônicos de todos os compostos estão apresentados no apêndice A. No geral, os espectros das tiossemicarbazonas apresentaram duas bandas, sendo a primeira entre 273 e 315 nm e a segunda entre 348 e 398 nm. Nos espectros dos complexos de Cu(II) foi observado que a segunda banda está deslocada para menores energias (385 a 476 nm), o que pode ser associado a ligação do metal ao nitrogênio imínico. Essa alteração pode ser observada na figura 14 para o composto HL3 e seus complexos. Esse comportamento também foi descrito para Cu2 e Cu5 quando estudados em DMF por Silva e col. (2013). Nos complexos de Ag(I) foi observado apenas um pequeno deslocamento nas bandas, o que apoia que a coordenação do metal a tiossemicarbazona ocorreu apenas através do enxofre.

Figura 14 - Espectros eletrônicos de HL3, Cu3 e Ag3 em dimetilsulfóxido



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

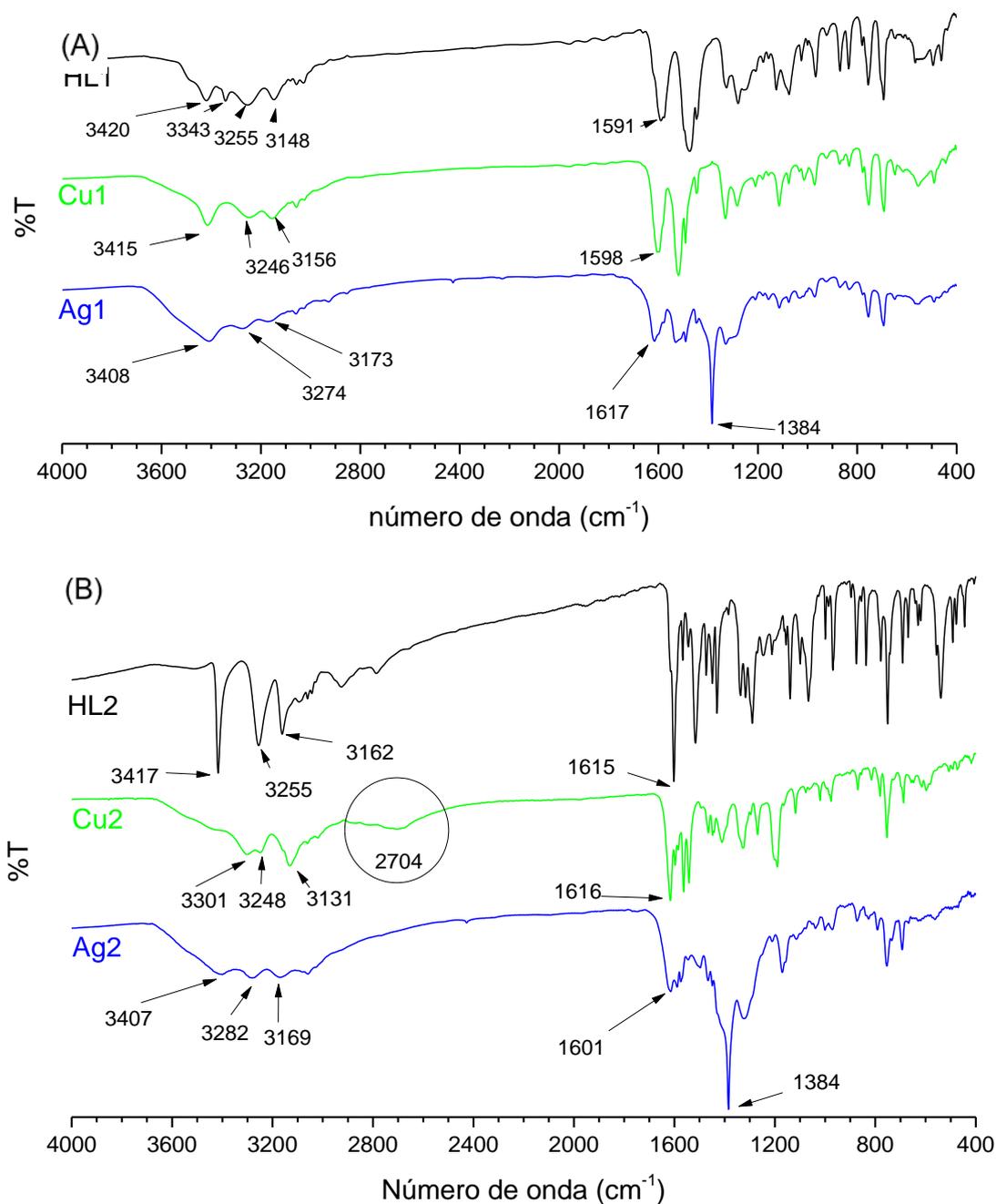
#### 4.1.5 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A radiação eletromagnética na região do infravermelho pode ser absorvida pelas moléculas levando a movimentos vibracionais de arranjo específicos de átomos dentro do composto. Ao se analisar um espectro de absorção gerado pela interação do material com essa radiação será obtida uma curva característica dessas vibrações, permitindo inferir sobre os tipos de ligação ou arranjo de átomo que deram origem a esse movimento. Durante a caracterização de uma nova molécula, a comparação entre os espectros de infravermelho é possível observar se ocorreram alterações como aumento ou redução de bandas, restrição ou intensificação do movimento vibratório que se reflete no espectro na região do infravermelho como deslocamento, redução ou supressão das bandas em relação aos seus precursores. Logo, essa é uma importante ferramenta utilizada para auxiliar na caracterização e identificação de grupos funcionais em compostos orgânicos (FORATO, 2010).

Uma região importante para caracterização das tiossemicarbazonas no espectro de infravermelho é a de  $3100 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ , por ocorrer o aparecimento de bandas associadas aos estiramentos do grupo NH da porção tioamida. Nos espectros de HL1 – HL8 foram observadas no mínimo 3 bandas associadas as ligações N-H, corroborando a formação desses compostos. O aparecimento de mais estiramentos do grupo N-H pode ser justificado pela existência de mais de um isômero configuracional no estado sólido (BERALDO, 2004). Além disso, foi observado a ausência da banda entre  $1650 - 1710 \text{ cm}^{-1}$  associada a carbonila (C=O) presente na chalcona precursora.

Com a coordenação foi observado que os espectros de Cu1, Cu3, Cu4, C6-Cu8 e os complexos de Ag(I) apresentaram apenas três bandas atribuídas ao grupo N-H, sugerindo que nesses complexos o ligante encontra-se protonado. Os complexos Cu2 e Cu5 apresentam comportamento diferente nessa região por apresentarem a presença do grupo piridina protonada (SILVA, 2013), sendo inclusive observado uma nova banda em torno de  $2700$  associada a essa ligação. Nos complexos de Ag(I) foi observado ainda uma banda em  $1384 \text{ cm}^{-1}$  atribuída ao grupo nitrato, indicando a presença dessa espécie no complexo. Na figura 15 estão apresentados espectros de HL1, HL2, Cu1, Cu2, Ag1 e Ag2. Os demais espectros se encontram no Apêndice B.

Figura 15 - Espectros na região do infravermelho de HL1, Cu1 e Ag1 (A) e HL2, Cu2 e Ag2 (B), em pastilhas KBr



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os dados de infravermelho nos permitem sugerir que o composto se encontra coordenado de forma protonada e no caso os complexos de Ag(I) temos a confirmação da presença do grupo nitrato na estrutura do composto.

#### 4.1.6 Análises termogravimétricas

As análises térmicas são métodos analíticos que avaliam as alterações que ocorrem em uma amostra quando submetidas a algum tipo de tratamento térmico em condições controladas. A curva termogravimétrica (curva TG) é obtida pela medida das variações de massa que ocorrem na amostra em função da temperatura ou tempo. Isso permite estudar fenômenos como a decomposição e oxidação, que são intimamente relacionados à estabilidade de compostos e sua composição química (CALDERINI, 2006).

No apêndice C estão apresentados todas as curvas TG dos compostos analisados na faixa de 30 a 900°C, sob atmosfera de ar (vazão 300 mL min<sup>-1</sup>) e taxa de aquecimento de 15 °C min<sup>-1</sup>. As tiossemicarbazonas livres HL1 – HL8 sofrem decomposição em múltiplas etapas na região 200 a 700°C. Não foi observado nenhuma perda de massa abaixo de 200°C, o que caracteriza ausência de moléculas de água ou solvente na estrutura desses compostos.

Com a coordenação ao metal [Cu(II) ou Ag(I)] ocorreu uma significativa mudança no comportamento térmico das amostras. Nos complexos Cu1, Cu3, Cu4, Cu6 e Cu8 foi observado uma perda de massa em torno 4% na região de 30 a 150°C, que pode ser associado a presença de umidade. A presença de moléculas de água já foi observada em outros complexos de Cu(II) com tiossemicarbazonas (EZZAT et al., 2022). Em todos os complexos de Cu(II) foi observado que de 200 a 700°C ocorre uma intensa perda de massa, que pode ser associada a decomposição do ligante e saída dos cloretos. Acima de 700°C foi observado a presença de resíduos nessas amostras, confirmando a presença do metal. Esses metais permanecem na forma de óxido, tendo em vista que a atmosfera utilizada foi de ar.

Nos complexos de Ag(I) foi observado que as amostras começam a se decompor em temperatura abaixo de 200°C, sendo observado uma primeira etapa de decomposição em torno de 150°C, o que pode estar associada a saída do nitrato. Assim como os complexos de Cu(II), foi observado a presença de resíduo acima de 700°C, confirmando a presença do metal.

## 4.2 BIOENSAIOS

A fim de avaliar se a estratégia de modificar as estruturas químicas das tiossemicarbazonas e coordená-las aos metais surtiria efeito sobre a atividade citotóxica, todos esses compostos foram submetidos a avaliação de viabilidade celular utilizando MTT. As células escolhidas para esses experimentos foram macrófagos murinos RAW 264.7 e J774A.1 e células de *A. albopictus* C6/36. Os macrófagos apresentam características interessantes por serem células de mamíferos, apresentarem um crescimento rápido e estarem relacionadas ao sistema imunológico. Já as células de larvas de linhagem contínua de *A. albopictus* apresentam semelhança morfofuncional com as células de *A. aegypti*, são de fácil manutenção e crescimento a temperatura de 28°C.

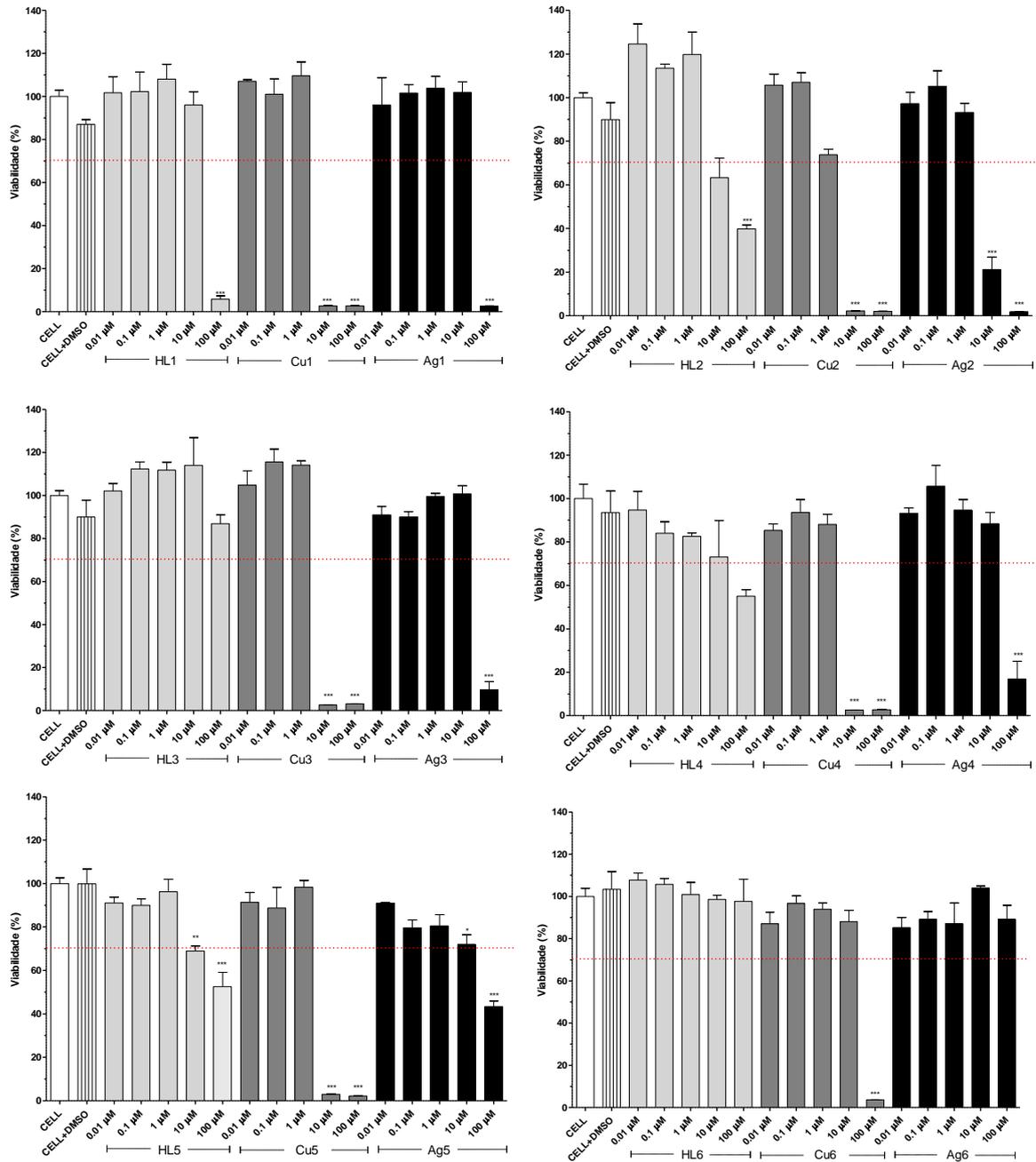
Outro ponto importante do trabalho foi atestar se a estratégia utilizada levou a formação de compostos que apresentam efeito larvicida. Nessa etapa foram realizados testes de sobrevivência em larvas de *A. aegypti* após a exposição por 24 horas aos compostos selecionados tanto na concentração fixa de 10 µM quanto variando essa concentração. Além disso, foi realizado a histologia nas células do intestino médio das larvas de *A. aegypti* após exposição aos compostos selecionados, bem como avaliação de apoptose por marcação positiva de caspase-3.

### 4.2.1 Avaliação da viabilidade celular por MTT

O ensaio de viabilidade de MTT se baseia na atividade metabólica celular por meio do funcionamento adequado da mitocôndria. Quando as células estão viáveis, enzimas presentes nas mitocôndrias convertem o corante de MTT insolúvel, por meio da redução do seu anel tetrazólico, em cristais solúveis de formazan (BAHUGUNA et al., 2017). Dessa forma podemos inferir, de forma indireta, que quanto mais formazan produzido, maior a quantidade de células vivas.

Nas figuras 16 a 19 estão apresentados os resultados da avaliação do potencial citotóxico das tiossemicarbazonas e seus complexos frente a linhagens celulares de macrófagos murinos RAW 264.7 e J774A.1.

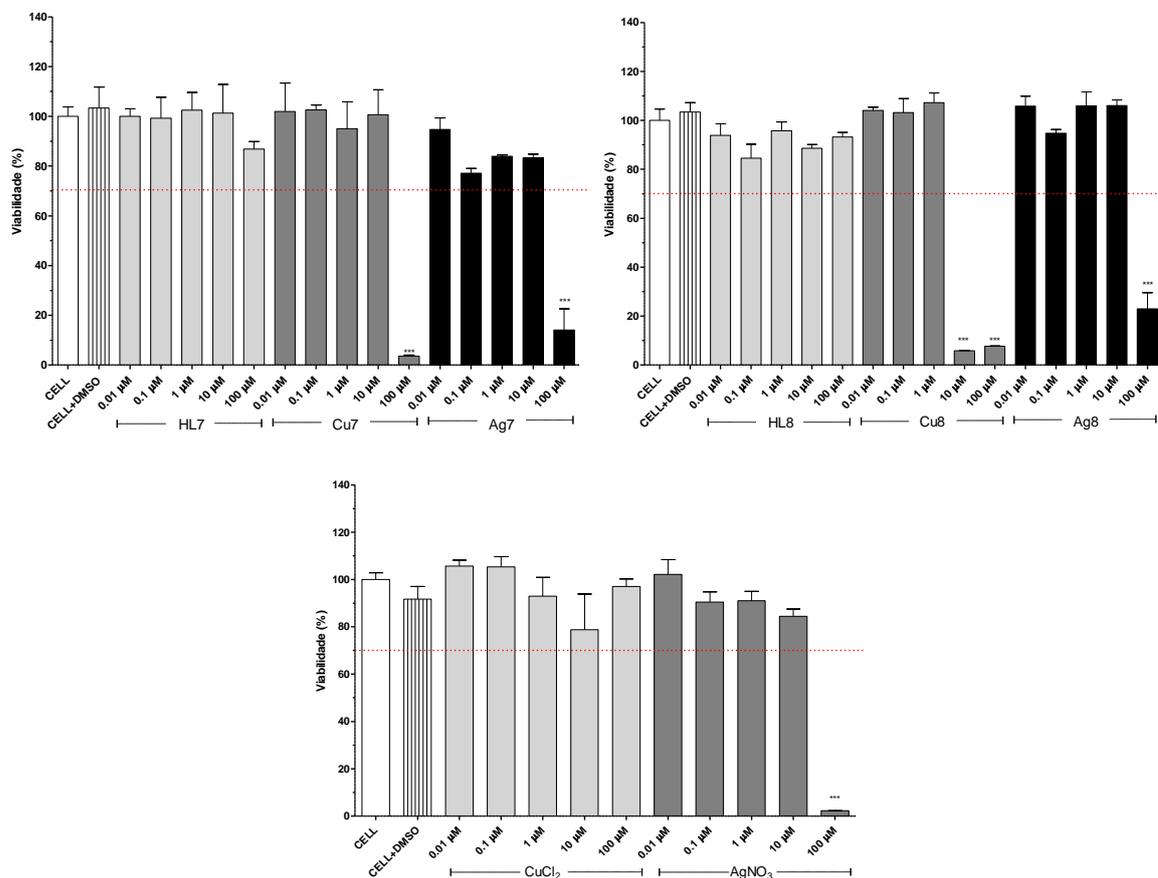
Figura 16 – Avaliação da viabilidade celular das tiossemicarbazonas HL1 a HL6 e seus complexos de Cu(II) e Ag(I) em macrófagos RAW 264.7 após 48 horas de cultura



Legenda: \*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,0001 frente ao controle DMSO.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

