



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

**JENIFER CARVALHO GROSSI**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS  
DE BENZALDEÍDO, ACETOFENONA E BENZOFENONA FRENTE A  
LARVAS DE *Aedes aegypti***

**GOVERNADOR VALADARES - MG**

**2018**

**JENIFER CARVALHO GROSSI**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS  
DE BENZALDEÍDO, ACETOFENONA E BENZOFENONA FRENTE A  
LARVAS DE *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) do Instituto de Ciências da Vida da Universidade Federal de Juiz de Fora – *campus* Governador Valadares, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

**Orientador: Prof. Dr. Jeferson Gomes da Silva**

**GOVERNADOR VALADARES - MG**

**2018**

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.

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE BENZALDEÍDO, ACETOFENONA E BENZOFENONA FRENTE A LARVAS DE *Aedes aegypti* / Jenifer Carvalho Grossi. -- 2018.

96 p.

Orientador: Jeferson Gomes da Silva

Dissertação (mestrado acadêmico) - 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, 2018.

1. tiossemicarbazonas. 2. atividade larvicida. 3. *Aedes aegypti*. I. Gomes da Silva, Jeferson , orient. II. Título.

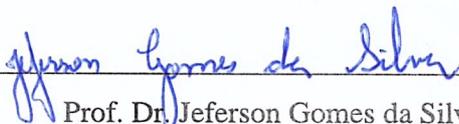
JENIFER CARVALHO GROSSI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS  
DE BENZALDEÍDO, ACETOFENONA E BENZOFENONA FRENTE A  
LARVAS DE *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) do Instituto de Ciências da Vida da Universidade Federal de Juiz de Fora – *campus* Governador Valadares, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: 26 / 03 / 2018

BANCA EXAMINADORA



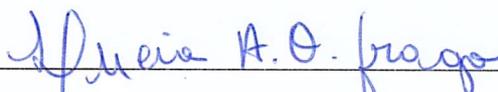
Prof. Dr. Jeferson Gomes da Silva - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares



Prof. Dr. Caio César de Souza Alves

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Campus Teófilo Otoni



Prof. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Alves de Oliveira Fraga

Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Edner Carvalho Gomes e Jaqueline Grossi Carvalho, por todos os ensinamentos, força e incentivo. Pela presença em todos os momentos difíceis vividos nesses últimos dois anos. Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de tê-los como pais e tudo que tenho hoje é fruto do que fizeram e do que ainda fazem por mim. Ofereço, com amor e carinho.

## 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 amigo-orientador Jeferson, pelo exemplo de pesquisador, incentivador, pela paciência, pelo grande caráter, repleto de humildade, profissionalismo, por ter me aceitado como sua orientanda e contribuído tanto para concretizar esta grande conquista. Obrigada pelos conselhos, por ser tão presente, pelo entusiasmo, otimismo, pela 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.

As amigas de mestrado Elaine, Kátia, Kênia, Mariany e Thaisa pela ajuda conjunta, pelo apoio, pela amizade e trocas de informações. O mestrado com certeza se tornou mais leve e feliz com a alegria e presença de vocês.

Aos amigos da UFJF-GV Ana, Bolivar, Bruno, Juliano, Letícia, Romário, Sheyla, Vanessa Bittencout e Vanessa Medeiros pelas horas de descontração, pelo incentivo e colaboração. Em especial Duílio, Graziella e Mariany pela paciência, companheirismo e por suportar tantas lamentações durante esses dois longos anos.

A Joicy pela paciência e dedicação em responder as nossas dúvidas e solucionar os nossos problemas relacionados ao programa de pós-graduação.

A Ana Maria e Vanessa pelos conselhos e trocas de experiências vividas.

Aos alunos de iniciação científica, Ewérton, Alan e Rafael pela colaboração nos experimentos.

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

Aos colaboradores do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos da Universidade Federal de Viçosa, Professor Dr. Gustavo, Kenner e Franciane pela doação dos ovos e colaboração nos experimentos.

Ao professor Dr. Rodrigo Moreira Verly do Departamento de Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri Campus Diamantina.

A minha amada filha, Ana Júlia, que mesmo tão pequena compreendeu minhas ausências e me recebia com tanto amor depois das longas horas na universidade. Você me deu mais energia para seguir em frente e deixou mais leve os meus dias.

Ao meu marido, Jordani, pela compreensão e apoio.

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo e apoio em especial a minha irmã Mariana.

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

“Coragem não é falta de medo, é capacidade de enfrentá-lo.  
Coragem sem competência é aventura e, para não ser imprudente, é preciso audácia e conhecimento.”

Mário Sérgio Cortella.

## RESUMO

As tiossemicarbazonas são uma classe de compostos químicos com amplo perfil farmacológico, contudo há poucos estudos sobre sua toxicidade em insetos. O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é na atualidade um dos mosquitos que mais tem causado problemas de saúde pública, devido ao seu potencial de disseminar doenças, como dengue, febre amarela, chikungunya e zika. Entre as estratégias mais eficientes no controle dessas doenças está o combate ao vetor. No entanto, o número limitado de agentes larvicidas e o surgimento de mosquitos resistentes podem comprometer esse combate, o que tem motivado a busca por novas moléculas que podem atuar como larvicidas. Neste trabalho foi avaliada a toxicidade de uma série de quatorze tiossemicarbazonas derivadas de benzaldeído, acetofenona e benzofenona contra larvas do *Aedes aegypti*. Os compostos foram preparados e caracterizados a partir de seus espectros de infravermelho e ressonância magnética nuclear, bem como, por sua estabilidade coloidal em solução aquosa com dimetilsulfóxido 1%. A toxicidade dos compostos em concentrações na faixa de 0,1 a 100  $\mu\text{M}$  foi avaliada frente a larvas no estágio L4, sendo demonstrado que as tiossemicarbazonas derivadas de benzofenona apresentam atividade larvicida. O comportamento de nado e a morfologia externa e das células do intestino médio foram avaliados para os compostos que apresentaram atividade larvicida, sendo observado a redução da mobilidade, deformidade de algumas larvas e alterações nas células após a exposição com tiossemicarbazonas. Ensaios de imunofluorescência utilizando os anticorpos anti-fosfohistona H3, anti-proteína de cadeia leve 3 associada a microtúbulos (anti-LC3A/B), anti-caspase-3 e anti-peroxidase foram realizados nas células do intestino médio das larvas. Esses resultados ressaltaram o efeito citotóxico das tiossemicarbazonas, contudo sem a participação dos processos de apoptose, autofagia e de enzimas peroxidase. Os resultados obtidos corroboram a potencial atividade larvicida das tiossemicarbazonas, mas a origem da sua citotoxicidade deve ser melhor investigada.