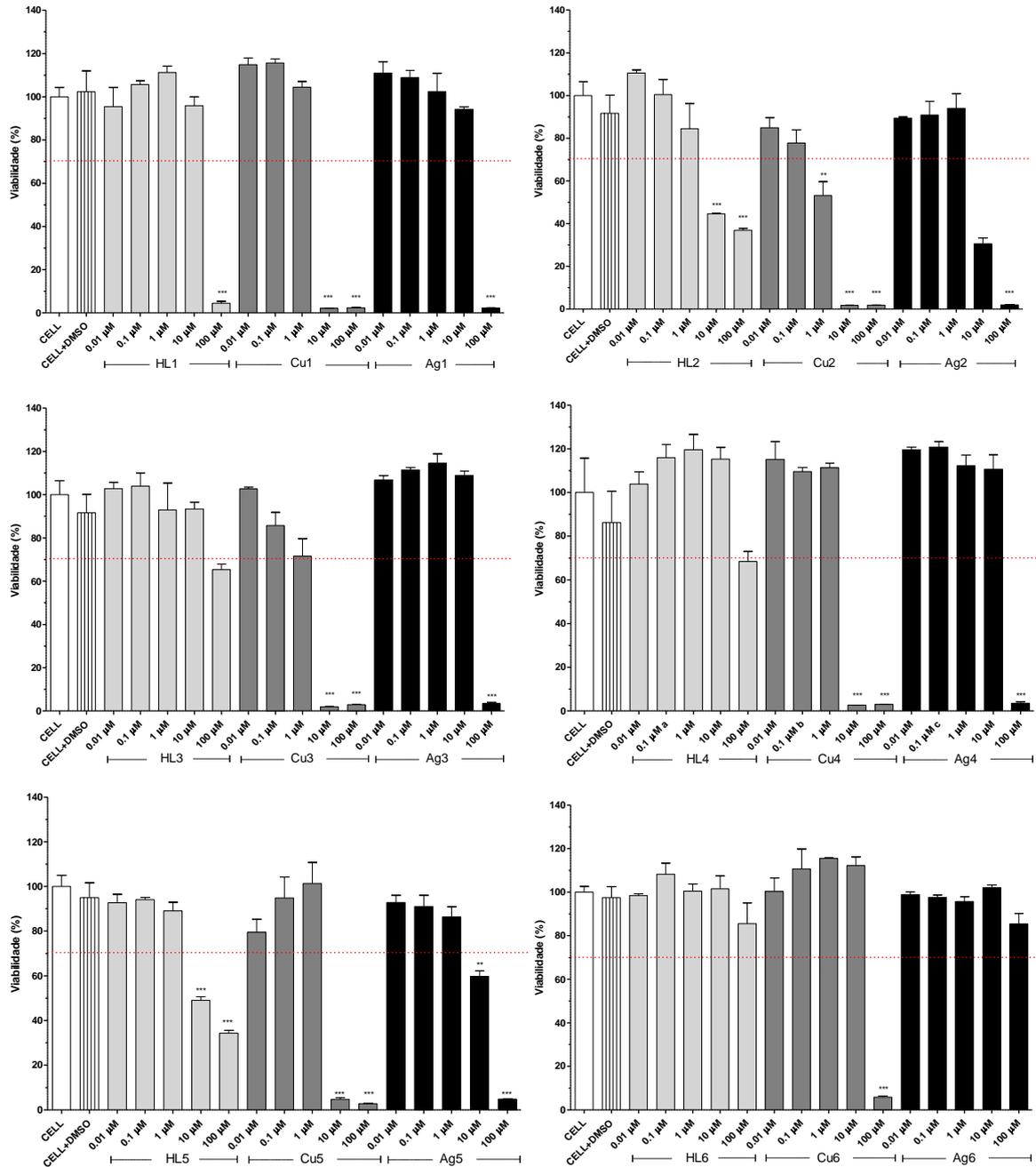
Figura 17 – Avaliação da viabilidade celular das tiossemicarbazonas HL7 e HL8, seus complexos de Cu(II) e Ag(I) e os sais  $\text{CuCl}_2$  e  $\text{AgNO}_3$  em macrófagos RAW 264.7 após 48 horas de cultura



Legenda: \*\*\* p < 0,0001 frente ao controle DMSO.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

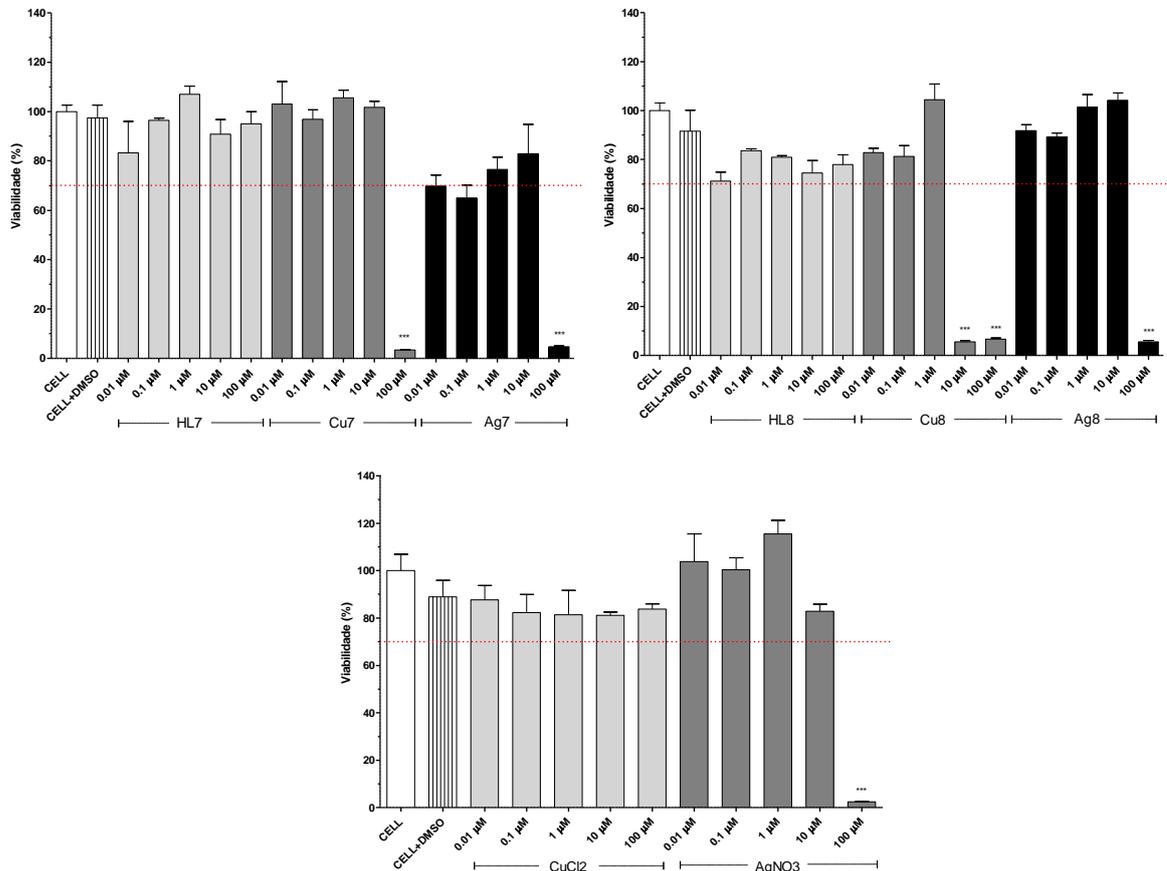
Figura 18 – Avaliação da viabilidade celular das tiossemicarbazonas HL1 a HL6 e seus complexos de Cu(II) e Ag(I) em macrófagos J774A.1 após 48 horas de cultura



Legenda: \*\*\* p < 0,0001 frente ao controle DMSO.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 19 – Avaliação da viabilidade celular das tiossemicarbazonas HL7 e HL8, seus complexos de Cu(II) e Ag(I) e os sais  $\text{CuCl}_2$  e  $\text{AgNO}_3$  em macrófagos J774A.1 após 48 horas de cultura



Legenda: \*\*\*  $p < 0,0001$  frente ao controle DMSO.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Em relação as tiossemicarbazonas, foi observado que algumas delas reduziram a viabilidade celular a menos de 70%, tanto para os macrófagos RAW quanto para J774 A.1. Esse efeito foi observado para HL1 (100  $\mu\text{M}$ ), HL2 ( $\geq 10$   $\mu\text{M}$ ), HL4 (100  $\mu\text{M}$ ) e HL5 (100  $\mu\text{M}$ ) nas células RAW e para HL1 (100  $\mu\text{M}$ ), HL2 ( $\geq 10$   $\mu\text{M}$ ), HL3 (100  $\mu\text{M}$ ) e HL5 ( $\geq 10$   $\mu\text{M}$ ) nas células J774 A.1. Segundo a ISO10993-5 (2009), os compostos que apresentam este comportamento são considerados potenciais agentes citotóxicos.

Os complexos também apresentaram uma redução na viabilidade celular a menos de 70% nas concentrações maiores, contudo essa redução foi mais significativa para os complexos de Cu(II). Nesse caso, a coordenação ao Cu(II) tornou

os compostos até 10x mais ativos que seus ligantes livres (HL1 – HL8). Esse efeito foi observado para Cu1 ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ), Cu2 ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ), Cu3 ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ), Cu4 ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ), Cu5 ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ), Cu6 (100  $\mu\text{M}$ ), Cu7 (100  $\mu\text{M}$ ) e Cu8 ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ) tanto nas células RAW quanto nas células J774 A.1. Isso não ocorreu para a maioria dos complexos de Ag(I), pois não apresentaram citotoxicidade superior à dos ligantes livres (HL1 – HL8) ou ao sal  $\text{AgNO}_3$ .

É importante ressaltar que o sal de Cu(II) não reduziu significativamente a viabilidade celular nas linhagens testadas, enquanto que o sal de Ag(I) apresentou redução da viabilidade na concentração de 100  $\mu\text{M}$  em ambas linhagens celulares.

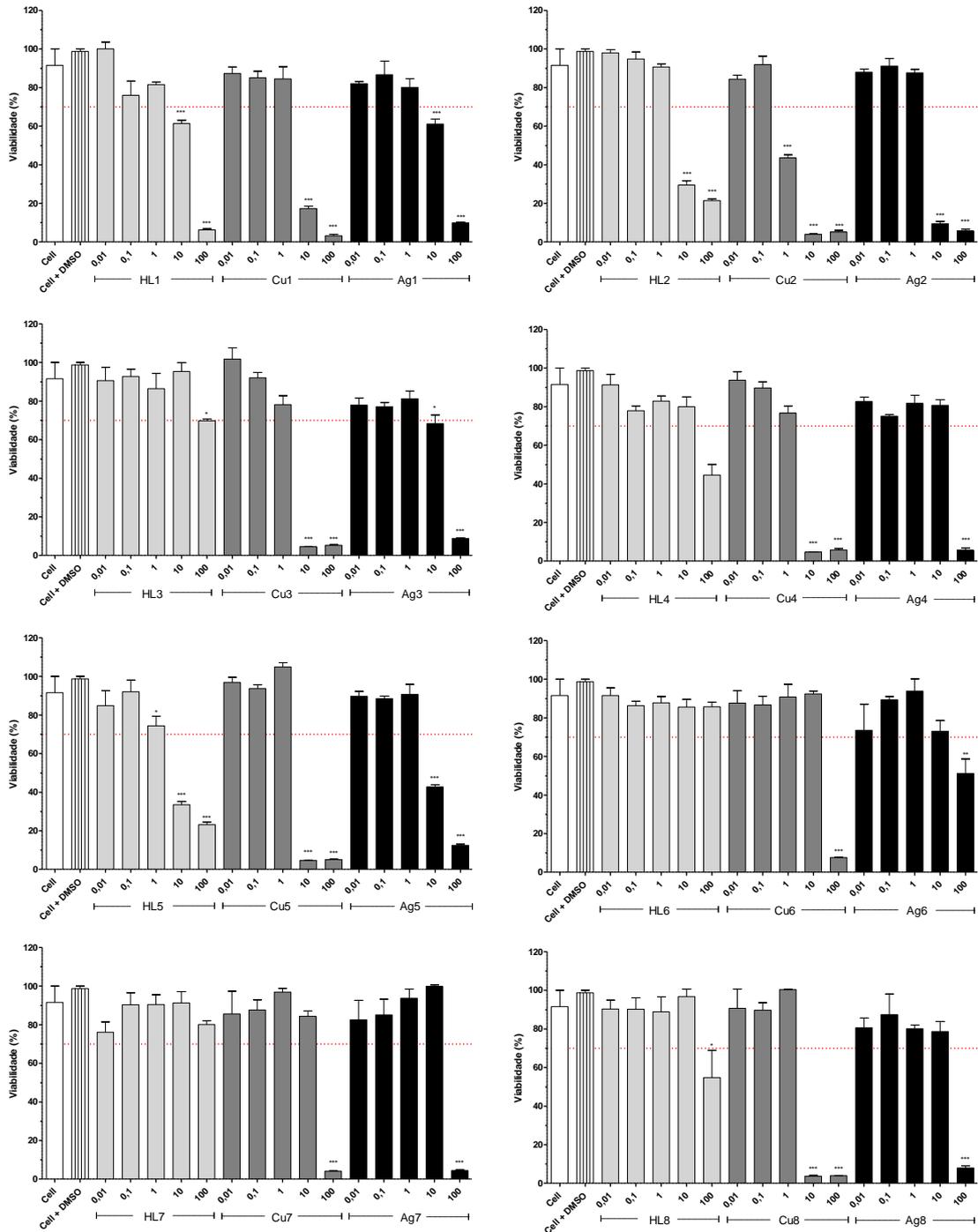
Esses dados demonstram que complexos de Cu(II) com tiossemicarbazonas apresentam potencial de aumentar atividade citotóxica, como demonstrado por Park e col. (2016). Em outro estudo, os complexos de Cu(II) sintetizados foram mais ativos que seus respectivos ligantes quando testaram derivados de tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II) e Zn(II) nas concentrações de 10, 25, 50, 100 e 200 mg/mL em células de linfoma de Dalton (MATHEWS, et al., 2020).

O efeito observado para o Cu2 pode estar relacionado ao mesmo encontrado contra linhagens de células leucêmicas HL-60 (leucemia mieloide) e Jurkat (leucemia linfóide) e de tumor sólido MDA-MB 231 (carcinoma mamário) e HCT-116 (carcinoma colorretal), sendo possivelmente um deles a capacidade de interagir com o DNA (SILVA et al., 2013). Outra hipótese é a inibição da topoisomerase, através da interação com o sítio ativo da enzima como foi observado quando ocorreu a complexação do Cu(II) com a tiossemicarbazona (VUTEY et al., 2016), ou a apoptose (KOTIAN et al., 2021).

No caso da Ag(I), apesar do metal apresentar efeito citotóxico, a complexação não melhorou a atividade. Isso pode ser justificado pelo fato da ligação do metal a tiossemicarbazona ocorrer apenas pelo átomo de enxofre. Durante o experimento pode ter ocorrido uma quebra do complexo e tanto o ligante como o metal passariam a atuar de forma independente sobre as células e não como uma entidade.

Na figura 20 e 21 estão apresentados os resultados da avaliação do potencial citotóxico das tiossemicarbazonas e seus complexos frente a linhagem celular de *A. albopictus* C6/36.

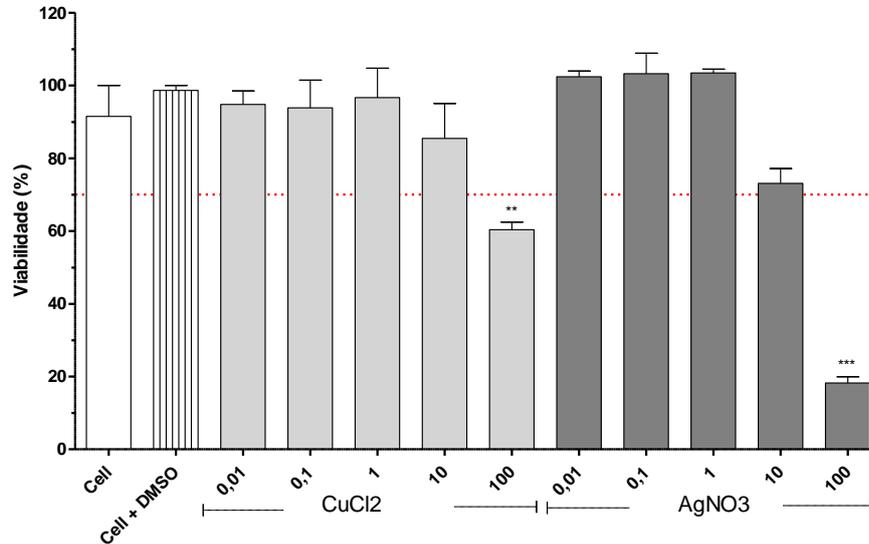
Figura 20 – Avaliação da viabilidade celular das tiossemicarbazonas HL1 a HL8 e seus complexos de Cu(II) e Ag(I) em células de *Aedes albopictus* C6/36 após 48 horas de cultura



Legenda: \* p < 0,05; \*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,0001 frente ao controle DMSO.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 21 – Avaliação da viabilidade celular dos sais  $\text{CuCl}_2$  e  $\text{AgNO}_3$  em células de *Aedes albopictus* C6/36 após 48 horas de cultura



Legenda: \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$  frente ao controle DMSO.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Esses resultados foram semelhantes ao comportamento encontrado nas células de macrófagos murinos. Os complexos de  $\text{Cu(II)}$  novamente apresentaram uma maior redução da viabilidade celular quando comparada às tiossemicarbazonas livres HL1 – HL8 e complexos de  $\text{Ag(I)}$  correspondentes.

Esse comportamento se torna ainda mais evidente quando são estimados os valores da concentração necessária dos compostos para inibir 50% da viabilidade celular ( $\text{CI}_{50}$ ). Na tabela 5 estão apresentados os valores obtidos de  $\text{CI}_{50}$  frente aos macrófagos murinos RAW 264.7 e J774A.1 e células de *A. Albopictus* C6/36.

A partir da análise desses dados foi observado que os complexos de  $\text{Cu(II)}$  novamente apresentaram valores calculados de  $\text{CI}_{50}$  cerca de 10 vezes menores que seus respectivos ligantes e o seu sal ( $\text{CuCl}_2$ ) não apresentou  $\text{CI}_{50}$  em concentrações menores que  $100 \mu\text{M}$ . Já nos complexos de  $\text{Ag(I)}$  foi observado que a maioria dos valores de  $\text{CI}_{50}$  não apresentaram uma redução significativa em relação aos seus respectivos ligantes livres além da maioria desses valores serem maiores do que o apresentado pelo sal  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CI}_{50}$  em torno de  $26 \mu\text{M}$ , nas linhagens celulares testadas.

Tabela 5 – Valores calculados de concentração dos compostos testados necessário para inibir a viabilidade em 50% das células ( $CI_{50}$ ) de macrófagos murinos RAW 264.7 e J774A.1 e *Aedes albopictus* C6/36 após 48 horas de tratamento

| Composto          | $CI_{50}$ ( $\mu M$ ) |          |       |
|-------------------|-----------------------|----------|-------|
|                   | RAW 264.7             | J774 A.1 | C6/36 |
| HL1               | 32,4                  | 31,6     | 15,8  |
| Cu1               | 3,60                  | 3,36     | 3,27  |
| Ag1               | 33,9                  | 29,7     | 4,63  |
| HL2               | 37,1                  | 7,36     | 16,5  |
| Cu2               | 2,16                  | 1,15     | 0,734 |
| Ag2               | 4,17                  | 4,88     | 3,02  |
| HL3               | >100                  | >100     | >100  |
| Cu3               | 3,81                  | 2,02     | 2,42  |
| Ag3               | 37,4                  | 34,8     | 20,4  |
| HL4               | >100                  | >100     | 70,5  |
| Cu4               | 2,78                  | 3,61     | 2,35  |
| Ag4               | 34,5                  | 36,8     | 25,4  |
| HL5               | >100                  | 9,65     | 3,97  |
| Cu5               | 3,13                  | 3,40     | 3,51  |
| Ag5               | 59,7                  | 14,8     | 7,04  |
| HL6               | >100                  | >100     | >100  |
| Cu6               | 28,5                  | 38,1     | 31,6  |
| Ag6               | >100                  | >100     | >100  |
| HL7               | >100                  | >100     | >100  |
| Cu7               | 33,5                  | 32,4     | 26,8  |
| Ag7               | 30,2                  | 26,0     | 33,2  |
| HL8               | >100                  | >100     | >100  |
| Cu8               | 4,43                  | 3,57     | 3,31  |
| Ag8               | 52,7                  | 35,1     | 25,5  |
| CuCl <sub>2</sub> | >100                  | >100     | >100  |
| AgNO <sub>3</sub> | 26,4                  | 25,4     | 26,4  |

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

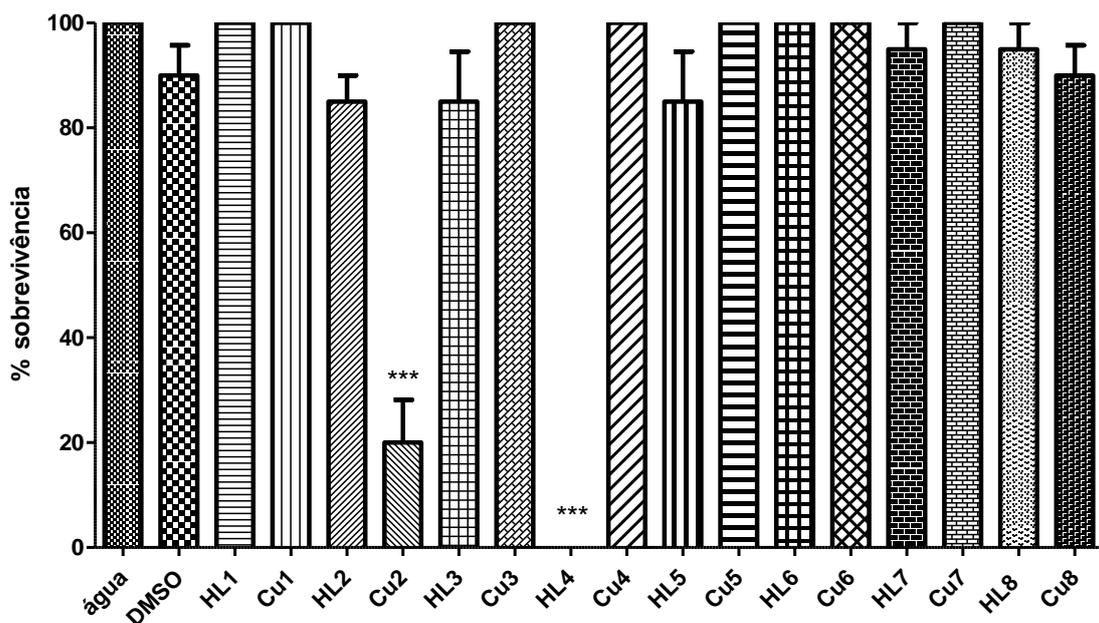
A comparação entre os resultados nos permitem inferir que a complexação das tiossemicarbazonas ao Cu(II) leva a uma melhora da atividade citotóxica e esse efeito pode ser observado da mesma maneira nas células de *A. albopictus*.

#### 4.2.2 Ensaio de sobrevivência

Considerando os resultados do bioensaio anterior, foi realizado o ensaio de sobrevivência apenas utilizando as tiossemicarbazonas e os complexos de Cu(II), pois os complexos de Ag(I) não apresentaram melhora significativa da atividade citotóxica em relação ao seu ligante correspondente, além do sal de Ag(I) ter uma significativa redução da viabilidade celular nas linhagens testadas.

Esse estudo foi iniciado utilizando como referência uma concentração fixa para os compostos de 10  $\mu\text{M}$ , pois a mesma é próxima a dose de temefós (6,4  $\mu\text{M}$ ) e spinosad (15,5  $\mu\text{M}$ ) necessária para promover a morte de 50% das larvas de *A. aegypti* (Rockefeller) no estágio L3 (DIAS et al., 2017). Esse ensaio avalia tanto a sobrevivências das larvas após 24 h de exposição aos compostos (Figura 22) quanto a sobrevivência dos indivíduos após essa exposição (Figuras 23 e 24). O tempo de monitoramento foi de 12 dias, onde foi esperado a transição completa do estágio larval até a fase adulta.

Figura 22 – Avaliação da sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* após 24 h de exposição às tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II) na concentração de 10  $\mu\text{M}$



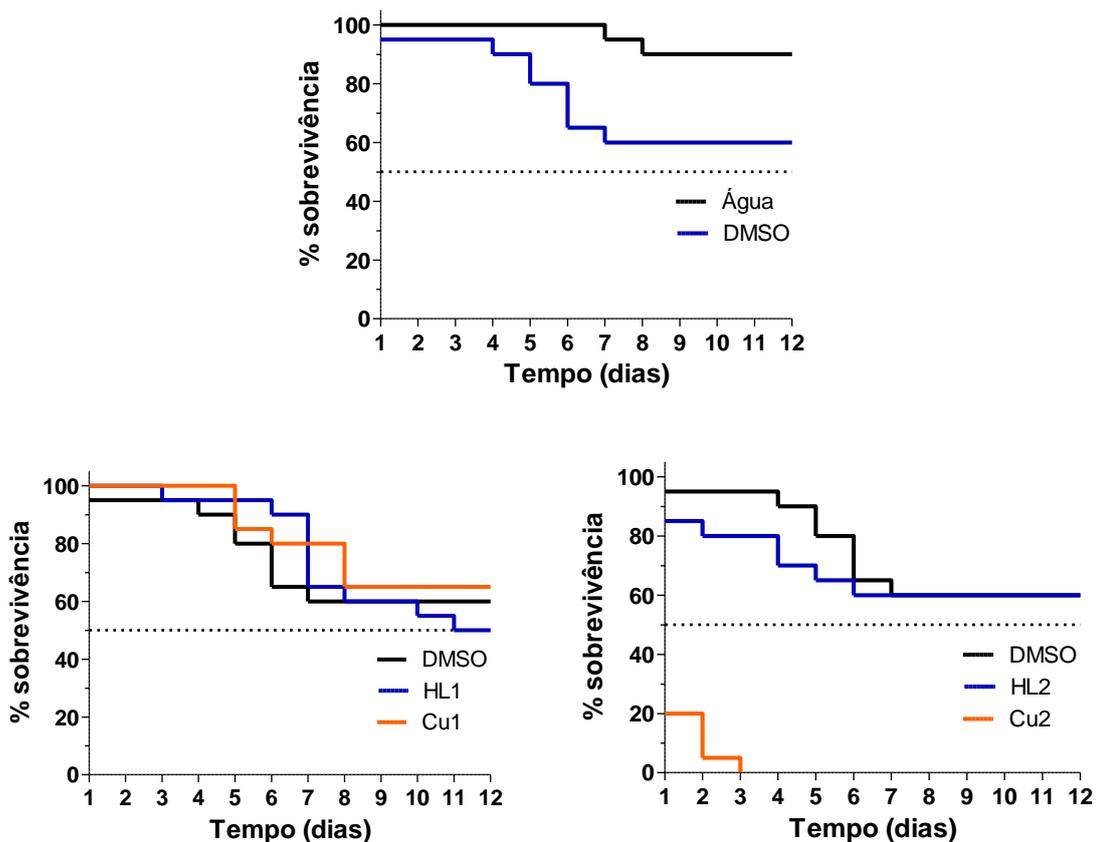
Legenda: \*\*\*  $p < 0,0001$  frente ao controle DMSO.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os compostos Cu2 e HL4 foram ativos e significativamente diferentes do controle DMSO. Esse efeito é característico de compostos que possuem efeito agudo, caso do temefós (ANDRANDE; MODOLO, 1991). Esses resultados são equivalentes ao encontrado por Siqueira e col. (2021) quando avaliaram ramnolipídeos em *A. aegypti*.

Ao compararmos os dados da figura 22 com os encontrados nos experimentos de viabilidade celular frente a células de *A. albopictus*, foi observado que o aumento da atividade citotóxica com a complexação não levou a um aumento da atividade larvídica do complexo em relação às tiossemicarbazonas livres. Comportamento que foi evidente no caso de HL4 e Cu4. Os dados *in vitro* não serem equivalentes aos dados *in vivo* não é algo incomum, pois em um indivíduo temos diversos mecanismos envolvidos relacionados a absorção, distribuição, metabolismo e excreção que podem influenciar nos efeitos tóxicos a serem observados para o composto, além da estabilidade do mesmo no meio biológico.

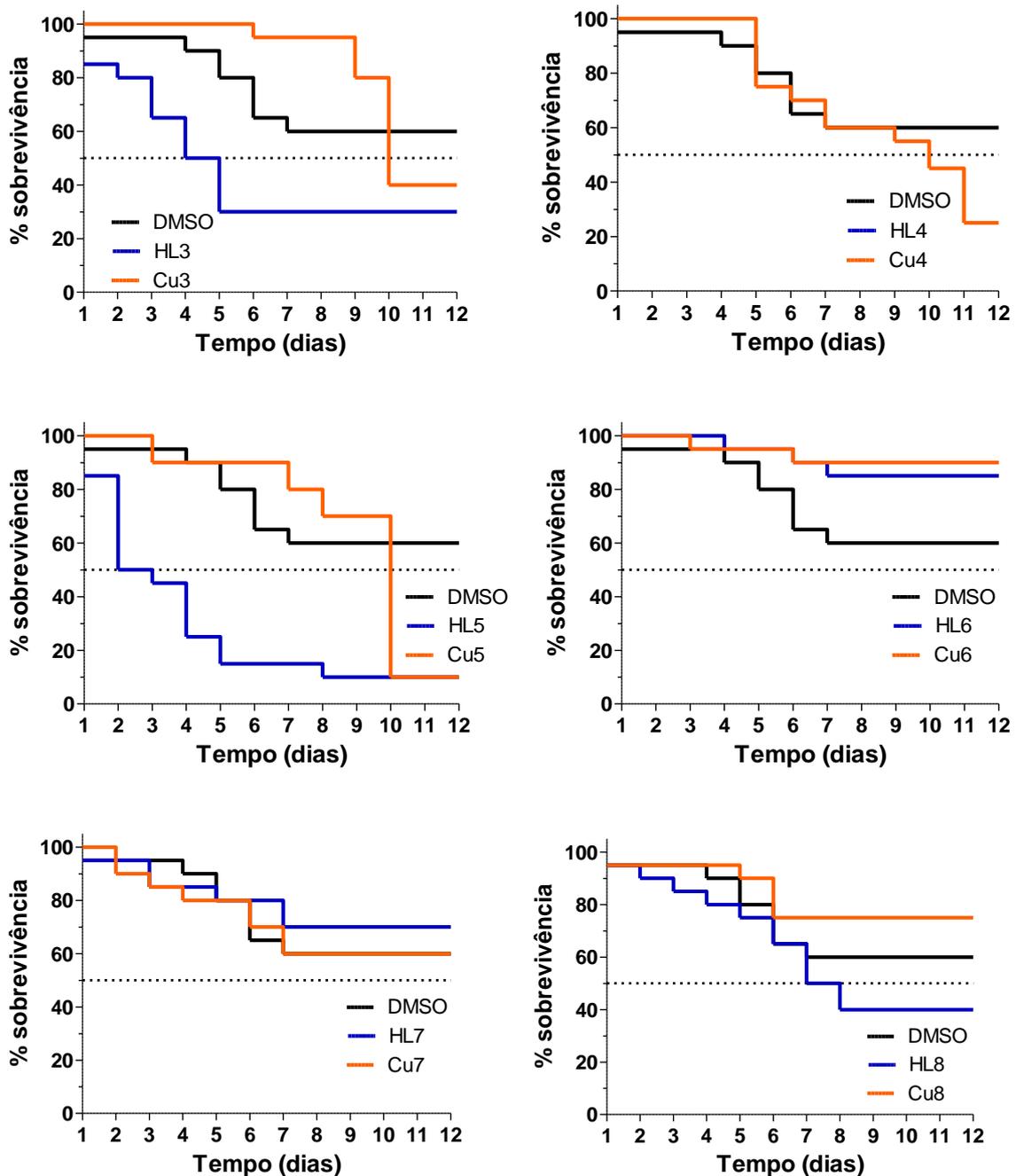
Figura 23 - Sobrevivência das larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas (controles água e DMSO) às tiossemicarbazonas HL1 e HL2 e seus complexos de Cu(II) (Cu1 e Cu2) na concentração de 10  $\mu\text{M}$



Legenda: A linha pontilhada indica a mediana para a sobrevivência de 50% dos indivíduos após o tratamento.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 24 - Sobrevivência das larvas de *Aedes aegypti* expostas às tiossemicarbazonas HL3 – HL8 e seus complexos de Cu(II) (Cu3 – Cu8) na concentração de 10  $\mu$ M



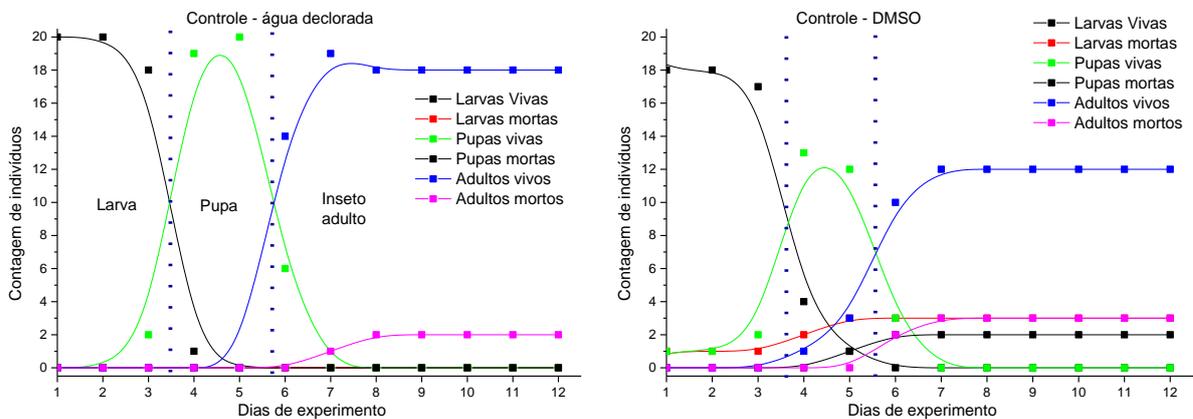
Legenda: A linha pontilhada indica a mediana para a sobrevivência de 50% dos indivíduos após o tratamento.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Nesse experimento o controle DMSO apresentou uma significativa variação em relação ao controle água ( $p=0,0212$  pelo método de Log-Rank), contudo a curva não

atingiu a sua mediana de sobrevivência antes da completa metamorfose dos indivíduos. Além disso, quando monitorado o estágio de desenvolvimento e a viabilidade dos indivíduos a cada dia para os grupos controle (Figura 25), não foi observado uma relevante alteração dos tempos médios da ecdise larva para pupa e pupa para inseto adulto. Os valores típicos encontrados na literatura para ecdise, em condições favoráveis, são de até cinco dias para mudança entre o estágio larval e pupa e até dois dias para a mudança entre o estágio de pupa para inseto adulto (FOSTER & WALKER, 2019).

Figura 25 – Curva dos estágios de desenvolvimento de *Aedes aegypti* em função do tempo de exposição aos grupos controle (água dechlorada e DMSO)



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Considerando os dados foi observado dois tipos de comportamento. Um semelhante ao grupo controle DMSO, onde o  $p > 0,05$  para o estudo de similaridade das curvas pelo método Log-Rank (Tabela 6) e/ou ocorre um aumento da mortalidade com o tempo sem atingir a mediana de sobrevivência durante o tempo total do experimento, caso dos compostos HL1, Cu1, HL2, Cu3, Cu4, Cu5, HL6, Cu6, HL7, Cu7, HL8 e Cu8. Nessa situação, também não foi observada uma significativa mudança dos períodos relacionados a ecdises larva para pupa e pupa para inseto adulto (ver apêndice D). O outro comportamento é aquele observado para HL3 e HL5, onde o  $p < 0,05$  e é atingida a mediana de sobrevivência durante o tempo total do experimento, o que evidencia que a exposição ao composto de fato leva a manifestação de efeitos tóxicos ao longo do tempo. Os dados para esses ligantes

(HL3 e HL5) nesta análise se contrapõe à tendência observada nos estudos da citotoxicidade nas células de *A. albopictus*.

As informações obtidas para Cu2 e HL4 são reflexos de apresentarem um significativo efeito larvicida nas primeiras 24h. Nessa situação, também não foi possível avaliar se esse efeito tóxico observado nas larvas com o tempo, altera ou não a mudança dos períodos relacionados a ecdises larva para pupa e pupa para inseto adulto.

Tabela 6 – Dados estatísticos da análise do estimador de Kaplan-Meier obtidos a partir das curvas de sobrevivência dos compostos testados após 24 h de exposição das larvas de *Aedes aegypti* ao tratamento

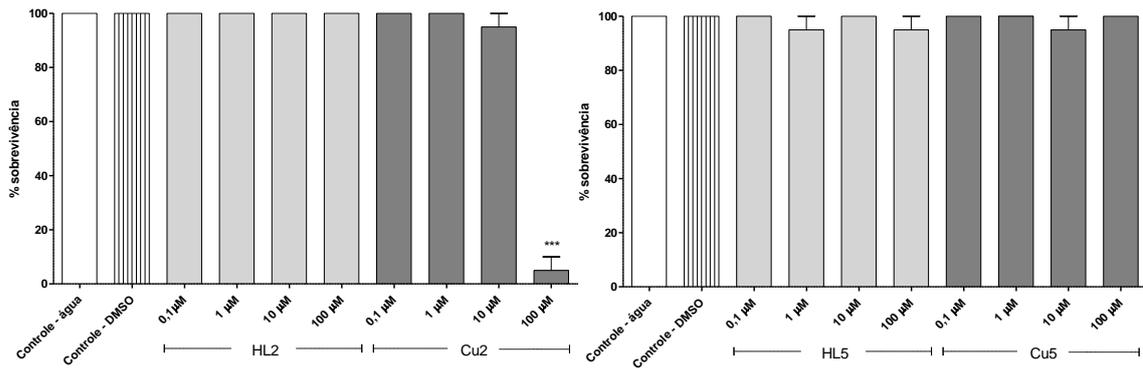
| Composto | Parâmetros estatísticos após estudo da similaridade das curvas pelo método Log-Rank |    |          |        |                                 |
|----------|---|----|----------|--------|---------------------------------|
|          | $\chi^2$  | df | p        | p<0,05 | Mediana de sobrevivência (dias) |
| HL1      | 0,02289   | 1  | 0,8798   | não    | 11,5                            |
| Cu1      | 0,2737  | 1  | 0,6008   | não    | -                               |
| HL2      | 0,08812   | 1  | 0,7666   | não    | -                               |
| Cu2      | 40,54   | 1  | < 0,0001 | sim    | 1                               |
| HL3      | 5,974   | 1  | 0,0145   | sim    | 4,5                             |
| Cu3      | 0,1182  | 1  | 0,7310   | não    | 10                              |
| HL4      | 35,29   | 1  | < 0,0001 | sim    | 1                               |
| Cu4      | 2,594   | 1  | 0,1073   | não    | 10                              |
| HL5      | 17,00   | 1  | < 0,0001 | sim    | 2,5                             |
| Cu5      | 3,287   | 1  | 0,0698   | não    | 10                              |
| HL6      | 3,204   | 1  | 0,0734   | não    | -                               |
| Cu6      | 4,545   | 1  | 0,0330   | sim    | -                               |
| HL7      | 0,3544  | 1  | 0,5516   | não    | -                               |
| Cu7      | 0,0005840   | 1  | 0,9807   | não    | -                               |
| HL8      | 1,177   | 1  | 0,2780   | não    | 7,5                             |
| Cu8      | 1,037   | 1  | 0,3085   | não    | -                               |

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Outro estudo realizado foi para verificar o efeito das concentrações sobre a atividade larvicida. Os compostos selecionados foram HL2, Cu2, HL5 e Cu5, pois o Cu2 apresentou atividade larvicida na concentração de 10  $\mu$ M e como a diferença entre os ligantes HL2 e HL5 foi a inserção do grupo nitro, seria interessante seu estudo para verificar se isso teria efeito sobre essa atividade. Além disso, HL5 na concentração de 10 mM atingiu a mediana de sobrevivência aos 2,5 dias após a exposição. Foi avaliada a sobrevivência das larvas após 24 h de exposição aos

compostos nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$  (Figura 26) e a sobrevivência desses indivíduos com o tempo após essa exposição (Figura 27).

Figura 26 – Avaliação da sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* após 24 h de exposição de tiossemicarbazonas (HL2 e HL5) e seus complexos de Cu(II) (Cu2 e Cu5) variando a concentração de 0,1 a 100  $\mu\text{M}$



Legenda: \*\*\*  $p < 0,0001$  frente ao controle DMSO.