**Palavras chave:** tiossemicarbazonas, atividade larvicida, *Aedes aegypti*.

## ABSTRACT

The thiosemicarbazones are a class of chemical compounds with broad pharmacological profile, however, there is few studies on its toxicity in insects. Currently, *Aedes aegypti* mosquitoes (Linnaeus, 1762) has caused public health problems due to its potential for disease dissemination, such as dengue fever, yellow fever, chikungunya and zika. The fight against the vector is one of most efficient strategies used in the control of these diseases. However, the limited number of larvicidal agents and the emergence of resistant mosquitoes can compromise this fight, which has motivated the research for new molecules that can act as larvicides. In this work, a series of fourteen thiosemicarbazones derived from benzaldehyde, acetophenone and benzophenone against *Aedes aegypti* larvae were evaluated. The compounds were prepared and characterized by their infrared and nuclear magnetic resonance spectra as well as its colloidal stability in 1% DMSO aqueous solution. The larvicidal activity of the compounds, at concentration range from 0.1 to 100  $\mu\text{M}$ , was evaluated against larvae in the L4 stage, being that benzophenone-derived thiosemicarbazones demonstrated larvicidal activity. The swimming behavior and external and midgut cells morphology were evaluated for the active compounds. In these experiments were observed a reduction of mobility, deformity of some larvae and alterations in cells upon exposition to thiosemicarbazones. Immunofluorescence assays involving anti-phospho-histone H3, microtubule-associated protein light chain 3 antibody (anti-LC3A/B), anti-caspase 3, and anti-peroxidase antibodies were performed on midgut cells from larvae. These results highlight the cytotoxic effect of thiosemicarbazones, but without the participation of apoptotic and autophagic processes and peroxidase enzymes. The results obtained corroborate a potential larvicidal activity of thiosemicarbazones, however, the origin of its cytotoxicity should be better investigated.

**Keywords:** thiosemicarbazones, larvicidal activity, *Aedes aegypti*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b> – Gráficos do número de publicações por ano (1) e citações em cada ano (2) para os termos “ <i>thiosemicarbazone</i> ” (A) e “ <i>thiosemicarbazone and biological activity</i> ” (B) obtidos a partir de informações da base de dados <i>Web of Science</i> .....	16
<b>FIGURA 2</b> – Reação de formação de uma tiossemicarbazona.....	17
<b>FIGURA 3</b> – Representação esquemática de tiossemicarbazonas derivadas de benzaldeído (A), acetofenona (B) e benzofenona (C).....	17
<b>FIGURA 4</b> – Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> .....	20
<b>FIGURA 5</b> – Representação esquemática do sistema digestivo da larva de <i>Aedes aegypti</i> .....	22
<b>FIGURA 6</b> – Mecanismo de inibição da acetilcolinesterase por organofosforados.....	24
<b>FIGURA 7</b> – Representação esquemática do esqueleto base das benzoilfenilureias (A) e da molécula de piriproxifeno (B).....	25
<b>FIGURA 8</b> – Representação esquemática do aparato para realização do experimento de <i>Video Tracking</i> .....	27
<b>FIGURA 9</b> – Fluxograma apresentando as etapas desenvolvidas neste trabalho.....	30
<b>FIGURA 10</b> – Esquema do experimento para obtenção dos espectros na região do infravermelho.....	31
<b>FIGURA 11</b> – Esquema do experimento para determinação da turbidez da solução/suspensão em função do tempo.....	32
<b>FIGURA 12</b> – Esquema do processo de obtenção das larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	33
<b>FIGURA 13</b> – Representação esquemática do experimento para avaliação da atividade larvicida.....	34
<b>FIGURA 14</b> – Representação esquemática do experimento de comportamento de nado...	35
<b>FIGURA 15</b> – Representação estrutural das tiossemicarbazonas estudadas neste trabalho.....	37
<b>FIGURA 16</b> – Espectros na região do infravermelho do 4-nitrobenzaldeído, 4-feniltiossemicarbazida e 4-nitrobenzaldeído- <i>N</i> (4)-feniltiossemicarbazona na faixa de 4000 a 400 cm <sup>-1</sup> , em KBr.....	38
<b>FIGURA 17</b> – Espectros de RMN de <sup>1</sup> H das tiossemicarbazonas <b>6</b> (A) e <b>12</b> (B).....	40
<b>FIGURA 18</b> – Soluções/suspensões de calibração do turbidímetro submetidas a iluminação por um laser vermelho para visualização do efeito Tyndall.....	43

<b>FIGURA 19</b> – Curvas de turbidez em função do tempo para os compostos <b>5 (A)</b> e <b>6 (B)</b> em solução aquosa com DMSO 1%.....	43
<b>FIGURA 20</b> – Curvas de porcentagem de mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> no estágio L4 em função do aumento da concentração para os compostos <b>2</b> e <b>13</b> .....	45
<b>FIGURA 21</b> – Comportamento de nado das larvas de <i>Aedes aegypti</i> no estágio L4 após 3, 5 e 24 horas de exposição às tiossemicarbazonas <b>8, 11–14</b> na concentração de 50 µM..	47
<b>FIGURA 22</b> – Fotomicrografia de lâminas preparadas com larvas que sobreviveram após 5, 24 e 48 horas de exposição às tiossemicarbazonas na concentração de 50 µM.....	49
<b>FIGURA 23</b> – Cortes histológicos do intestino médio de larvas no estágio L4 de <i>Aedes aegypti</i> dos grupos controle (água e DMSO 1%) e tratados com as tiossemicarbazonas <b>8, 11 – 14</b> na concentração de 50 µM. ....	51
<b>FIGURA 24</b> – Fotomicrografia dos ensaios de imunofluorescência para marcação dupla com os anticorpos anti-fosfohistona H3 (PH3) e anti-caspase 3 para o controle positivo (A = pupa branca) e grupo tratado com a tiossemicarbazona <b>14</b> .....	52
<b>FIGURA 25</b> – Contagem de células positivas para marcação de fosfo-histona 3 para os grupos controles e tratados com as tiossemicarbazonas <b>8, 11-14</b> .....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Potenciais alvos biológicos atribuídos as tiossemicarbazonas e seus complexos.....	19
<b>TABELA 2</b> – Deslocamentos químicos de hidrogênios (ppm) para as tiossemicarbazonas <b>1-14</b> .....	39
<b>TABELA 3</b> – Parâmetros físico-químicos calculados para as tiossemicarbazonas <b>1-14</b> .....	41
<b>TABELA 4</b> – Toxicidade das tiossemicarbazonas <b>1 - 14</b> frente a larvas de <i>Aedes aegypti</i> no estágio L4.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