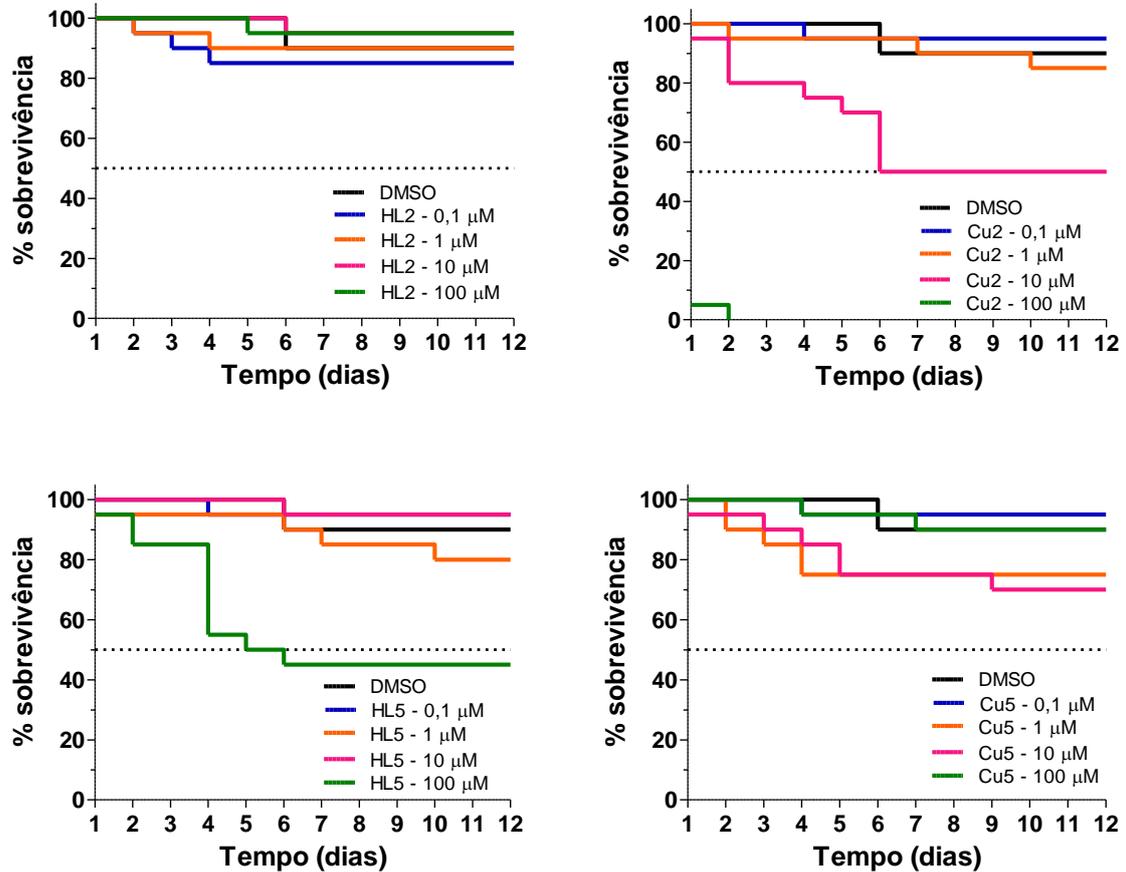
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Como esperado, Cu2 apresentou um comportamento para a atividade larvicida dose-dependente. No entanto, os demais compostos não foram ativos nas concentrações analisadas. Cu2 não apresentou atividade larvicida significativa na concentração de 10  $\mu\text{M}$  neste experimento, o que foi diferente do observado para o experimento anterior.

Nesse experimento o controle DMSO não apresentou significativa variação em relação ao controle água ( $p = 0,9474$  pelo método de Log-Rank), diferente do que foi observado no experimento na concentração de 10  $\mu\text{M}$ .

HL2 e Cu5 não apresentaram significativa variação de seu comportamento em relação ao controle DMSO ( $p > 0,05$ ) em nenhuma das concentrações avaliadas, o que demonstra que a exposição por 24h a esses compostos não levou a manifestação de efeitos tóxicos nos indivíduos. Os dados estatísticos dos compostos que apresentaram alterações significativas estão apresentados na Tabela 7.

Figura 27 - Sobrevivência das larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas (DMSO) às tiossemicarbazonas HL2 e HL5 e seus complexos de Cu(II) nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$



Legenda: A linha pontilhada indica a mediana para a sobrevivência de 50% dos indivíduos após o tratamento.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 7 – Dados estatísticos da análise do estimador de Kaplan-Meier obtidos a partir das curvas de sobrevivência dos compostos Cu2 e HL5 após 24h de exposição das larvas de *Aedes aegypti* ao tratamento

| Composto                | Parâmetros estatísticos após estudo da similaridade das curvas pelo método Log-Rank |    |          |        |                                 |
|-------------------------|---|----|----------|--------|---------------------------------|
|                         | $\chi^2$  | df | p        | p<0,05 | Mediana de sobrevivência (dias) |
| Cu2 – 10 $\mu\text{M}$  | 8,209   | 1  | 0,0042   | sim    | 9                               |
| Cu2 – 100 $\mu\text{M}$ | 41,97   | 1  | < 0,0001 | sim    | 1                               |
| HL5 – 100 $\mu\text{M}$ | 10,22   | 1  | 0,0014   | sim    | 5,5                             |

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 4.2.3 Histologia do intestino médio das larvas de *A. aegypti*

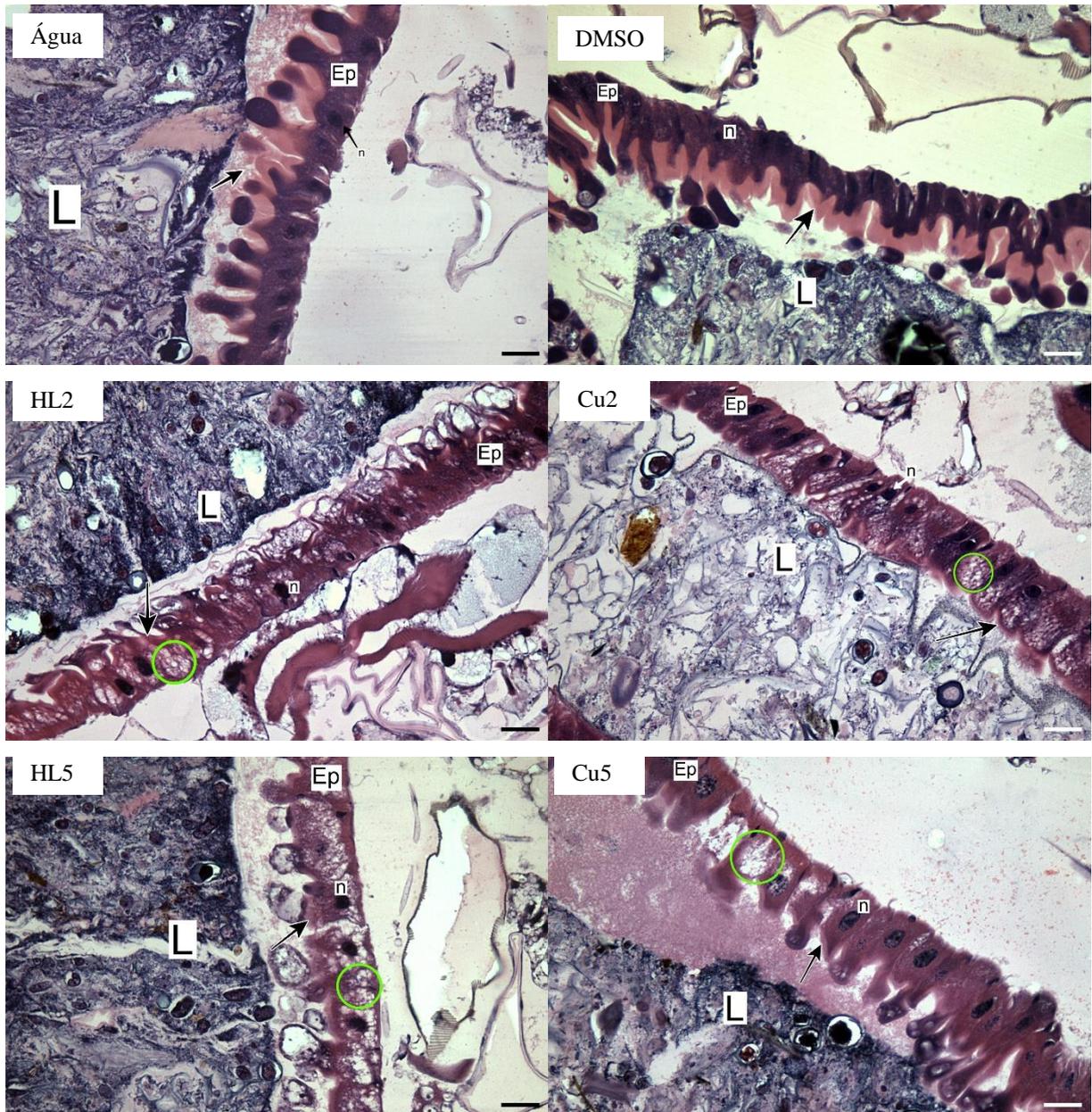
O intestino médio larval de *A. aegypti* é formado por um epitélio simples com células colunares, núcleos evidentes e borda estriada bem desenvolvida. Essa estrutura é o principal alvo de substâncias tóxicas, químicas e biológicas, sendo importante para avaliar se o composto apresenta atividade citotóxica (VALOTTO et al., 2011). Na Figura 28 estão apresentados os cortes histológicos do intestino médio das larvas de *A. aegypti* no estágio L4 que sobreviveram após 24 horas de exposição às tiossemicarbazonas HL2 e HL5 e seus complexos Cu2 e Cu5 na concentração de 10  $\mu$ M. Como controle foram utilizados novamente a água e o DMSO.

Nos grupos controle, foi observada a presença das células colunares com seus núcleos evidentes e a presença da borda estriada bem definida. Após o tratamento tanto com os ligantes (HL2 e HL5) quanto os complexos (Cu2 e Cu5) foi observado nas imagens uma descontinuidade na borda estriada ou sua ausência, o aumento de vacúolos citoplasmático nas células do intestino médio e consequente desorganização da camada epitelial. Contudo, em nenhuma das imagens foi observado a ruptura do epitélio. É importante destacar que todos esses compostos promoveram uma significativa redução da viabilidade celular na concentração de 10  $\mu$ M quando testados em células de *A. albopictus* C6/36.

Esses resultados demonstram que as tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II) promovem um efeito citotóxico, alterando a morfologia das células do intestino médio das larvas, o que pode causar prejuízo na absorção de nutrientes e até mesmo a morte das larvas. Isso poderia ainda justificar o aumento da mortalidade com o passar do tempo mesmo após ter cessado o contato com o agente tóxico.

Ao compararmos os dados obtidos neste trabalho com aqueles de Valotto e col. (2011), avaliando a toxicidade de um tanino isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* em larvas no estágio L3 de *A. aegypti*, podemos sugerir que as alterações observadas evidenciam que as tiossemicarbazonas ou complexos de Cu(II) podem levar ao processo de degeneração celular e aceleração do processo de lise das células epiteliais. Essas alterações também foram encontradas em larvas tratadas com borra de café e cafeína (Miranda et al., 2021)

Figura 28 - Histologia do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas aos compostos selecionados por 24 h



Legenda: Ep: epitélio; L: lúmen; Seta: borda estriada; Círculo: vacúolos. Coloração por hematoxilina e eosina (HE). Barras de escala: 25  $\mu$ m.

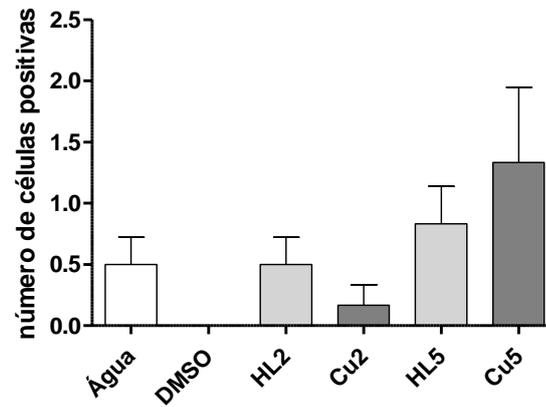
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### **4.2.4 Análise da imunofluorescência de caspase-3 em células do intestino médio de larvas de *A. aegypti***

O ensaio de imunofluorescência foi realizado a fim de verificar se os danos causados às células do intestino médio das larvas após 24 h de exposição aos compostos HL2, HL5, Cu2 e Cu5 estariam relacionados ao mecanismo de ativação de caspase-3. Contudo, não foi observada uma diferença significativa no número de células positivas entre os grupos controles e tratados (Figura 29). A ausência de marcação também foi observada no estudo de Grossi (2018) com tiossemicarbazonas derivadas de benzaldeído, acetofenona e benzofenona. Esse resultado é diferente daquele encontrado por Miranda e colaboradores (2021) que ao utilizar o mesmo modelo para o estudo da toxicidade da borra de café e da cafeína sobre larvas de *A. aegypti*, observaram que tratamento com borra de café (CCG), cafeína e borra de café descafeinada (DCG) levaram a uma marcação significativa de células positivas em relação ao grupo controle, com número de células positivas de  $46,20 \pm 9,94$  para CCG,  $22,00 \pm 2,45$  para cafeína e  $14,00 \pm 2,92$  para DCG.

Considerando que foram observados danos às células do intestino no experimento anterior e a ausência de marcação neste experimento de imunofluorescência, é possível sugerir que a morte celular causadas pela ação de tiossemicarbazonas e seus complexos não deve ocorrer por mecanismo de apoptose via caspase-3.

Figura 29 – Número de células positivas para caspase-3 marcadas após a exposição dos intestinos médios das larvas de *Aedes aegypti* aos grupos controle (água e DMSO 1% v/v) e compostos selecionados. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SE



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos permitem observar a citotoxicidade dos compostos sintetizados tanto contra macrófagos murinos (RAW 264.7 e J774A.1) quanto em células de *A. albopictus* (C6/36), sendo que os complexos de Cu(II) foram os mais promissores por serem cerca de 10 vezes mais ativos que as tiossemicarbazonas livres (HL1 – HL8). Essa informação destaca que a estratégia de complexar as tiossemicarbazonas derivadas de chalcona ao Cu(II) levou a um significativo aumento do potencial citotóxico.

No caso da maioria dos complexos de Ag(I), o fato da atividade citotóxica não ser maior em relação ao ligante, mesmo com o seu sal precursor apresentando efeito citotóxico, realça a importância de formação de ligações múltiplas entre ligante e metal para que o mesmo atue como uma entidade.

Durante o estudo dos compostos selecionados, tiossemicarbazonas e complexos de Cu(II), frente as larvas de *A. aegypti* foi possível atestar que Cu2 e HL4 foram efetivos na redução da sobrevivência dos indivíduos na dose de 10  $\mu$ M, HL3 e HL5 demonstraram a manifestação de efeitos tóxicos ao longo do tempo no experimento de sobrevivência e Cu2 apresentou comportamento dose-dependente. Além disso, ao avaliar a morfologia das células do intestino médio das larvas de *A. aegypti* tratadas com os HL2, Cu2, HL5 e Cu5 foi possível observar alterações compatíveis com o efeito citotóxico causados por esses compostos. Porém, essa citotoxicidade não ocorre por ativação da via da caspase-3, o que foi testado pelo ensaio de imunofluorescência.

Com esses resultados é possível atestar que algumas das tiossemicarbazonas sintetizadas e seus complexos de Cu(II) possuem potencial efeito citotóxico e larvicida em mosquitos do gênero *Aedes*, entretanto, outros estudos são necessários para o desenvolvimento de formulações baseadas nesses compostos, bem como o esclarecimento da relação entre o efeito citotóxico observado nas células C6/36 com os danos observados nas célula do intestino médio das larvas e as vias envolvidas no mecanismo de ação destes compostos.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, F. V. S. De, MORAIS, M. M., RIBEIRO, S. P., & EIRAS, Á. E. Influence of breeding site availability on the oviposition behaviour of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 5, p. 669–676, 2015.
- ACHARYA, P. T. et al. A review on development of bio-active thiosemicarbazide derivatives: Recent advances. **Journal of Molecular Structure**, v. 1226, p. 129268 2020.
- AHMED, M. F.; ALMALKI, A. H. Design, synthesis, antiproliferative activity, and cell cycle analysis of new thiosemicarbazone derivatives targeting ribonucleotide reductase. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 102989, 2021.
- ANDRANDE, Carlos Fernando S. de; MODOLO, Maurício. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var israelensis in integrated control. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.184-187, jun. 1991.
- BAI, C. et al. Synthesis and evaluation of novel thiosemicarbazone and semicarbazone analogs with both anti-proliferative and anti-metastatic activities against triple negative breast cancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 116107, 2021.
- BEATY, B. J; MARQUARDT, W. C. **The Biology of Disease Vectors**. University Press of Colorado. Elsevier Academic Press, USA, 1996.
- BERALDO, Heloisa. Semicarbazonas e tiossemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.461-471, jun. 2004.
- BERALDO, H.; GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. **Mini-reviews In Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 1, p.31-39, 2004.
- BILLINGSLEY, P. F. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. **Annual Review of Entomology**, v. 35, n. 1, p. 219-248, 1990.
- BISCEGLIE, F. et al. Antibacterial activity of metal complexes based on cinnamaldehyde thiosemicarbazone analogues. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 203, p.110888, 2020.
- BLOMMEL, M. L. et al. Pregabalin: An antiepileptic agent useful for neuropathic pain. **American Journal Of Health-system Pharmacy**, v. 64, n. 14, p.1475-1482, 2007.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor**: manual de normas técnicas: manual de normas técnicas. Brasília, Ministério da Saúde, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Programa Nacional de Controle da Dengue**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, vol 54, nº 1, 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

CABRERA M. et al. G2/M cell cycle arrest and tumor selective apoptosis of acute leukemia cells by a promising benzophenone thiosemicarbazone compound. **PLoS ONE**, doi:10.1371/journal.pone.0136878, 2015.

CAMARGO, M. F. et al. Avaliação da ação residual do larvicida temephós sobre o *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) em diferentes tipos de recipientes. **Revista de Patologia Tropical**, v. 27, n.1, p. 65-70, 1998.

CARVALHO, F. D., & MOREIRA, L. A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species? **Neotropical Entomology**, v. 46, n. 3, p. 243–255, 2017.

CASAS, J. S.; GARCÍA-TASENDE, M. S.; SORDO, J. Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 209, n. 1, p. 197-261, 2000.

CASTRO, S. B.R. et al. Synthesis of lipophilic genistein derivatives and their regulation of IL12 and TNF- $\alpha$  in activated J774A.1 cells. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 79, n.3, p. 347–352, 2012.

CHAVASSE, D. C.; YAP, H. H. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. **World Health Organization**, 1997.

CHELLAN, P. et al. Antiprotozoal activity of palladium(II) salicylaldiminato thiosemicarbazone complexes on metronidazole resistant *Trichomonas vaginalis*. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 102, p. 1-4, 2019.

CHEN, J. et al. The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 197, p. 40-48, 2004.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora Fiocruz, 1994.

CORY, J. G. Ribonucleotide reductase as a chemotherapeutic target. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 27, p. 437-455, 1988.

COSTA, Matheus Warthe Borborema. **Complexos metálicos de tiossemicarbazonas: uma visão atual sobre a estrutura e atividades biológicas**

**desse compostos**. 2021. 44 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Governador Valadares, 2021.

DENECKE, S., SWEVER, L., DOURIS, V., & Vontas, J. How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 103, p. 22-35, 2018.

DHADIALLA, T.S., CARLSON, G.R., LE, D.P., 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology*, v. 43, n.1, p. 545-569, 1998.

DIAS, Luciana dos Santos et al. Toxicity of spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in Brazil. *Plos One*, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 1-15, 16 mar. 2017. Public Library of Science (PLoS).

ĐILOVIĆ, I. et al. Novel thiosemicarbazone derivatives as potential antitumor agents: Synthesis, physicochemical and structural properties, DNA interactions and antiproliferative activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 9, p. 5189-5198, 2008.

DU, X. et al. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 13, p. 2695–2707, 2002.

EDEN, R. Rapid estimation of the number of microorganisms in raw meat by impedance measurement. *Food Technol.*, v. 37, p. 64-70, 1983.

EZZAT, Ahmed; MOHAMED, Mahmoud Basseem I.; MAHMOUD, Ammar M.; FARAG, Rabie S.; EL-TABL, Abdou. S.; RAGAB, Ahmed. Synthesis, spectral characterization, antimicrobial evaluation and molecular docking studies of new Cu (II), Zn (II) thiosemicarbazone based on sulfonyl isatin. *Journal Of Molecular Structure*, [S.L.], v. 1251, p. 132004, mar. 2022. Elsevier BV.

FERNANDES, K. M. **Caracterização morfológica e da expressão de proteínas no intestino médio de *Aedes aegypti* durante a metamorfose e submetido a diferentes dietas**. 2014. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

FERNANDES, L. P.; SILVA, J. M. B.; OLIVEIRA, C. G. Fragmentation study, dual anti-bactericidal and anti-viral effects and molecular docking of cobalt (III) complexes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 21, p. 8355-8372, 2020.

FERNANDES, Kenner Moraes; TOMÉ, Hudson Vaner Ventura; MIRANDA, Franciane Rosa; GONÇALVES, Wagner Gonzaga; PASCINI, Tales Vicari; SERRÃO, José Eduardo; MARTINS, Gustavo Ferreira. *Aedes aegypti* larvae treated with spinosad produce adults with damaged midgut and reduced fecundity. *Chemosphere*, [S.L.], v. 221, p. 464-470, abr. 2019. Elsevier BV.

- FIAZ, Muhammad et al. Behavioral and ultrastructural effects of novaluron on *Aedes aegypti* larvae. **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 93, p. 104974, set. 2021. Elsevier BV.
- FINCH, R. A. et al. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone; 3-AP): an inhibitor of ribonucleotide reductase with antineoplastic activity. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 39, p. 3-12, 1999.
- FORATO, L. A. et al. A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações. **Embrapa Instrumentação**. São Carlos, São Paulo, 2010.
- Foster, W. A., & Walker, E. D. Mosquitoes (Culicidae). Medical and Veterinary Entomology (third ed.), **Academic Press**, San Diego, CA, USA. p. 261-325, 2019.
- GAMBARRA, W. P. T. et al. Spatial distribution and esterase activity in populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) resistant to temefos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 178-184, 2013.
- GEARY, W.J.. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 81-122, out. 1971. Elsevier BV.
- GRAF, J-F. The role of insect growth regulators in arthropod control. **Parasitology Today**, v. 9, n. 12, p. 471-474, 1993.
- GRISALES, N. et al. A resistência a temefos em *Aedes aegypti* na Colômbia compromete o controle do vetor da dengue. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, 2013.
- GROSSI, J. C. **Avaliação da toxicidade de tiossemicarbazonas derivadas de benzaldeído, acetofenona e benzofenona contra larvas de *Aedes aegypti***. 2018. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Instituto de Ciências da Vida, Universidade Federal de Juiz de Fora, Governador Valadares, 2018.
- HASSAN, M. et al. Discovery of novel isatin-based thiosemicarbazones: synthesis, antibacterial, antifungal, and antimycobacterial screening. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 3, p. 281-290, 2020.
- HUSTEDT, John Christian; BOYCE, Ross; BRADLEY, John; HII, Jeffrey; ALEXANDER, Neal. Use of pyriproxyfen in control of *Aedes* mosquitoes: a systematic review. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 1-18, 12 jun. 2020. Public Library of Science (PLoS).
- IBÁÑEZ-ESCRIBANO, A. et al. Thio- and selenosemicarbazones as antiprotozoal agents against *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 781-791, 2022.

JAMAL, S. E. et al. Thiosemicarbazone complexes as versatile medicinal chemistry agents: a review. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 3, p. 689-703, 2019.

KALAIARASI, G.; et al. Synthesis, spectroscopic/electrochemical characterization, DNA/Protein binding studies and bioactivity assays of Ru(II) carbonyl complexes of 4-oxo-4H-chromene-3-carbaldehyde thiosemicarbazones. **Inorganica Chimica Acta**, [S.L.], v. 525, p. 120470, set. 2021. Elsevier BV.

KANSO, F. et al. Therapeutic perspective of thiosemicarbazones derivatives in inflammatory pathologies: A summary of in vitro/in vivo studies. **International Immunopharmacology**, v. 96, p. 107778, 2021.

LEAL, A. L. A. B. et al. Potentiating activity of norfloxacin by synthetic chalcones against NorA overproducing *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 155, p. 104894, 2021.

LI, J; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6194-6206, 2008.

LIMA-CAMARA, Tamara Nunes de; HONÓRIO, Nildimar Alves; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, Ricardo. Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, [S.L.], v. 22, n. 10, p. 2079-2084, out. 2006. FapUNIFESP (SciELO).

LIU, Nannan. Insecticide Resistance in Mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. **Annual Review Of Entomology**, [S.L.], v. 60, n. 1, p. 537-559, 7 jan. 2015. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020828>.

LOPES, M. P. et al. Spinosad-mediated effects on the walking abilities, midgut, and Malpighian tubules of Africanized honey bee workers. **Pest Management Science**, v. 74, n. 6, p.1- 27, 2018.

LOUIE, A. Y.; MEADE, T. J.; LIPPARD, S. J. Metal complexes as enzyme inhibitors. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2711-2734, 1999.

MACORIS, M. L. G. et al. Alteration in susceptibility response of *Aedes aegypti* to organophosphates in cities in the state of S. Paulo, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 5, p. 521-522, 1999.

MARTINHO, José Manuel Gaspar. Espectroscopia de absorção no Ultravioleta e Visível. **Bol. da Soc. Port. Química**, v. 52, n. 3, p. 44-46, 1994.

MENDONÇA, F.A.; SOUZA, A.V.; DUTRA, D.A. Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. **Sociedade & Natureza**, Uberlândia, v. 21, p. 257-269, 2009.

MESQUITA, R. S.; TADEI, W. P.; BASTOS, A. M. B. Determination of the larvicidal activity of benzoyl thiosemicarbazone and its Ni (II) complex against *Aedes aegypti*

and *Anopheles darlingi* larvae in Amazonas, Brazil. **Journal of Entomology and Nematology**, v. 10, n. 6, p. 37-42, 2018.

MICCHELLI, C. A.; PERRIMON, N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. **Nature**, v. 439, p.475-479, 2006.

MULLA, M. S. et al. The future of insect growth regulators in vector control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 11, n. 2, p. 269-273, 1995.

NATARAJAN, Sampath; MATHEWS, Rita. Modeling and proposed mechanism of two radical scavengers through docking to curtail the action of ribonucleotide reductase. **Journal Of Biophysics And Structural Biology**, [S.l.], v. 3, p. 38-48, set. 2011.

NAVEEN et al. Design, synthesis, biological activity, molecular docking and computational studies on novel 1,4-disubstituted-1,2,3-Triazole-Thiosemicarbazone hybrid molecules. **Journal of Molecular Structure**, v. 1209, p. 127951, 2020.

NELSON, M. J. **Aedes aegypti**: biology and ecology. Washington, D.C.: Pan American Health Organization, 1986. Disponível em: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/28514/PNSP8664\\_eng.pdf?sequence=](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/28514/PNSP8664_eng.pdf?sequence=) . Acesso em: 23 Jul. 2022.

NOLDUS, L. P. J. J.; SPINK, A. J.; TEGELENBOSCH, R. A. J. Computerised video tracking, movement analysis and behaviour recognition in insects. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 35, n. 2-3, p. 201-227, 2002.

OLIVEIRA, J. F. et al. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 136, p. 305-314, 2017.

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Documento técnico para a implementação de intervenções baseado em cenários operacionais genéricos para o controle do *Aedes aegypti***. Washington, D.C.: OPAS, 2019.

PAHO - Pan American Health Organization. **Technical document for the implementation of interventions based on generic operational scenarios for *Aedes aegypti* control**. 2019. Disponível em: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51652/9789275121108\\_eng.pdf?sequence=5&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51652/9789275121108_eng.pdf?sequence=5&isAllowed=y). Acesso em: 10 abr. 2022

PARK, Kyung Chan et al. Copper and conquer: copper complexes of di-2-pyridylketone thiosemicarbazones as novel anti-cancer therapeutics. **Metallomics**, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 874-886, 2016. Oxford University Press (OUP).

PELOSI, G. Thiosemicarbazone metal complexes: from structure to activity. **The Open Crystallography Journal**, v. 3, n. 1, p. 16-28, 2010.

- PIOVEZAN, R. et al. Spatial–temporal distribution of *Aedes (Stegomyia) aegypti* and locations of recycling units in southeastern Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 541, p. 1-13, 2019.
- PITUCHA, M. et al. Influence of complexation of thiosemicarbazone derivatives with Cu(II) ions on their antitumor activity against melanoma cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3104, 2021.
- POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 11-17, 2013.
- PRABHAKARAN, R. et al. Coordination behaviour of ferrocenylthiosemicarbazone in a novel hetero trinuclear nickel (II) complex: Synthesis, spectral, electrochemistry and X-ray crystallography. **Inorganica Chimica Acta**, v. 361, n. 8, p. 2547-2552, 2008.
- PRIDGEON, J. W. et al. High-Throughput Screening Method to Identify Potential Pesticides for Mosquito Control. *J. Med. Entomol.* v.46, n.2, p. 335-341, 2009.
- RANSON, H. et al. Insecticide resistance in dengue vectors. **Tropika**, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2010.
- REY, L. **Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.
- RIBEIRO, J. M. C.; CHARLAB, R.; VALENZUELA, J. G. The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 11, p. 2001-2010, 2001.
- ROCHA, Cleidivânia Silveira. **Sínteses e estudos biológicos de novos complexos de prata(I) de hidrazonas e de ácidos N,R-sulfonilaminobenzóico**. 2019. 197 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.
- ROMAO, S.; MÜNZ, C. LC3-associated phagocytosis. **Autophagy**, v. 10, n. 3, p.526-528, 2014.
- SABOIA-VAHIA, L. et al. Protein expression in the midgut of sugar-fed *Aedes albopictus* females. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 290-314, 2012.
- SALGADO, V. L. **BASF Insecticide Mode of Action: Technical Training Manual**. 2013. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/275959530\\_BASF\\_Insecticide\\_Mode\\_of\\_Action\\_Technical\\_Training\\_Manual](https://www.researchgate.net/publication/275959530_BASF_Insecticide_Mode_of_Action_Technical_Training_Manual). Acesso em: 10 jun. 2018.
- SANTINI, Carlo et al. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 114, n. 1, p. 815-862, 8 out. 2013. American Chemical Society (ACS).
- SANTOS, D. B. C. et al. Educação em saúde: combate ao *Aedes aegypti* em comunidade Quilombola. **Revista Enfermagem Atual**, v. 89, n.27, 2019.

SANTOS, Karoliny Gonçalves Matias. **Síntese de tiosemicarbazonas derivadas de chalconas**. 2021. 43 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Governador Valadares, 2021.

SANTOS-PIRATH, I. M. et al. Molecular events and cytotoxic effects of a novel thiosemicarbazone derivative in human leukemia and lymphoma cell lines. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 14, p. 51– 64, 2021.

SAVIR, S. et al. Synthesis, cytotoxicity and antimalarial activities of thiosemicarbazonas and their nickel (II) complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1211, p. 128090, 2020.

SCUDELER, E. L.; SANTOS, D. C. Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). **Micron**, v. 44, p.125-132, 2013.

SERRA, N. B. et al. Estudo da viabilidade de ovos estocados de *Aedes aegypti* DIPTERA: CULICIDAE. In: ENCONTRO DE ENSINO E PESQUISA E EXTENSÃO, 2018, Dourados. **Anais [...]**. Dourados: Universidade Federal da Grande Dourados e Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, 2018. Disponível em: <<https://anaisonline.uems.br/index.php/enic/article/view/5180/5206>>. Acesso em: 06 maio. 2022.

SILVA, J. B. P. et al. Thiosemicarbazonas as *Aedes aegypti* larvicidal. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 100, p.162-175, 2015.

SILVA, J. G. et al. Chalcone-derived thiosemicarbazonas and their zinc(II) and gallium(III) complexes: spectral studies and antimicrobial activity. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 66, p. 385-401, 2013.

SILVA, Wanderson Batista da. **DIVERSIDADE DO MOSQUITO *Aedes* spp., (DIPTERA: CULICIDAE) EM ÁREA URBANA E DE MATA CIRCUNVIZINHA EM CUIABÁ**, MT. 2019. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Ambientais, Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2019.

SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. Recent developments in biological activities of chalcones: a mini review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 758-777, 2014.

SIQUEIRA, T. de P. et al. Rhamnolipids on *Aedes aegypti* larvae: a potential weapon against resistance selection. **3 Biotech**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 1-8, 18 mar. 2021. Springer Science and Business Media LLC.

SOUZA, M. R. P. et al. Synthesis of novel (-)-Camphene-based thiosemicarbazonas and evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. **Natural Product Research**, v. 33, n. 23, p. 3372-3377, 2019.

SOUZA-NETO, J. A.; POWELL, J. R.; BONIZZONI, M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 67, p. 191 – 209, 2019.

TENÓRIO, R. P. et al. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p.1030-1037, dez. 2005.

TOMÉ, H. V. V., Barbosa, W. F., Martins, G. F., & Guedes, R. N. C. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. **Chemosphere**, v. 124, n. 1, p. 103–109, 2015

TOMÉ, H. W. et al. Survival and swimming behavior of insecticide-exposed larvae and pupae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Parasites & Vectors**, v. 7, p.195-203, 2014.

VALLE, D.; BELINATO, T. A; MARTINS, A. J. Controle químico de *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas e alternativas. In: VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; CUNHA, R. V (Orgs). **Dengue: teorias e práticas**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2015. p. 93-126.

VALZANIA, L., MATTEE, M. T., STRAND, M. R., & BROWN, M. R. Blood feeding activates the vitellogenic stage of oogenesis in the mosquito *Aedes aegypti* through inhibition of glycogen synthase kinase 3 by the insulin and TOR pathways. **Developmental biology**, v. 454, n. 1, p. 85-95, 2019.

VALOTTO, C. F. B. et al. Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (Leguminosae), e à uma fração rica em taninos de *Magonia pubescens* (Sapindaceae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p.194-200, abr. 2011.

VARGAS, L. D. L. e al. Resistência das populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)(Insecta, Diptera, Culicidae) aos inseticidas utilizados para o controle: estado da arte do conhecimento. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** (Impr.), v. 21, n. 1, p. 98-116, 2022.

VARGAS, L. D. L. **Resistência das populações de *Aedes aegypti* aos inseticidas utilizados para o controle da dengue**: revisão de escopo. Dissertação (Mestrado em Ambiente e Saúde) - Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2020.

VARMA, M. et al. A simple methyl substitution of 3-acetylcoumarin thiosemicarbazone enhances cellular autophagy flux, reduces inflammation and ameliorates rough eye phenotype in the *Drosophila* model of Alzheimer's disease. **Journal of Molecular Structure**, v. 1235, p. 130265, 2021.

WILKINSON, D. A. et al. Straightforward multi-object video tracking for quantification of mosquito flight activity. **Journal of Insect Physiology**, v. 71, p.114-121, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Vector-borne diseases**: key facts. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>>. Acesso em: 17 jul. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance**. 1996. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/63504/WHO\\_CTD\\_WHOPEPES\\_97.2.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/63504/WHO_CTD_WHOPEPES_97.2.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso em: 19 jul. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue hemorrhagic fever: diagnostic, treatment, prevention and control**. 2nd ed. Geneva: WHO; 1997.

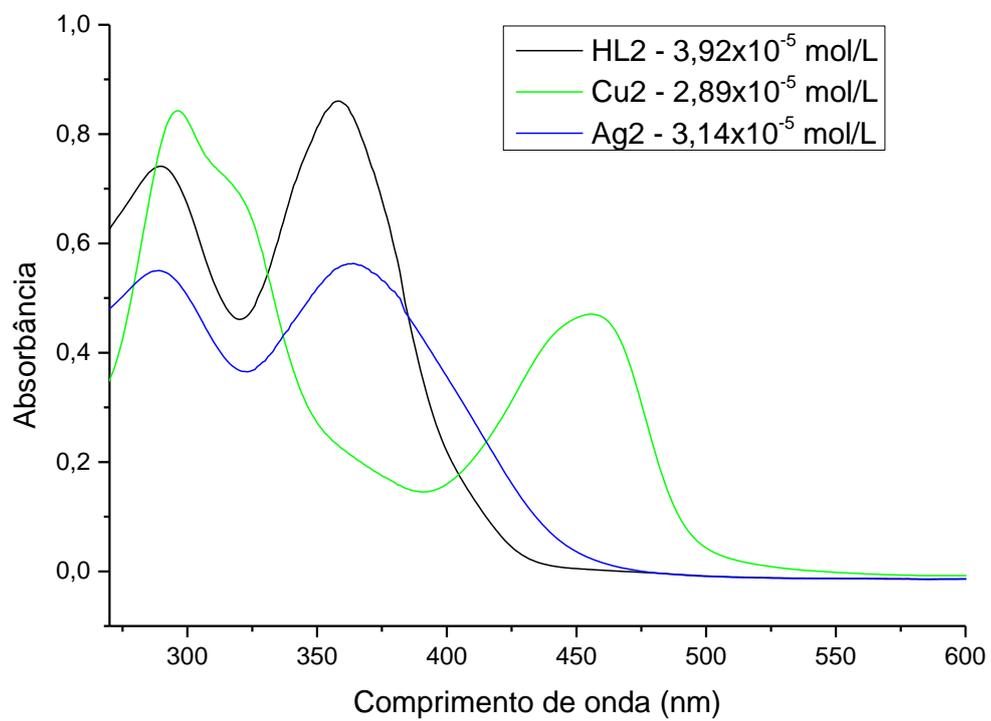
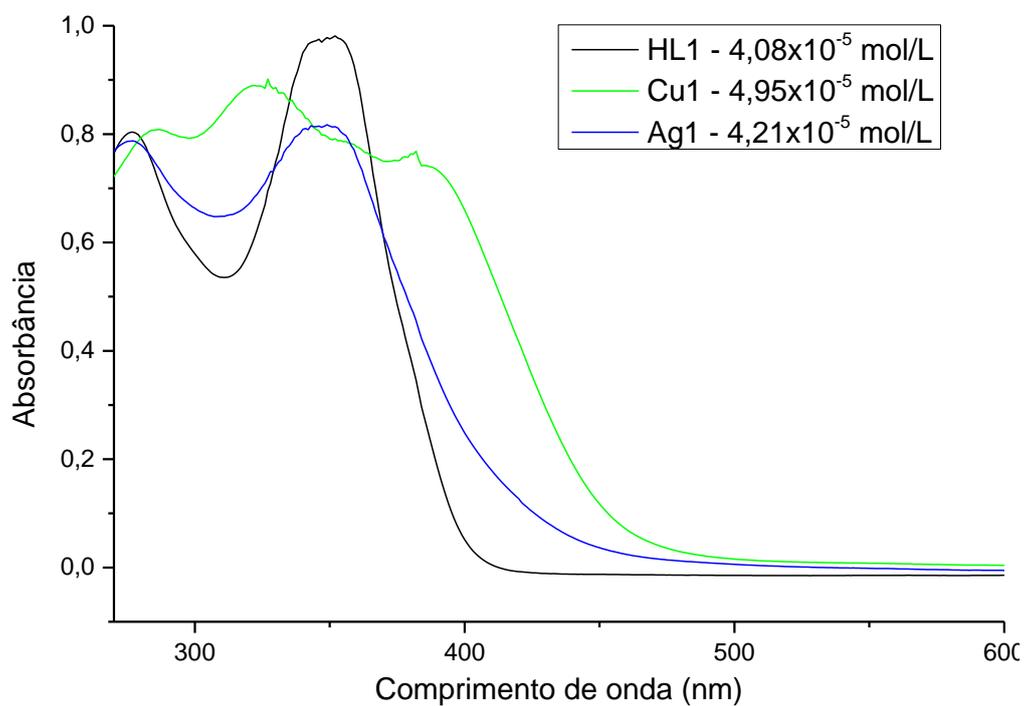
YU, P. et al. Anticancer and biological properties of a Zn-2, 6-diacetylpyridine bis (thiosemicarbazone) complex. **Metallomics**, v. 11, p. 1372-1386, 2019.