AchE	Acetilcolinesterase
AeSCP-2	Proteína transportadora de esterol 2 de <i>Aedes aegypti</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i>
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DL <sub>50</sub>	Dose letal a 50% dos indivíduos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
IGRs	<i>Insect Growth Regulator</i> - reguladores de crescimento de insetos
IV	Infravermelho
LC3 A/B	Proteína de cadeia leve 3 associada a microtúbulos
log P	Logaritmo do coeficiente de partição
log S	Logaritmo da solubilidade limite do composto em água
L1	Primeiro estágio larval
L2	Segundo estágio larval
L3	Terceiro estágio larval
L4	Quarto estágio larval
LIRAA	Levantamento rápido de índice para <i>Aedes aegypti</i>
MoReNAa	Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de <i>Aedes aegypti</i>
NMM-UFV	Núcleo de Microscopia e Microanálises da Universidade Federal de Viçosa
NTU	Unidade nefelométrica de turbidez
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PBST	Tampão fosfato salino Triton-X 100
PH3	Fosfohistona H3
pKa	Negativo do logaritmo da constante de dissociação ácida

ppm	Partes por milhão
RDR	Ribonucleotídeo redutase
RMN	Ressonância magnética nuclear
RR	Ribonucleotídeo redutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TMS	Tetrametilsilano
TRITC	Isotiocianato de tetrametilrodamina
TrxR	Tiorrexina redutase
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
1.1	Os compostos a serem estudados: as tiossemicarbazonas	16
1.2	O mosquito <i>Aedes aegypti</i>	20
1.3	O controle do vetor	24
1.4	Metodologias utilizadas na avaliação da toxicidade de novos compostos	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	29
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	30
3.1	Preparação das tiossemicarbazonas	30
3.2	Caracterização	30
<u>3.2.1</u>	<u>Caracterização no estado sólido</u>	31
3.2.1.1	<i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)</i>	31
<u>3.2.2</u>	<u>Caracterização em solução/suspensão</u>	31
3.2.2.1	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	31
3.2.2.2	<i>Turbidimetria</i>	32
3.3	Ensaio biológico	32
<u>3.3.1</u>	<u>Avaliação da toxicidade de tiossemicarbazonas frente à larvas no estágio L4 de <i>Aedes aegypti</i></u>	33
<u>3.3.2</u>	<u>Avaliação do comportamento de nado das larvas no estágio L4 de <i>Aedes aegypti</i> durante a exposição às tiossemicarbazonas</u>	34
<u>3.3.3</u>	<u>Análises morfológicas de larvas no estágio L4 de <i>Aedes aegypti</i> após exposição às tiossemicarbazonas</u>	35
3.3.3.1	<i>Avaliação da morfologia externa das larvas após exposição às tiossemicarbazonas</i>	35
3.3.3.2	<i>Cortes histológicos do intestino médio das larvas no estágio L4 de <i>Aedes aegypti</i> após exposição às tiossemicarbazonas</i>	35
<u>3.3.4</u>	<u>Ensaio de imunofluorescência em células do intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i></u>	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	37
4.1	Caracterização das tiossemicarbazonas no estado sólido	37
4.2	Caracterização das tiossemicarbazonas em solução/suspensão	38
4.2.1	<u>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</u>	38
4.2.2	<u>Turbidimetria</u>	41

<b>4.3</b>	<b>ENSAIOS BIOLÓGICOS</b>	44
4.3.1	<u>Avaliação da toxicidade de tiossemicarbazonas frente a larvas no estágio L4 de <i>Aedes aegypti</i></u>	44
4.3.2	<u>Avaliação do comportamento de nado das larvas no estágio L4 de <i>Aedes aegypti</i> durante a exposição às tiossemicarbazonas</u>	46
4.3.3	<u>Avaliação da morfologia externa das larvas no estágio L4 de <i>Aedes aegypti</i> após exposição às tiossemicarbazonas</u>	48
4.3.4	<u>Análise dos cortes histológicos do intestino médio das larvas no estágio L4 de <i>Aedes aegypti</i> após exposição às tiossemicarbazonas</u>	50
4.3.5	<u>Análise dos ensaios de imunofluorescência em células do intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i></u>	52
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	55
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	56
<b>7</b>	<b>APÊNDICES</b>	64
A1	<b>Espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas estudadas nesse trabalho</b>	65
A2	<b>Espectros de ressonância magnética nuclear das tiossemicarbazonas estudadas nesse trabalho</b>	70
A3	<b>Gráficos de turbidez em função do tempo para as tiossemicarbazonas estudadas nesse trabalho</b>	77
A4	<b>Curvas de porcentagem de mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> no estágio L4 em função do aumento da concentração dos compostos 1 a 14.</b>	84
A5	<b>Cortes histológicos do intestino médio de larvas no estágio L4 de <i>Aedes aegypti</i> dos grupos controle e tratados com as tiossemicarbazonas 8, 11 – 14.</b>	89
A6	<b>Fotomicrografia dos ensaios de imunofluorescência para marcação dupla com os anticorpos anti-fosfohistona H3 (PH3) e anti-caspase 3 no intestino médio das larvas de <i>Aedes aegypti</i> para os grupos controle e tratados com as tiossemicarbazonas 8, 11 – 14.</b>	93

## 1. INTRODUÇÃO

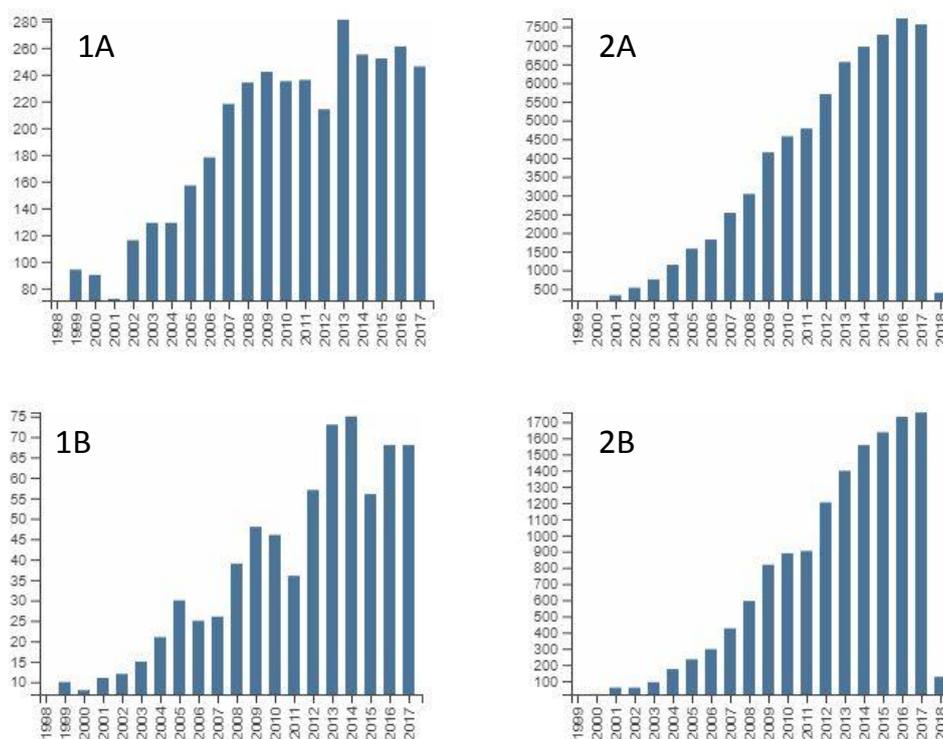
O processo de pesquisa e desenvolvimento de novos produtos é complexo, longo e oneroso. O primeiro estágio de qualquer inovação nesse sentido passa pela obtenção de um composto bioativo. A partir daí, testes *in vitro* e/ou *in vivo* são realizados para quantificar as propriedades biológicas dessa molécula ou seus derivados. Nesse momento, os conhecimentos da química e biologia se tornam fundamentais para que seja possível compreender e melhorar sua atividade biológica.

Historicamente, a descoberta de compostos bioativos sempre esteve relacionada a produtos naturais, como no caso da utilização da casca de salgueiro descrita no Papiros Ebers pelos egípcios no tratamento de inflamações que culminou na descoberta da salicilina (JACK, 1997). Contudo, é inegável que a química sintética contribuiu enormemente para melhoria da atividade biológica, como o desenvolvimento do ácido acetilsalicílico (JACK, 1997) e dos organoclorados, como o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) que foi o primeiro inseticida de efeito prolongado usado no controle de insetos em meados do século XX (BRAGA; VALLE, 2007).

Uma classe de compostos de origem puramente sintéticos que tem sido extensivamente estudada pelo seu amplo perfil farmacológico é das tiossemicarbazonas (BERALDO; GAMBINO, 2004; TENÓRIO et al., 2005). A relevância desses compostos pode ser demonstrada na Figura 1, onde em uma busca na base de dados “*Web of Science*” usando os termos “tiossemicarbazona” e “tiossemicarbazona e atividade biológica” foi observado um crescente aumento no número de publicações e citações nos últimos 20 anos. Contudo, poucos são os trabalhos relacionando a atividade inseticida desses compostos.

Nos últimos 20 anos, um inseto que tem causado graves problemas de saúde pública no Brasil é o *Aedes aegypti*. Ele é responsável pela transmissão de várias doenças como a dengue, a febre amarela, a chikungunya e a zika. Devido esse mosquito apresentar hábitos que dificultam seu controle com inseticidas para fase adulta (adulticidas), o combate ao vetor é focado no controle físico e/ou químico dos potenciais criadouros de suas larvas (ZARA et al., 2016). Isso também torna suas larvas um interessante alvo a ser estudado em pesquisas visando o desenvolvimento de agentes larvicidas.

**Figura 1** – Gráficos do número de publicações por ano (1) e citações em cada ano (2) para os termos “thiosemicarbazone” (A) e “thiosemicarbazone and biological activity” (B) obtidos a partir de informações da base de dados *Web of Science*.



Fonte: <https://clarivate.com/products/web-of-science/>.

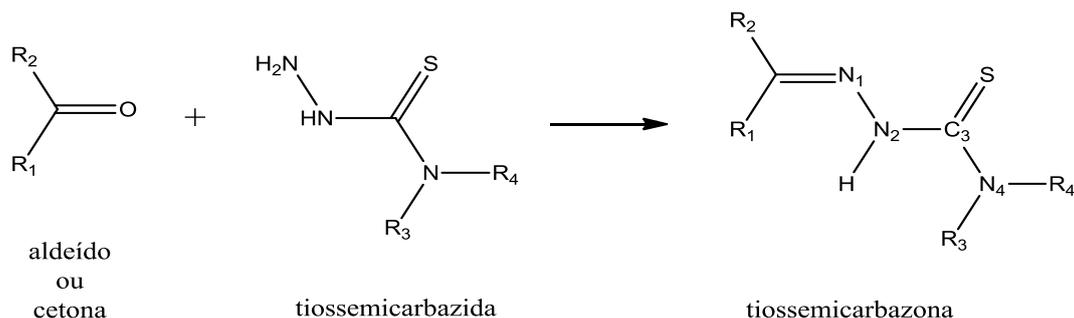
Uma vez que existe um número limitado de inseticidas, pouca variabilidade de seus mecanismos de ação no inseto e o aparecimento de casos de resistência aos mesmos, esses são fatores motivadores para a pesquisa por novas moléculas que sejam eficazes no combate de mosquitos vetores.

Objetivando contribuir nessa busca, no presente trabalho serão apresentados os resultados para a avaliação da toxicidade de uma série de tiossemicarbazonas frente às larvas de *Aedes aegypti*.

### 1.1 Os compostos a serem estudados: as tiossemicarbazonas

Do ponto de vista químico, tiossemicarbazonas apresentam como estrutura base o esqueleto  $C=N-N-C(=S)-N$ . A reação mais simples para formação desses compostos é a condensação de uma tiossemicarbazida com aldeído ou cetona (Figura 2), sendo a mesma conhecida por sua alta quimiosseletividade, versatilidade, rapidez e altos rendimentos.

**Figura 2** – Reação de formação de uma tiossemicarbazona.

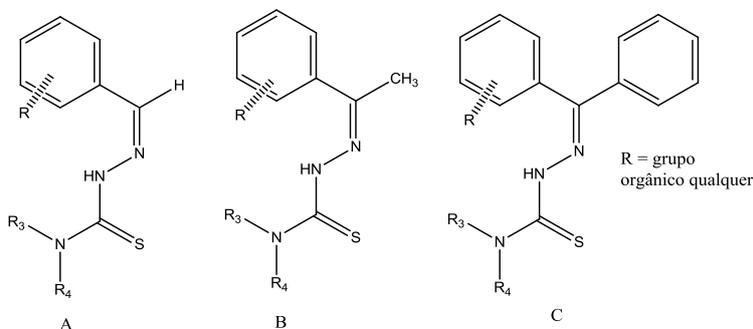


Fonte: própria autora.

Uma das aplicações desses compostos é na síntese de heterocíclicos, como tiazóis, 1,3,4-tiadiazóis, 1,2,4-triazinas, 1,2,4-ditiazolidinas, 4-tiazolidinonas e 5-aminopirazóis (CHANDRA; SRIVASTAVA, 1983; CHAUVIÈRE et al., 2003; IVANCHTCHENKO et al., 2002; REEVE; BARRON, 1975; SARODNICK et al., 2003; TENÓRIO et al., 2005; ULLAS et al., 1988). De modo geral, as tiossemicarbazonas são de fácil estocagem, não necessitando de armazenagem especial, nem tampouco são sensíveis à luz (TENÓRIO et al., 2005).

As tiossemicarbazonas podem ser obtidas dos mais variados precursores carbonílicos, tais como flavonoides (BROWDOSKA et al., 2016), chalconas (SILVA et al., 2013), naftoquinona (SOUZA et al., 2013) entre outros, contudo é muito comum o relato da síntese de compostos derivados de benzaldeído, acetofenona e benzofenona. Isto se deve ao fato desses precursores serem facilmente adquiridos, além da possibilidade da modificação química no núcleo aromático.

**Figura 3** – Representação esquemática de tiossemicarbazonas derivadas de benzaldeído (A), acetofenona (B) e benzofenona (C).



Fonte: própria autora.

Devido à presença do grupo imina ou azometina ( $C=N$ ), tiossemicarbazonas podem apresentar isômeros configuracionais *E* (trans) e *Z* (cis) sempre que o aldeído ou cetona utilizados na reação forem assimétricos. A isomerização é extremamente influenciada pela presença de ácido e pela natureza dos grupos substituintes ligados ao carbono azometínico, bem como pelos substituintes ligados ao nitrogênio da tioamida ( $N_4$ ) (TENÓRIO et al., 2005). No estado sólido é geralmente observada como misturas de isômeros *E* e *Z* (LEMKE et al., 1977), enquanto que em solução ocorre a conversão do isômero *Z* para *E*, devido a sua maior estabilidade termodinâmica (OTA et al., 1998).