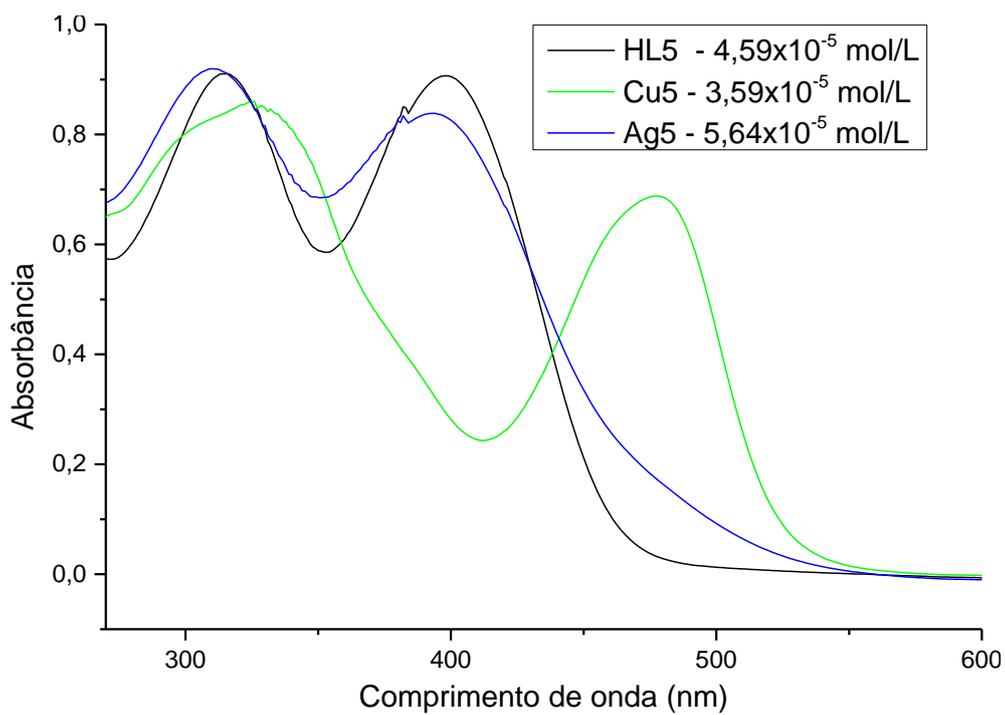
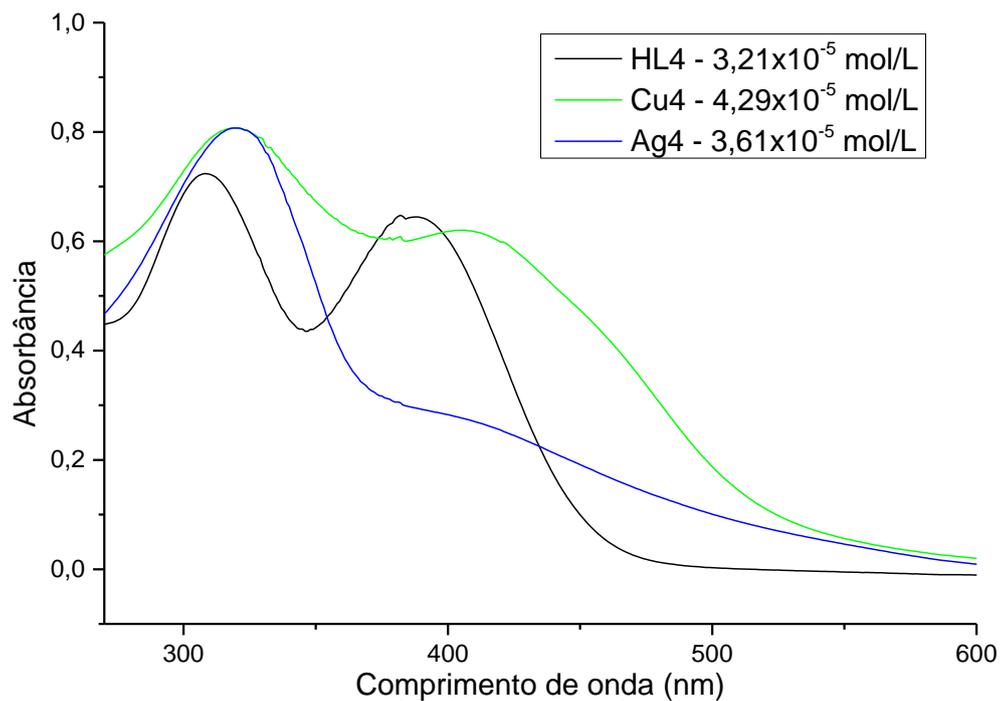
ZARA, A. L. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.

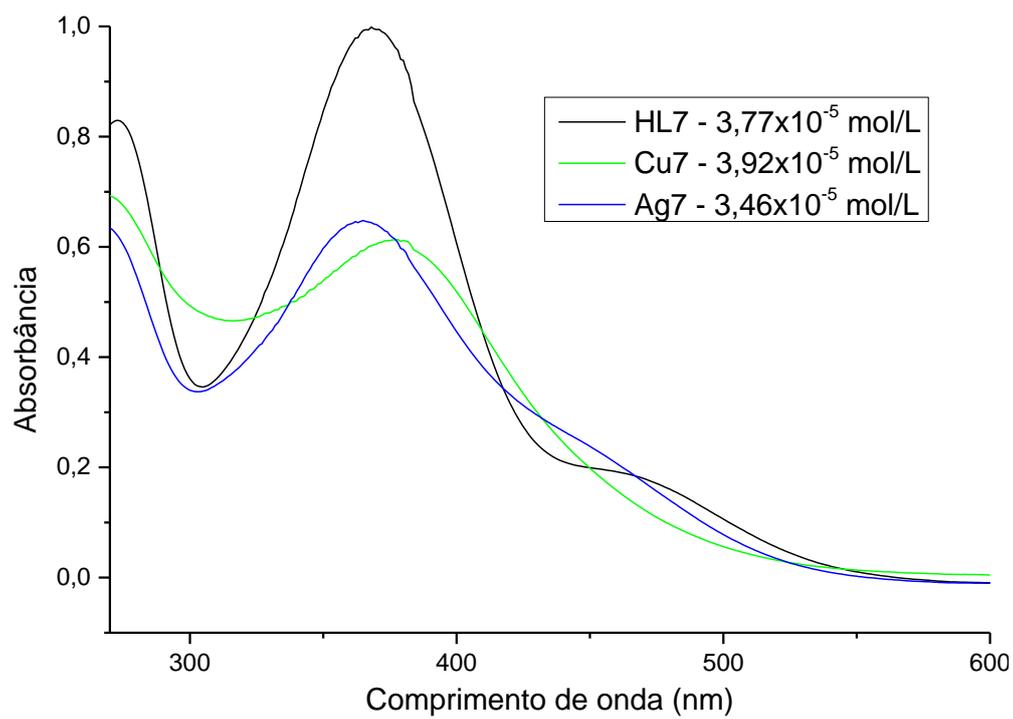
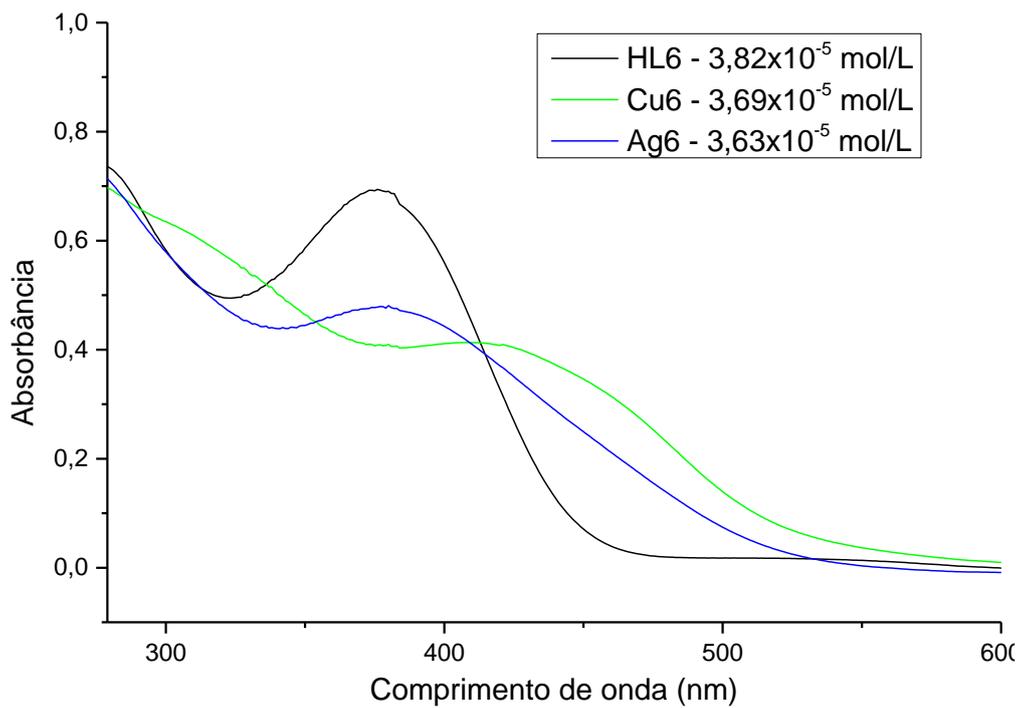
ZHANG, Jianzhen; ZHU, Kun Yan. Characterization of a chitin synthase cDNA and its increased mRNA level associated with decreased chitin synthesis in *Anopheles quadrimaculatus* exposed to diflubenzuron. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [s.l.], v. 36, n. 9, p.712-725, set. 2006.

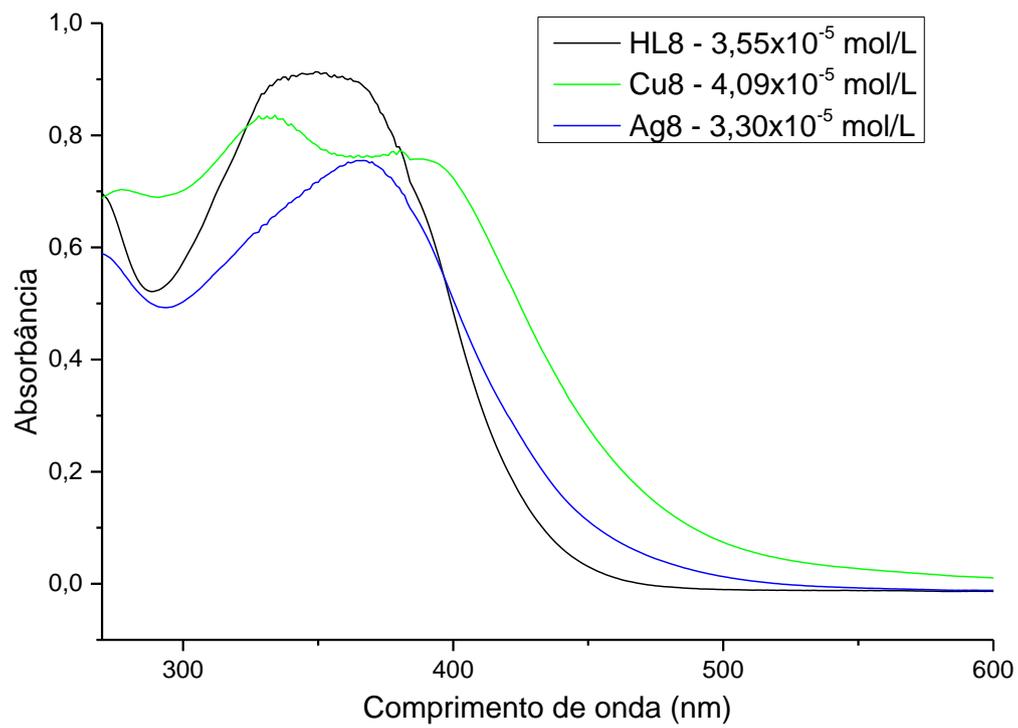
ZHAO, X. et al. *Aedes aegypti* peroxidase gene characterization and developmental expression. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p.481-490, 2001.

**APÊNDICE A - Espectros eletrônicos das tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II) e Ag(I) em dimetilsulfóxido**

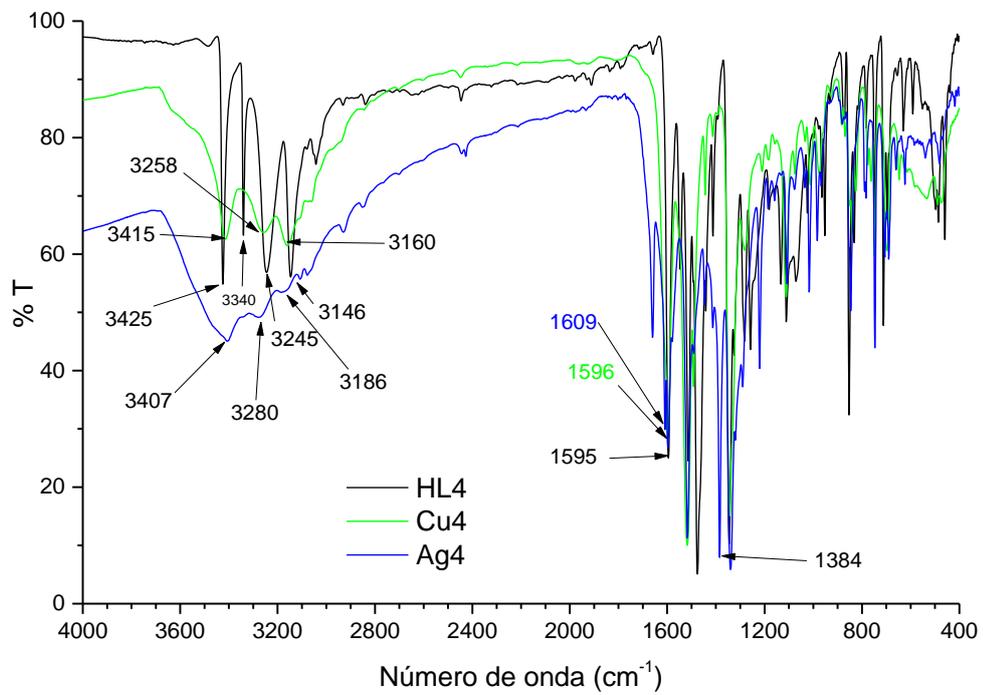
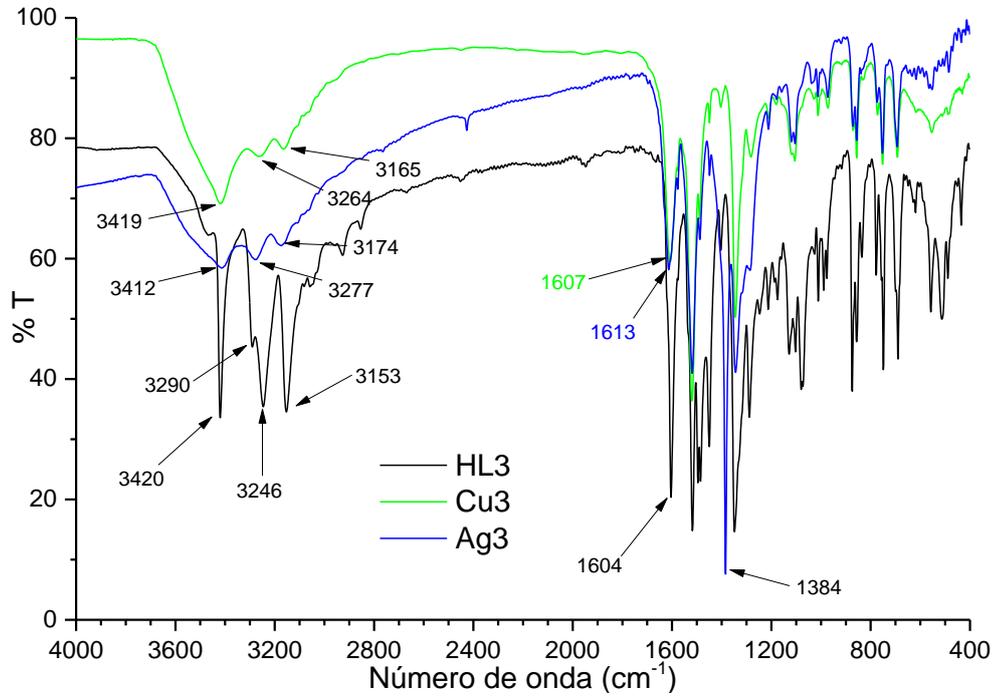


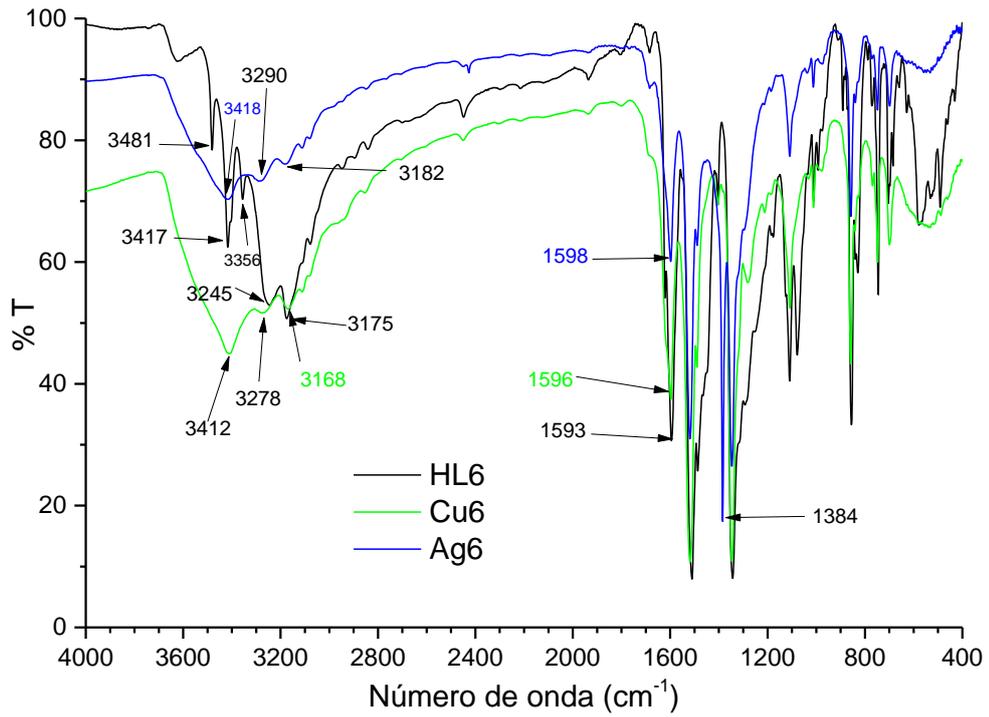
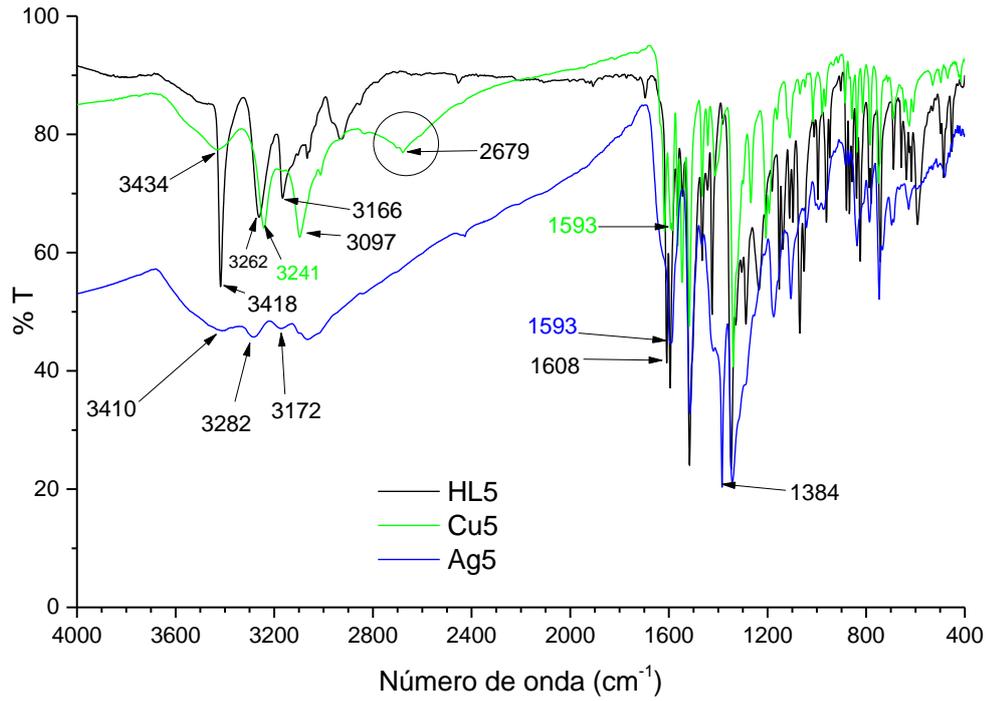


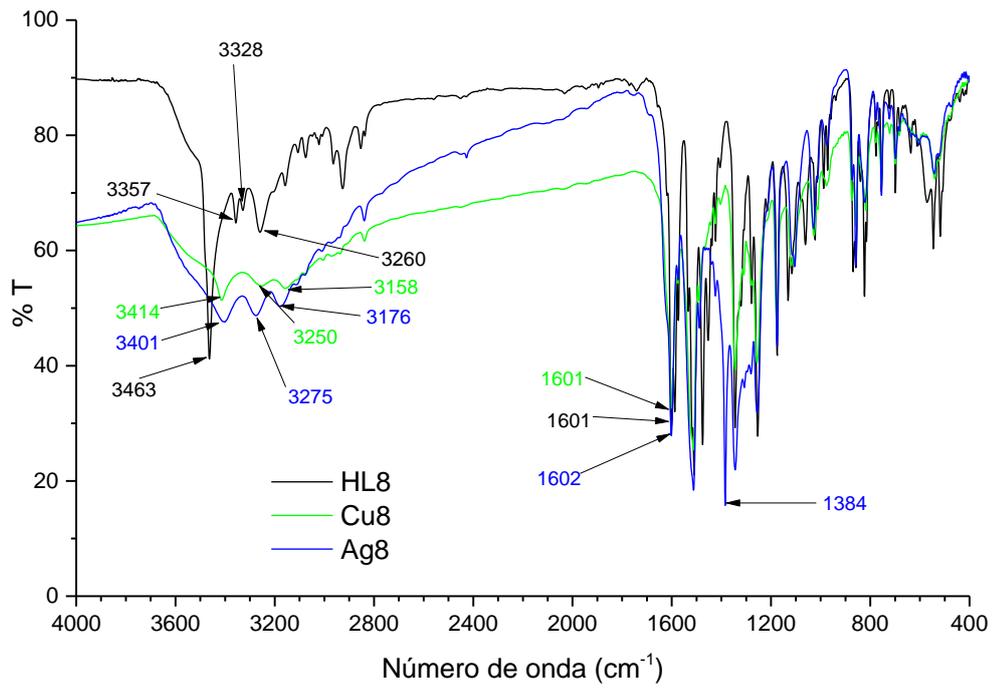
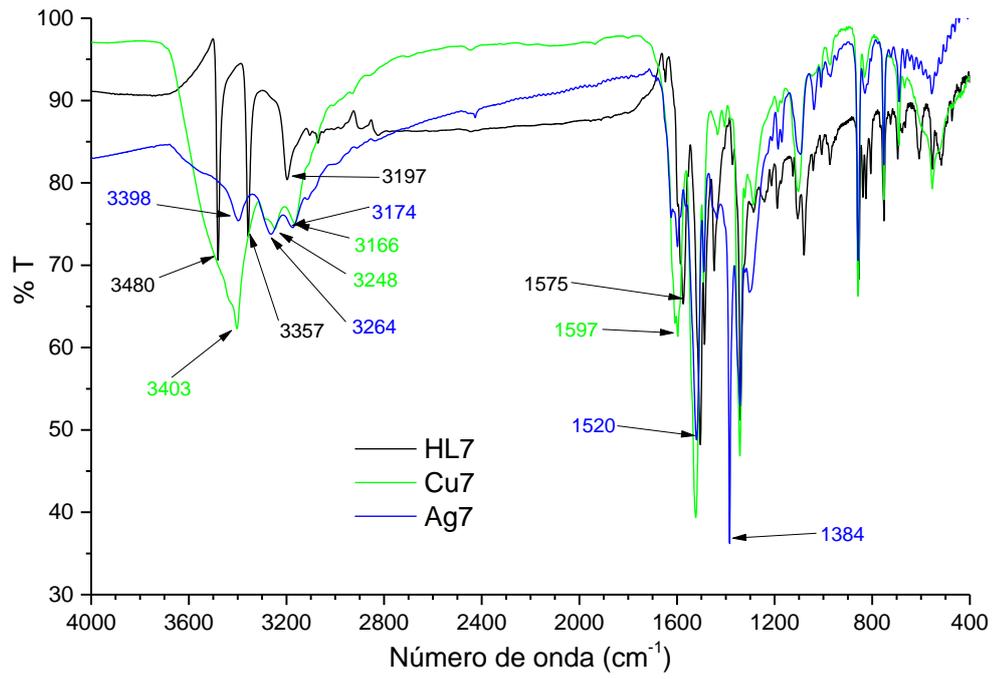




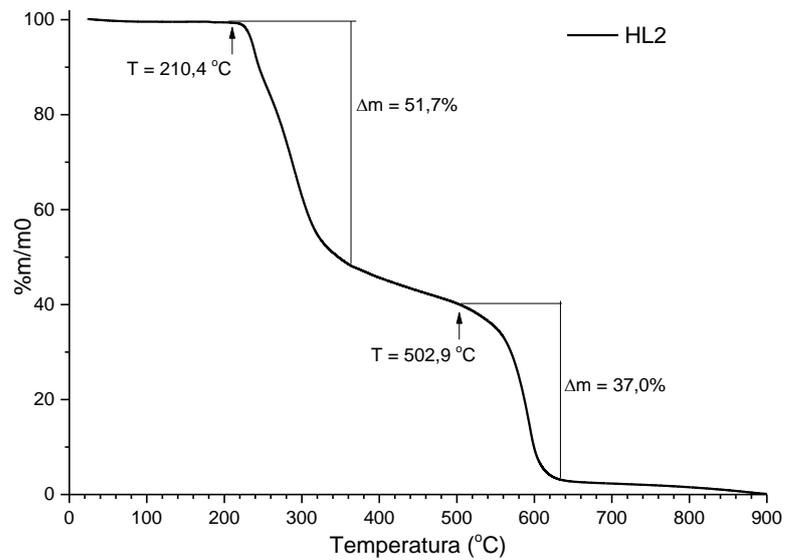
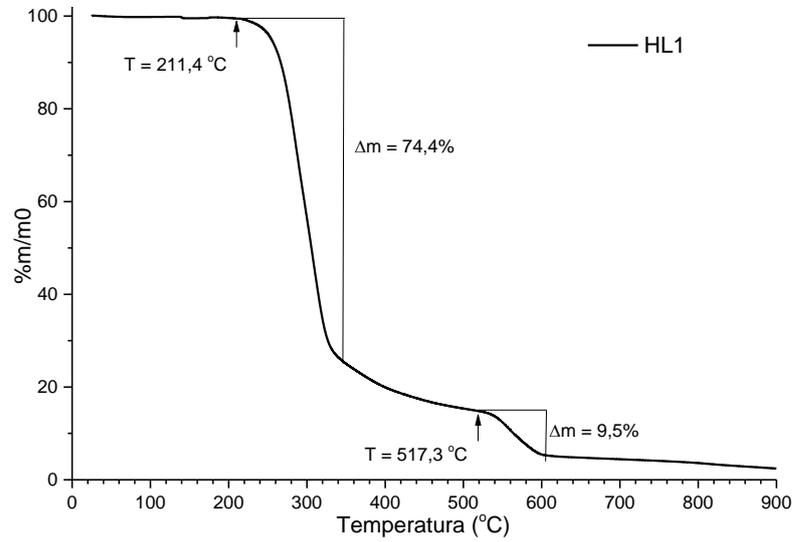
## APÊNDICE B - Espectros na região do infravermelho das tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II) e Ag(I)

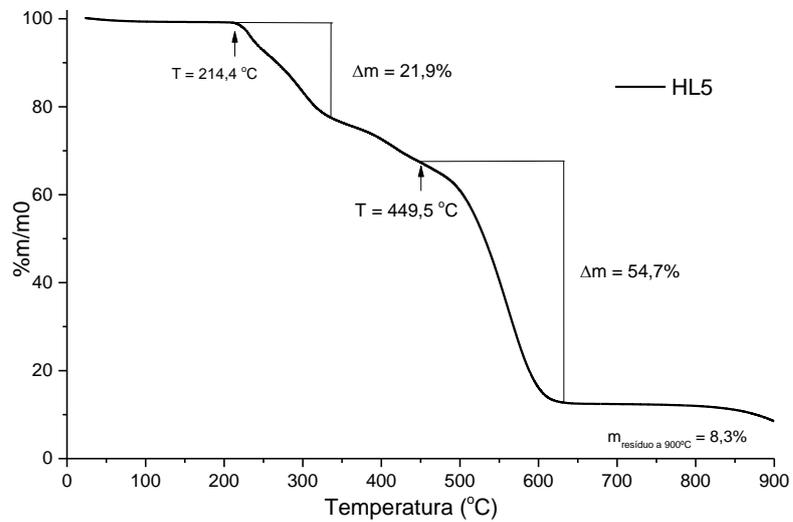
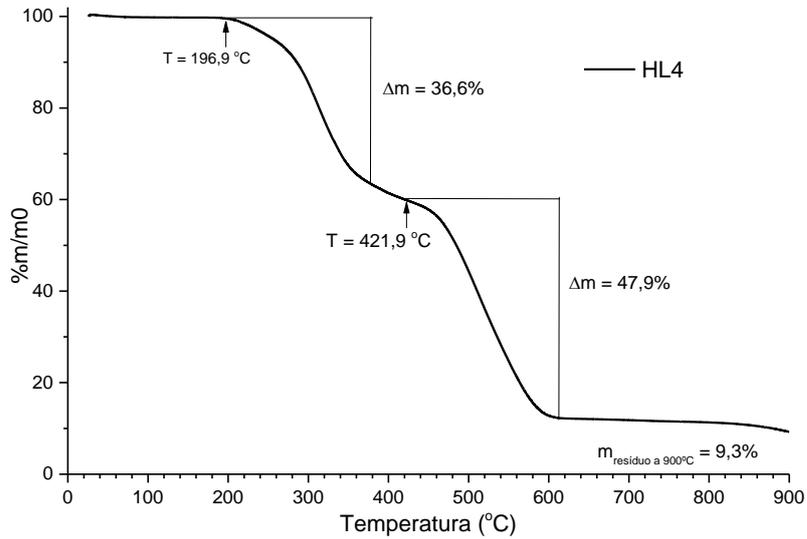
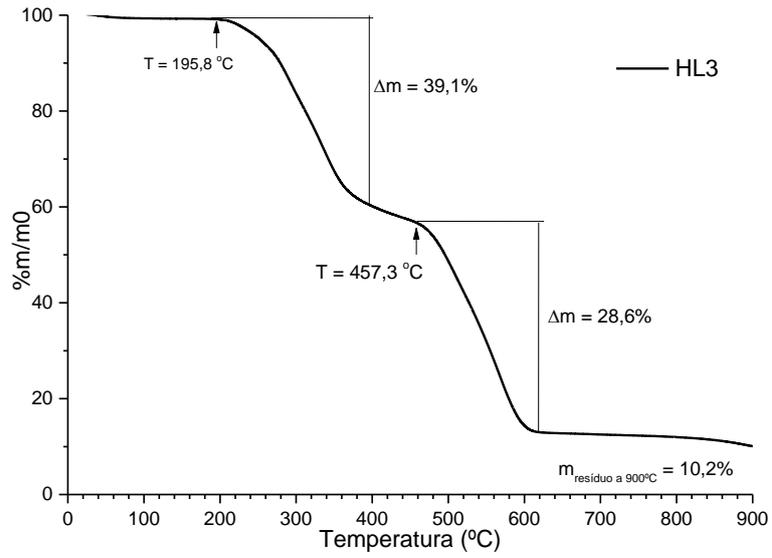


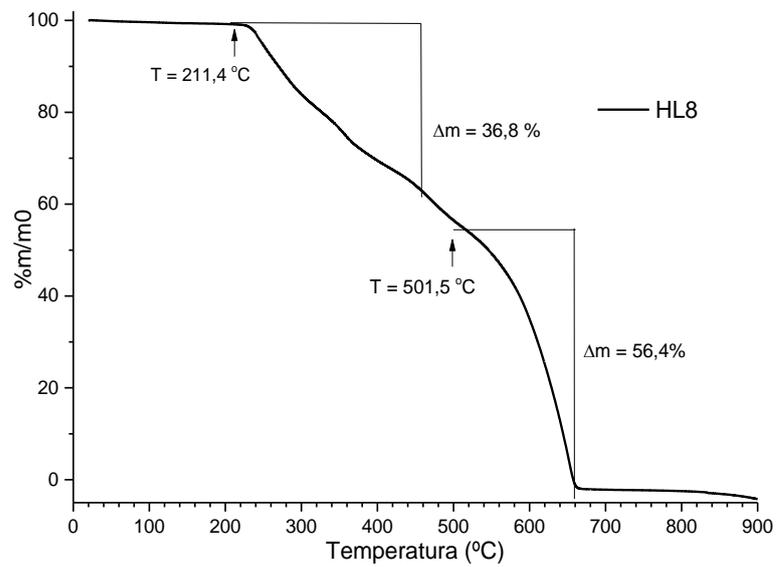
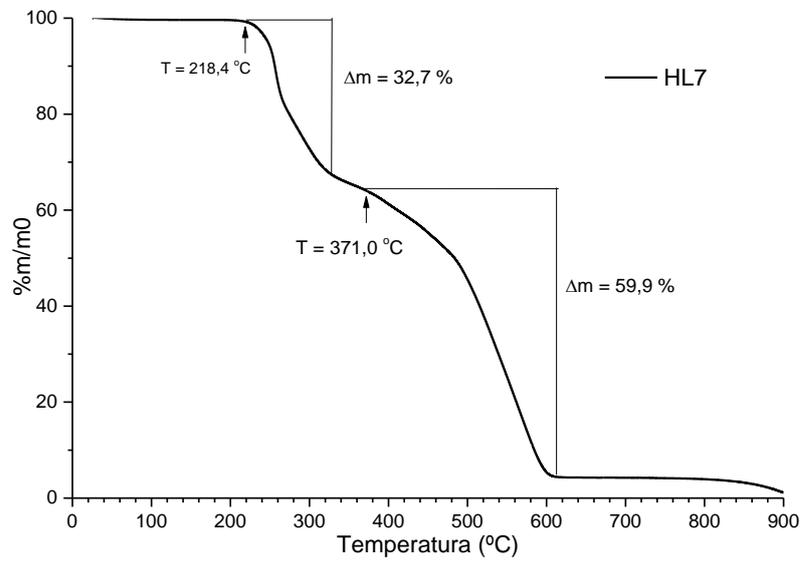
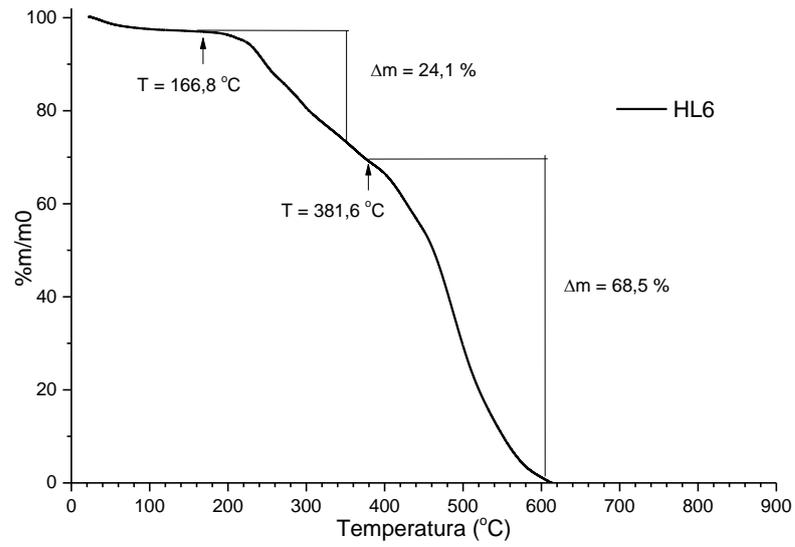


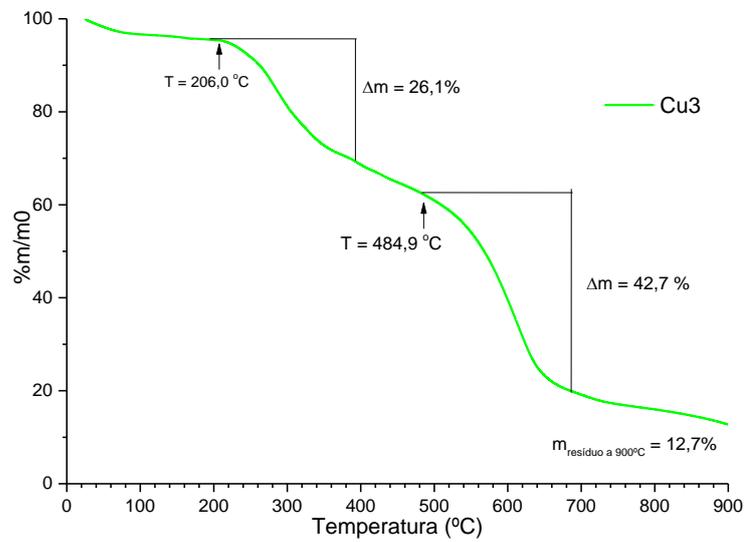
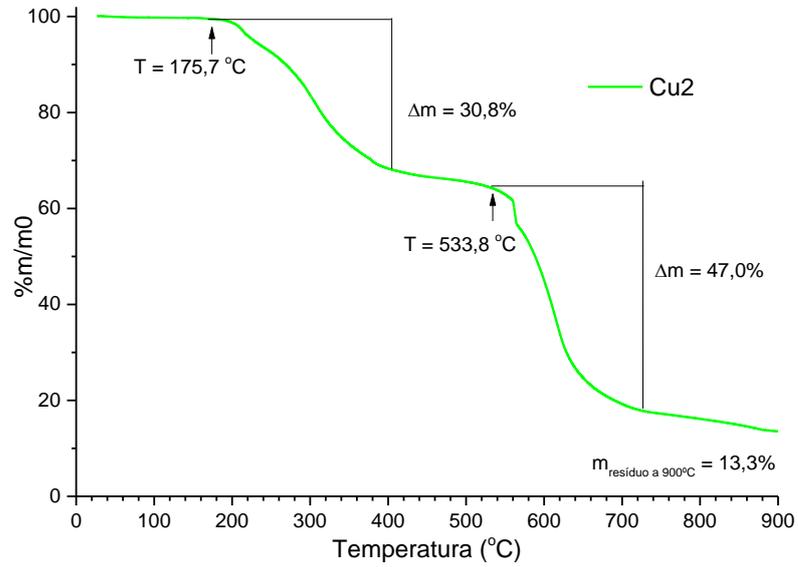
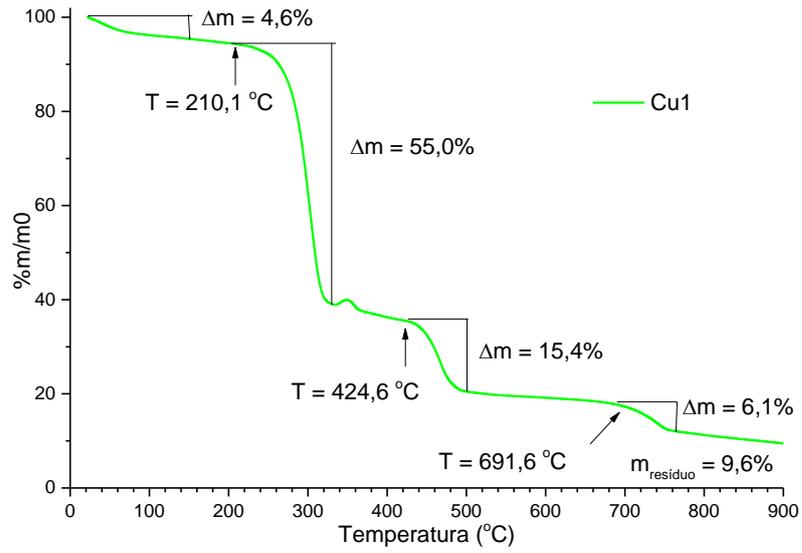