Do ponto de vista biológico, tiossemicarbazonas podem apresentar propriedades antitumorais (AFRASIABI, 2004), antivirais (BAL et al., 2005), antibacterianas (ZHAO et al., 2012), antifúngicas (ARAÚJO NETO et al., 2017), antiprotozoária (BHARTI et al., 2002), antimaláricas (KHANYE et al., 2010) e inseticida (SILVA et al., 2015). Mesmo tendo controvérsias quanto ao mecanismo de ação das tiossemicarbazonas, pode-se dizer que agem como inibidores de enzimas, interagem com biomoléculas (como o DNA), atuam como agentes quelantes (complexando com cátions metálicos endógenos) ou inibem/promovem reações de redox (Aput BERALDO, 2004). Um dos supostos alvos de tiossemicarbazonas é a enzima ribonucleotídeo redutase (RDR), que catalisa a síntese de desoxirribonucleotídeos a partir de nucleotídeos, um passo limitante para produção de DNA e, conseqüentemente, para a divisão celular (FUJII et al., 2015). Além disso, a formação de complexos metálicos com tiossemicarbazonas pode levar a uma melhora significativa de atividades biológicas em relação aos ligantes livres (BERALDO; GAMBINO, 2004; TAVARES et al., 2017). Na Tabela 1 estão relacionados alguns potenciais alvos biológicos atribuídos as tiossemicarbazonas e seus complexos.

O modo de ação desses compostos também pode variar significativamente dependendo da modificação química que é feita na sua estrutura. Um exemplo desse comportamento é observado nos nitrocompostos, que apesar de não apresentar seu mecanismo de ação totalmente conhecido, é consenso que ele esteja ligado ao processo de redução do grupo nitro e à subseqüente interação dos produtos formados com biomoléculas no meio biológico (DIAS et al., 2015; PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009).

**Tabela 1** – Potenciais alvos biológicos atribuídos as tiossemicarbazonas e seus complexos.

<b>Forma da tiossemicarbazona</b>	<b>Atividade biológica</b>	<b>Potencial alvo</b>	<b>Referência</b>
Livre	Antitumoral	Inibição da ribonucleotídeo redutase (RDR)	(MATSUMOTO et al., 2017)
Livre	---	Tirosinase/Fenoloxidase	(SOARES et al., 2017), (XUE et al., 2007)
Complexada com cobre	Citotóxica	Interação com DNA	(BISCEGLIE et al., 2018), (ROGOLINO et al., 2017), (VUTEY et al., 2016)
Livre	Doença de Alzheimer	Inibição de acetilcolinesterase Diminuição dos agregados de placa $\beta$ -mielóide	(PALANIMUTHU et al., 2017)
Complexada com ouro	Citotóxica	Inibe tiorrexina redutase (TrxR)	(TAVARES et al., 2017)
Livre	Antibacteriana <i>Helicobacter pylori</i>	Urease	(ARSHIA et al., 2016)
Livre	Anti-chagásica	Cisteíno protease	(GREENBAUM et al., 2004)
Livre	Antiviral	Vírus da imunodeficiência adquirida	(BAL et al., 2005)
Complexada com cádmio	Antifúngica	Fungos	(ALOMAR et al., 2013)

Fonte: própria autora.

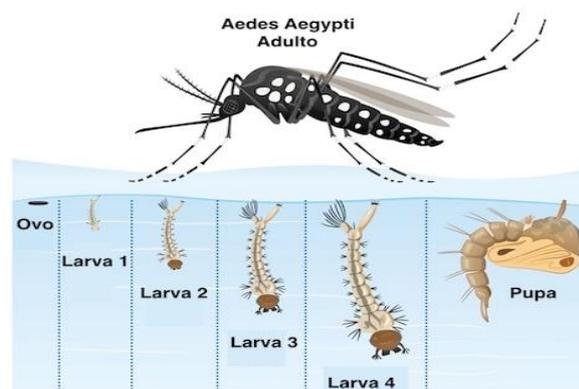
Apesar das tiossemicarbazonas serem muito estudadas pelo seu potencial citotóxico e antimicrobiano, poucos são aqueles relacionados à sua atividade inseticida. O estudo mais importante nesse sentido foi o desenvolvido por Silva et al. (2015) que trata da avaliação da atividade de algumas aril- e fenoximetiltiossemicarbazonas frente a larvas de *Aedes aegypti*. Nesse trabalho foi observado que a modificação química na porção proveniente do aldeído, o logaritmo do coeficiente de partição (logP) e o momento dipolar da molécula interferem na atividade larvicida. Contudo, nesse trabalho não foi apresentado nenhum dado sobre a extensão dos danos causados as larvas e não foi explorado o mecanismo de ação desses compostos, sendo apenas relacionada sua afinidade pela proteína transportadora de esterol 2 de *Aedes aegypti* (AeSCP-2) (SILVA et al., 2015).

## 1.2 O mosquito *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* é uma espécie de mosquito pertencente ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Díptera, família Culicidae e subfamília Culicinae disseminada por todo o mundo, em especial em áreas tropicais e subtropicais. É facilmente reconhecido por apresentar cor preta com listras brancas em seu abdômen e pernas. Possui hábitos diurnos e está adaptado ao ambiente urbano (FUNASA, 2001; NATAL, 2002).

O ciclo biológico de desenvolvimento desse mosquito é composto por quatro fases ou estágios, sendo elas: ovo, larva, pupa e adulto, nas quais ocorre uma metamorfose completa do indivíduo (Figura 4). A fase larvária é dividida em quatro estádios bem definidos (L1 – L4) com três mudas do exoesqueleto (ecdise) e a duração depende de vários fatores como temperatura, quantidade de alimento e número de larvas no criadouro (FUNASA, 2001).

**Figura 4** – Ciclo de vida do *Aedes aegypti*.



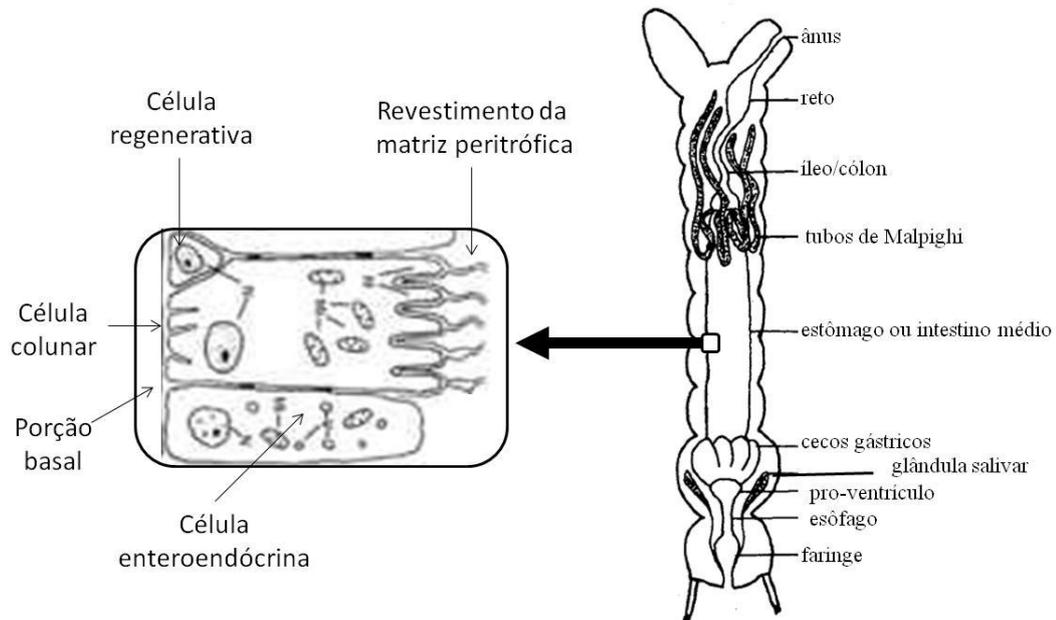
Fonte: <https://www.tuasaude.com/ciclo-de-vida-do-aedes-aegypti/>.