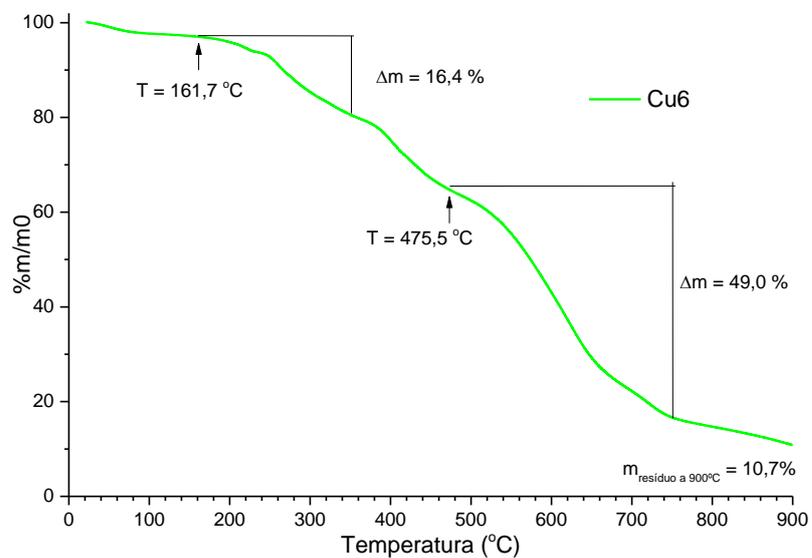
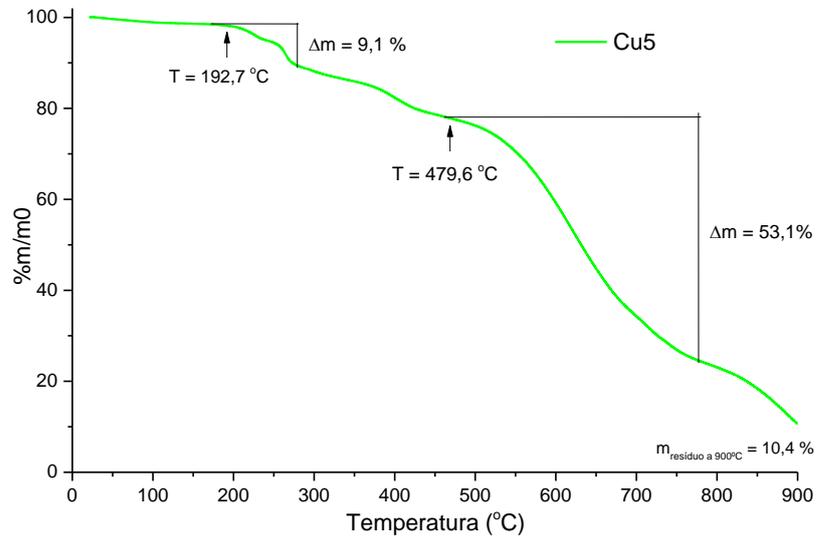
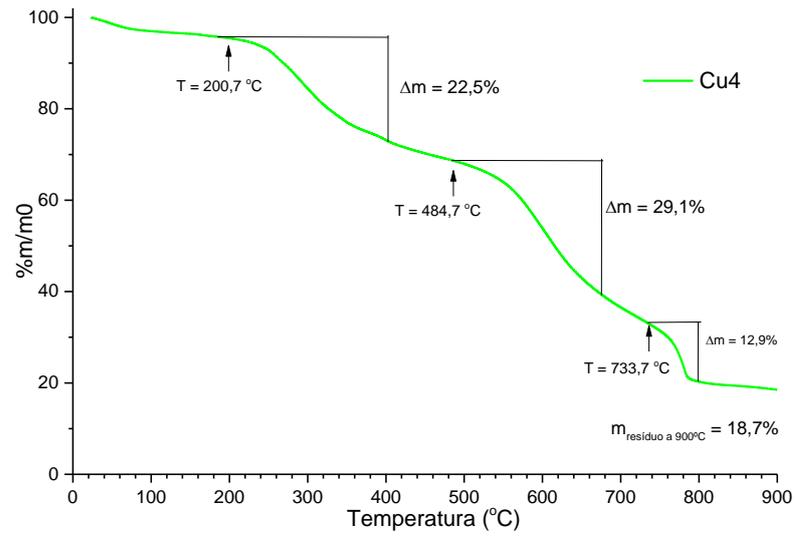
**APÊNDICE C - Curvas TG das tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II) e Ag(I) analisados na faixa de 30 a 900°C sob atmosfera de ar (vazão 300 mL min<sup>-1</sup>) e taxa de aquecimento de 15°C min<sup>-1</sup>**

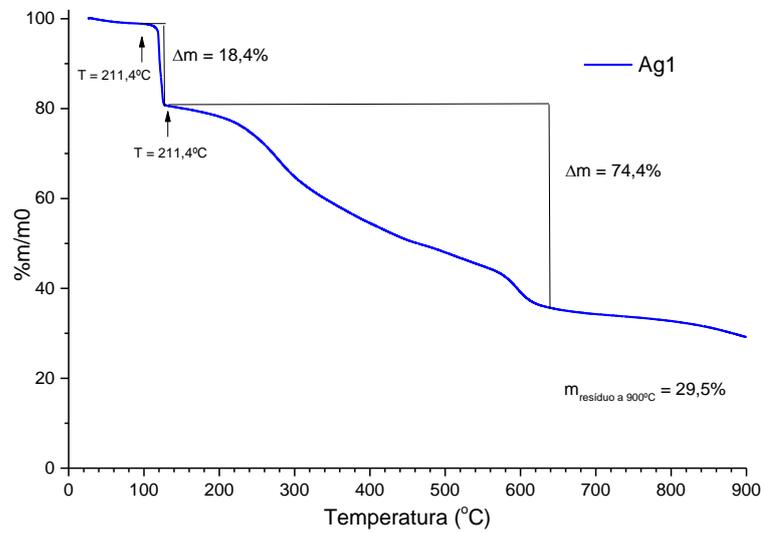
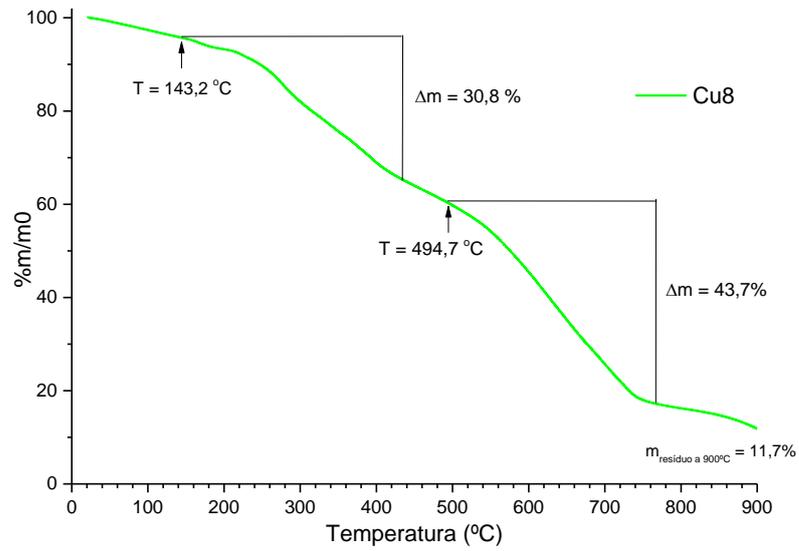
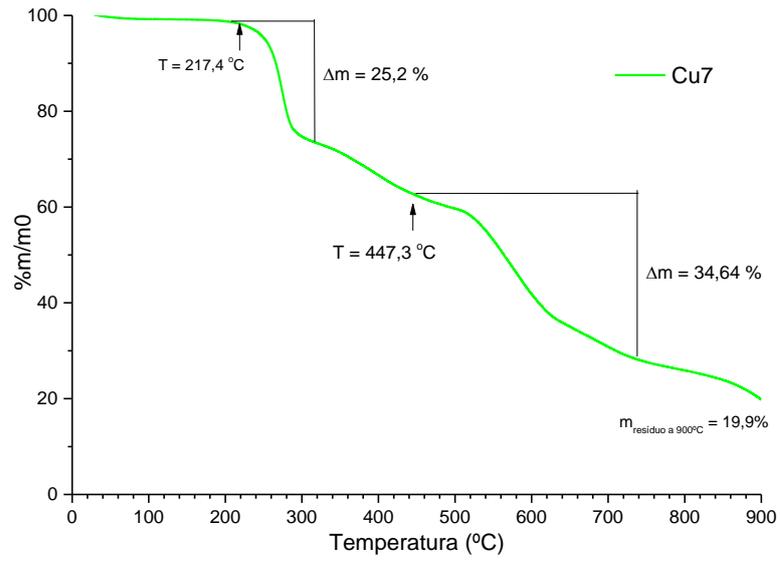


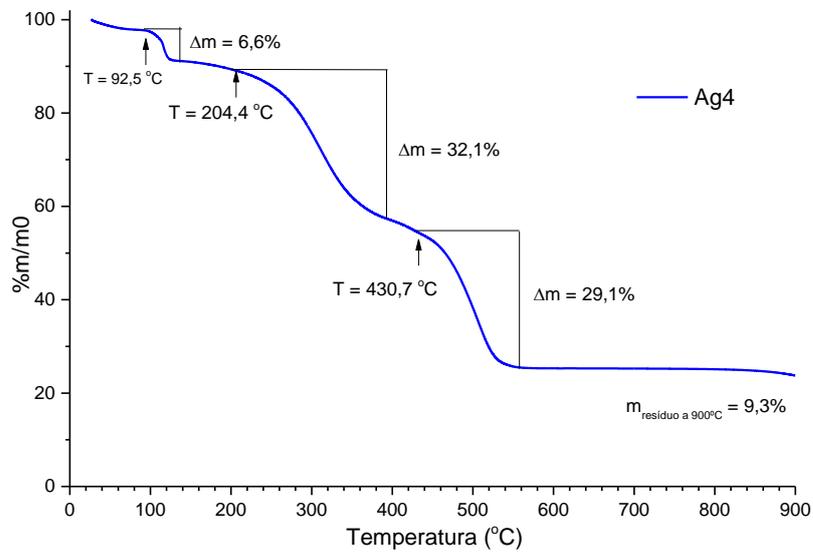
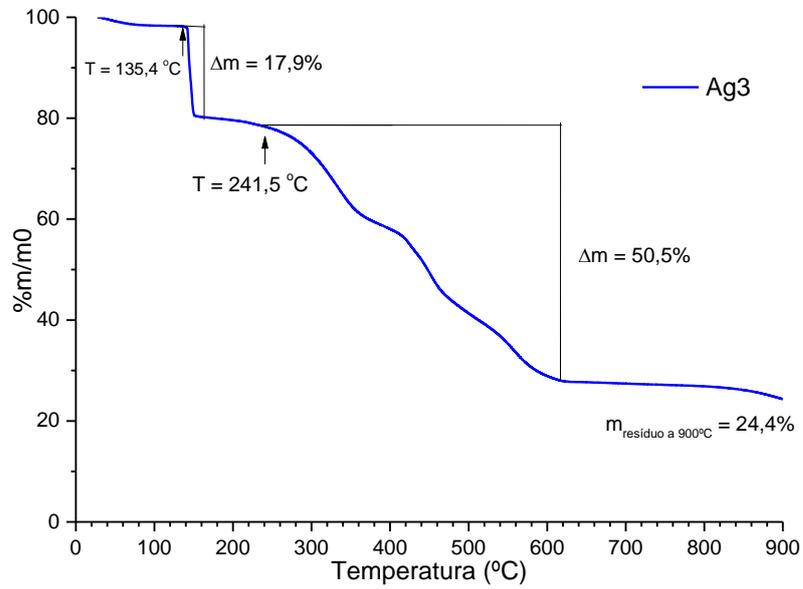
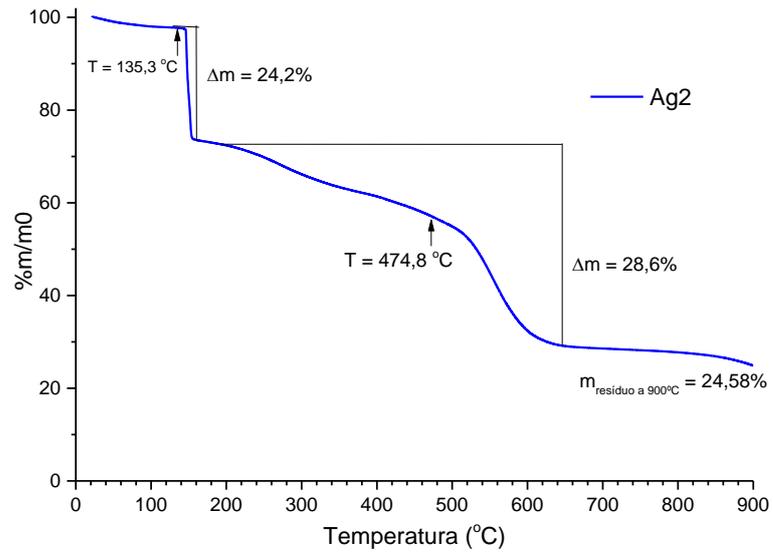


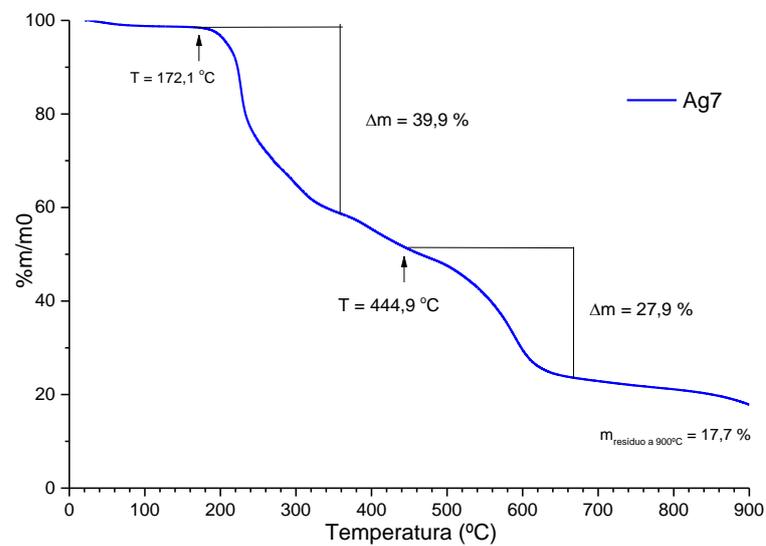
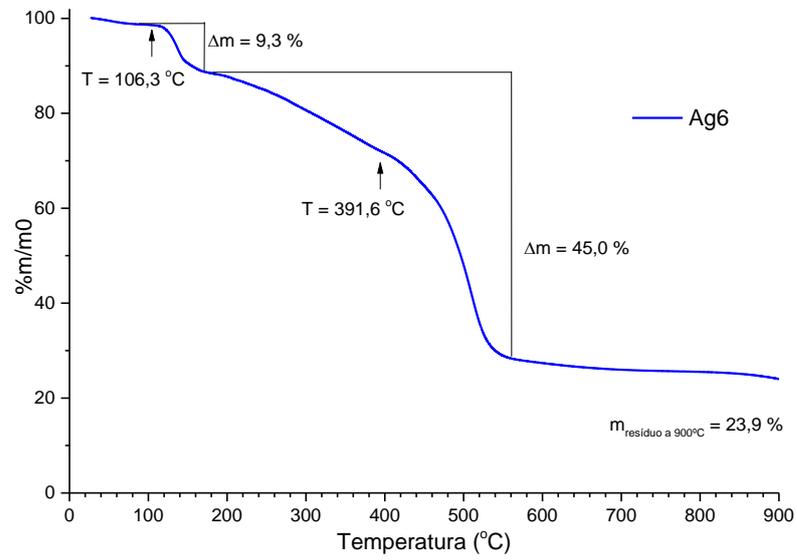
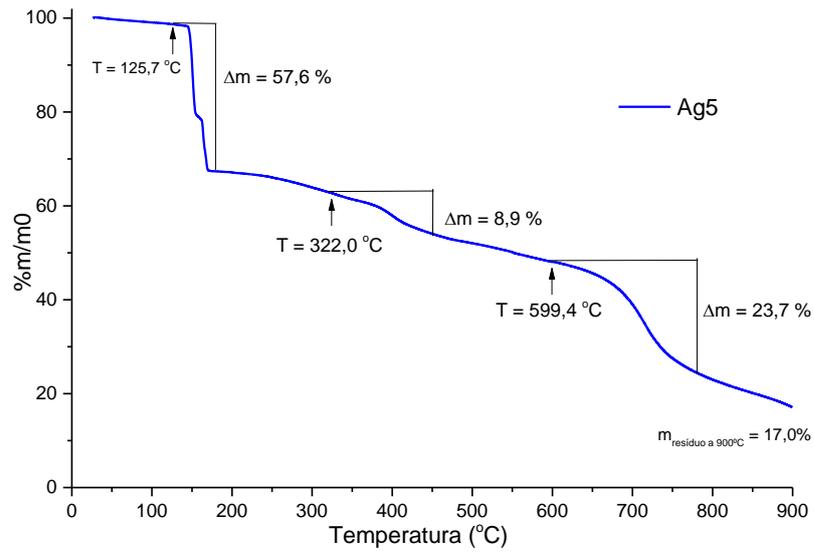


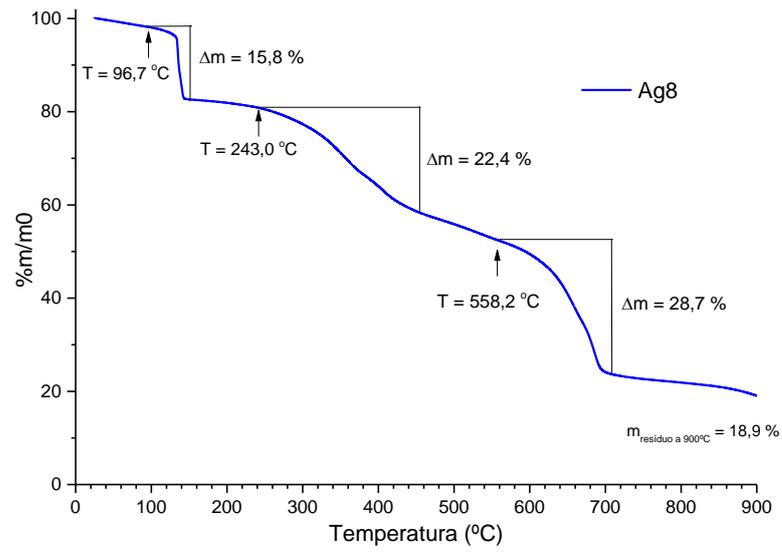












**APÊNDICE D – Curvas dos estágios de desenvolvimento em função do tempo de exposição às tiossemicarbonas HL3 - HL8 e seus complexos de Cu(I) (Cu3 - Cu8) na concentração de 10  $\mu$ M**