Os ovos do *Aedes aegypti* possuem formato alongado e fusiforme. Durante a ovoposição são inicialmente brancos e posteriormente pretos medindo cerca de um milímetro de comprimento. Eles são colocados individualmente pelas fêmeas nas paredes internas dos potenciais criadouros, próximo a superfície d'água. A fecundação acontece na postura e o embrião se desenvolve em dois dias, se as condições climáticas forem favoráveis. Após essa fase, os ovos ficam resistentes à dessecação por grandes períodos que superam um ano (FUNASA, 2001). Isso contribui para a migração dessa espécie por grandes territórios ocorrendo até mesmo entre continentes (TAUIL, 2001). A eclosão ocorrerá quando os ovos estiverem expostos diretamente à água dando origem às larvas, o que ocorre geralmente durante o período chuvoso.

As larvas desenvolvem-se na água e alimentam-se de matéria orgânica acumulada ao redor e no fundo dos criadouros. Durante a alimentação, as peças bucais movem-se fazendo com que a água flua em direção à cabeça, trazendo as partículas que podem ser ingeridas diretamente dependendo do seu tamanho, ou trituradas com o auxílio das mandíbulas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Na Figura 5 está apresentado o sistema digestivo da larva. O intestino médio (mesêntero) é o principal órgão desse sistema, sendo responsável pela produção de enzimas digestivas e absorção dos produtos digeridos. Ele é constituído de células cilíndricas altas com microvilosidades em sua porção apical, enquanto que na região basolateral, se observa inúmeras invaginações de membrana. Além das células digestivas, o epitélio do intestino médio de *Aedes aegypti* é composto de mais dois tipos celulares, as células regenerativas e as enteroendócrinas (BILLINGSLEY, 1990).

Para respirar, as larvas sobem à superfície, movimentando-se em forma de S, e ficam dispostas verticalmente com o sifão respiratório posicionado na superfície do corpo d'água. Elas são sensíveis à luz e a movimentos repentinos na água, sempre aglomerando no fundo do recipiente como mecanismo de defesa (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). As larvas no estágio L1 são mais susceptíveis as variações no ambiente, diferentemente das larvas em estágio L4. A passagem de larva para pupa depende significativamente das condições ambientes, pode ocorrer em até cinco dias em condições favoráveis ou mesmo prolongar por várias semanas em condições com baixas temperaturas e pouco alimento (FUNASA, 2001).

**Figura 5** – Representação esquemática do sistema digestivo da larva de *Aedes aegypti*.



Fonte: Adaptado, (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

A pupa possui formato de vírgula, não se alimenta, e fica nesse estágio por dois a três dias quando então ocorre sua metamorfose para o inseto adulto. Nessa etapa, as pupas se posicionam próximas à superfície do corpo d'água e da parede do criadouro para que aconteça a ruptura do antigo exoesqueleto e o novo possa estar em contato com o ar promovendo seu endurecimento, bem como, das asas e a rotação da genitália em 180° (machos). Na fase adulta o tempo de vida médio dos mosquitos na natureza é cerca de 30 a 35 dias, podendo se acasalar a partir de 24 horas depois da última metamorfose (FUNASA, 2001). Sua alimentação é a partir de seiva vegetal ou néctar, porém após o acasalamento as fêmeas precisam de albumina para o amadurecimento dos ovos, justificando o fato delas serem hematófagas (SHIFF, 1998), sendo comum o repasto sanguíneo em vários indivíduos para atingir as quantidades necessárias dessa proteína.

Devido ao seu hábito alimentar e o fato de ser o transmissor de várias arboviroses, como a dengue, febre amarela, zika, chikungunya, febre do Nilo entre outras, esse mosquito representa um grave problema para a saúde pública gerando muitos gastos para a comunidade e o governo (KANTOR, 2016).

A dengue é certamente, em número de casos, a principal doença transmitida ao homem pelo *Aedes aegypti*. Ela tem como agente etiológico um vírus pertencente à família Flaviviridae, a mesma da febre amarela e zika (BRASIL, 2018). Ela pode ser causada por

cinco diferentes sorotipos: DENV 1, DENV 2, DENV 3, DENV 4 e DENV 5, sendo que no Brasil ainda não houve relatos de casos com o sorotipo DENV 5 (MUSTAFA et al., 2015). A primeira vez que a dengue foi identificada no Brasil foi no ano de 1986 e estima-se que no mundo ocorram 50 milhões de casos anualmente (BRASIL, 2017).

Outra doença que apresenta como vetor esse mosquito é a febre amarela. Apesar de haver vacina oferecida pelo Sistema Único de Saúde (SUS), nos últimos dois anos o Brasil enfrentou um surto da doença principalmente nos estados de Espírito Santo e Minas Gerais. Os casos normalmente ocorrem em zonas rurais ou próximas a florestas ou pessoas que tiveram contato com essas áreas (BRASIL, 2017).

A zika manifestou no Brasil pela primeira vez em 2015 e houve relatos de microcefalia e distúrbios neurológicos em recém-nascidos de mães que apresentaram sintomas da infecção durante a gestação (KANTOR, 2016). A Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou em 2016 a epidemia de zika vírus como uma emergência global de saúde pública devido ao seu potencial incapacitante. Além da relação com a microcefalia, existe um consenso que o zika vírus está relacionado com a síndrome de Guillain-Barré (OMS, 2016).

Já a chikungunya é uma arbovirose transmitida por um alphavírus que apareceu nas Américas em 2013 (KANTOR, 2016). A região Nordeste foi a que mais apresentou casos prováveis no ano de 2017.

Somente no Brasil, o governo liberou até o mês de setembro de 2017 cerca de R\$ 152 milhões em recursos para o combate ao *Aedes aegypti* (BRASIL, 2017). De acordo com os dados do Levantamento Rápido de Índice de Infestação pelo *Aedes aegypti* (LIRAA) desse mesmo ano cerca de 10% das cidades avaliadas encontram-se em situação de risco para surto de dengue, zika e chikungunya no país (BRASIL, 2017).

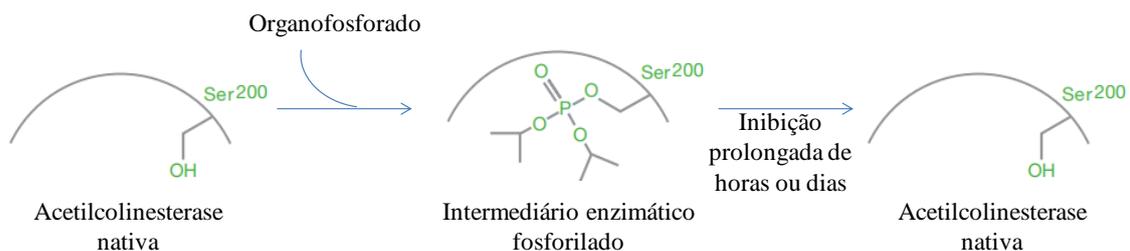
Devido ao fato de não existirem medicamentos específicos para eliminar o vírus de um indivíduo infectado, o tratamento das doenças causadas pelo *Aedes aegypti* é paliativo tendo como objetivo tratar os sintomas (ROSS, 2010). Existe vacina para dengue apenas na rede privada e ainda está em desenvolvimento para zika e chikungunya (BRASIL, 2017). Logo, as principais estratégias de controle dessas arboviroses têm como alvo o combate ao mosquito vetor com uso de inseticidas de forma a promover a redução dos focos, bem como campanhas de conscientização da população visando a destruição dos criadouros e cuidados para impedir sua reprodução (ROSE, 2001).

### 1.3 O controle do vetor

Os inseticidas podem ser divididos de acordo com a fase que atuam. Os adulticidas combatem os insetos adultos, os larvicidas atacam as larvas e os ovicidas atuam sobre os ovos (FORATTINI, 2002). O controle do *Aedes aegypti* utilizando adulticidas é pouco efetivo, pois apresenta alcance limitado e impacto ambiental significativo, sendo, portanto, uma medida adicional às ações públicas rotineiras e aplicada apenas para o bloqueio da transmissão em casos de surtos ou epidemias (BRASIL, 2009). No controle focal, quando não é possível a eliminação do criadouro, os larvicidas são aplicados a fim de interromper seu ciclo de vida (ANDRANDE; MODOLO, 1991). É importante ressaltar que o combate à fase larval é aquele que apresenta menor risco ao homem.

Entre os compostos que têm sido utilizados como larvicida pode-se destacar os organofosforados e análogos do hormônio juvenil. Os organofosforados são uma classe de compostos que veio substituir os organoclorados utilizados no combate de insetos na lavoura. Eles apresentam como vantagem serem biodegradáveis e não cumulativos em tecidos de vertebrados (BRAGA; VALLE, 2007). O temefós é o único recomendado pela OMS para controlar as larvas de mosquitos em água potável (WHO, 1996). Através do contato ou ingestão ele inibe a enzima colinesterase aumentando os impulsos nervosos e podendo levar a morte (SALGADO, 2013). O mecanismo pode ser exemplificado na Figura 6.

**Figura 6** – Mecanismo de inibição da acetilcolinesterase por organofosforados.



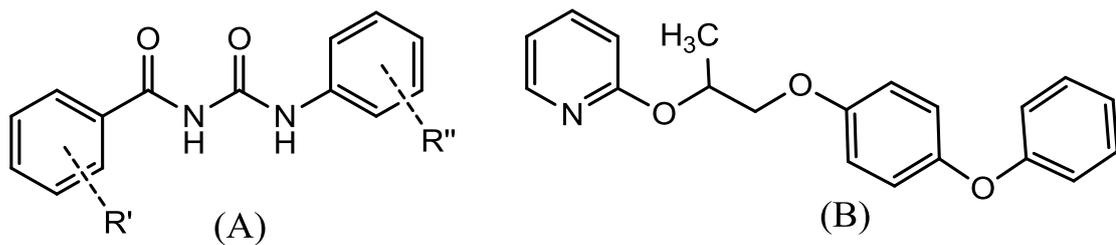
Fonte: Adaptado, SALGADO (2013).

Outro grupo de inseticidas descoberto mais recentemente são os reguladores de crescimento (ou IGRs, sigla derivada de *Insect Growth Regulator*), do tipo hormônio juvenil que alteraram a fisiologia essencial ao desenvolvimento dos insetos ou de sua progênie e parecem agir exclusivamente sobre insetos (SIDDALL, 1976). Eles têm como característica provocar uma morte lenta nas larvas seja durante sua emergência, ecdise ou mesmo na

transformação para pupa (MULLA, 1995). Alguns pesquisadores consideram os IGRs a terceira geração de inseticidas por não serem neurotóxicos.

De acordo com o mecanismo de ação, eles são divididos em três categorias: inibidores da síntese de quitina, miméticos de hormônios juvenis e análogos (juvenóides) e agonistas da ecdsona (GRAF, 1993). As benzoilfenilureias (Figura 7) atuam como inibidores da síntese de quitina, podendo interferir na expressão ou bloqueio da enzima quitina sintase (COHEN, 2001; COHEN, 1987; ZHANG; ZHU, 2006), na regulação hormonal da síntese de quitina (FOURNET et al., 1995), ou mesmo interferir no transporte dos monômeros de N-acetil-glicosamina necessários para síntese de quitina (GANGISHETTI et al., 2009). O piriproxifeno (Figura 7) é um bom representante da classe dos análogos do hormônio juvenil (SALGADO, 2013).

**Figura 7** – Representação esquemática do esqueleto base das benzoilfenilureias (A) e da molécula de piriproxifeno (B).



Fonte: própria autora.

Além desses alvos, outros têm sido explorados no desenvolvimento de novos agentes larvicidas, tais como os inibidores específicos de enzimas digestivas (proteases). Exemplos de estudos nesse sentido são os de Soares (2009, 2012) nos quais a autora identificou as proteases do tipo tripsina presente no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* e desenvolveu alguns inibidores específicos.

No entanto, o uso constante de alguns inseticidas tem induzido ao desenvolvimento de resistência, interrupção dos sistemas naturais de controle biológico, contaminação do meio ambiente e surtos de outras espécies de insetos (BRAGA; VALLE, 2007). A Organização Mundial da Saúde (OMS) define resistência como a capacidade de uma população de insetos em tolerar uma quantidade de inseticida que os matariam em condições normais (WHO, 1996).

Desde 1999 tem sido detectado através das análises realizadas pelos laboratórios da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas (MoReNAa)

o aparecimento da resistência ao temefós nos municípios brasileiros (BRAGA; VALLE, 2007). Contudo, um controle alternativo desse mosquito nos municípios onde foi constatada tal resistência só foi realizado depois do ano 2000, utilizando algumas formulações do biolarvicida *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) (MICHIGAN MOSQUITO CONTROL ASSOCIATION, 2002).

Desse modo, o número limitado de classes de compostos com comprovada atividade larvicida e o constante aparecimento de casos de resistência tem motivado a busca por novos compostos que sejam eficazes contra o vetor com baixa toxicidade ao meio ambiente e que possam apresentar mecanismo de ação diferente dos já elucidados.

#### **1.4 Metodologias utilizadas na avaliação da toxicidade de novos compostos**

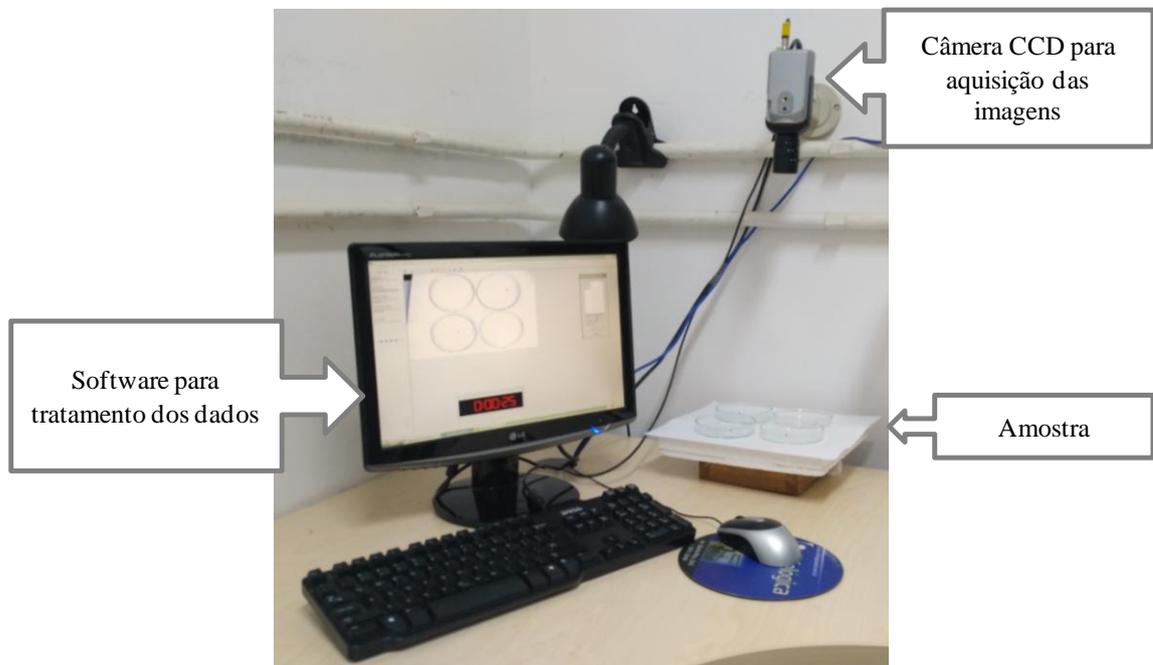
Os métodos comumente utilizados na avaliação da atividade larvicida em novos compostos são os preconizados pela OMS (WHO, 2005). Esses bioensaios baseiam-se na avaliação da toxicidade frente aos estádios desenvolvidos das larvas de mosquitos (L3 e/ou L4). Contudo, é importante obter informações sobre o mecanismo de ação, pois o experimento utilizado para compostos que tem comprovada atividade larvicida dentro de uma fase (teste da avaliação da toxicidade de compostos frente ao estágio L4 de larvas do mosquito) é diferente daqueles que atuam como reguladores do crescimento. A partir desses experimentos pode-se obter o valor da dose letal para 50% das larvas ( $DL_{50}$ ) que é um parâmetro importante para avaliar a toxicidade do composto.

Encontrar o mecanismo de ação de um composto bioativo nem sempre é uma tarefa fácil e vários são os exemplos de compostos que foram liberados para sua utilização final sem o completo conhecimento do mesmo, desde fármacos (pregabalina) (BLOMMEL et al., 2007) até mesmo os próprios inseticidas (piriproxifeno) (SALGADO, 2013). Os desafios vão da descoberta e isolamento do potencial alvo molecular até o desenvolvimento de metodologias que atestem a interação entre o composto e o alvo. Na ausência de um mecanismo de ação conhecido, experimentos comportamentais e *in vitro* podem ser úteis para compreender a potencial atividade biológica da molécula.

No estudo de insetos um experimento muito utilizado é o monitoramento de seus hábitos, sendo realizado a partir da gravação de imagens dos animais em condições controladas (ver exemplo de aparato para o *Video Tracking* na Figura 8) (NOLDUS; SPINK; TEGELENBOSCH, 2002; WILKINSON et al., 2014). Recentemente, o comportamento de voo de insetos tem sido utilizado para monitorar o comprometimento da

atividade locomotora em indivíduos não alvos, como a abelha, após a exposição aos inseticidas (LOPES et al., 2017). Portanto, o comportamento de nado pode ser um parâmetro interessante a ser avaliado durante o estudo da atividade larvicida de novos compostos, pois alterações na atividade locomotora em larvas estão relacionadas a danos em órgãos e tecidos ou mesmo ao sistema nervoso do inseto. Um exemplo de trabalho nesse sentido foi realizado por Tomé et al. (2014) que submeteram larvas (L4) e pupas de *Aedes aegypti* a diferentes concentrações dos inseticidas: azadiractina, deltametrina, imidaclopride e espinosade para avaliar o comportamento de nado, sendo observado que, com exceção da azadiractina, todos reduziram a velocidade de natação e os movimentos de contorção das larvas e pupas.

**Figura 8** – Representação esquemática do aparato para realização do experimento de *Video tracking*.



Fonte: própria autora.

Outro tipo de experimento útil no estudo de insetos é a avaliação de alterações na morfologia através de cortes histológicos. Alterações nas células do intestino médio têm sido utilizadas para investigar a extensão de lesões causadas por agentes tóxicos a larvas (VALOTTO et al., 2011; SCUDELER; SANTOS, 2013). Contudo, a detecção da proliferação de células regenerativas do intestino médio é limitada pelo fato das mesmas se dividirem pouco e em curtos períodos nos estádio/estágios mais desenvolvidos dos insetos, como demonstrado por Micchelli e Perrimon (2005) durante estudos de figuras de mitoses em análises morfológicas em *Drosophila melanogaster*. Isto leva a marcação de proteínas

relacionadas com processos mitóticos, como a fosfo-histona H3, serem mais interessantes no monitoramento da divisão das células regenerativas (MICCHELLI; PERRIMON, 2005).

Experimentos envolvendo inibidores de enzimas específicas são relevantes na investigação do mecanismo de morte celular. Um alvo interessante a ser investigado é a ativação de caspases que são uma família de cisteíno proteases que desempenham papéis importantes na apoptose e em outros processos celulares. Durante a apoptose, caspases iniciadoras são as primeiras ativadas após um sinal apropriado, podendo ser auto-ativadas com a ajuda de proteínas adaptadoras. Após sua ativação, elas clivam e ativam as caspases efetoras, que por sua vez visam vários substratos na célula, levando à apoptose e outros eventos de sinalização (LI; YUAN, 2008).

Outro mecanismo de morte celular é a macroautofagia, um processo catalítico para a degradação de componentes intracelulares nos lisossomos. Além de causar impacto na sobrevivência celular, esse processo é importante na imunidade inata e adaptativa, pois facilita a detecção e apresentação de antígenos de patógenos e promove a digestão de bactérias (ROMAO; MÜNZ, 2014). Durante a autofagia, o pré-autofagossomo engloba componentes do citosol, dentre eles organelas, e ao se fechar forma o autofagossomo que ao fundir com um lisossoma leva à degradação proteolítica dos componentes internos pelas enzimas líticas lisossomais. (TANIDA; UENO; KOMINAMI, 2004). A proteína de cadeia leve associada a microtúbulos LC3 é uma das proteínas codificadas durante a autofagia, sendo a única que se encontra em células eucariontes tornando-a um excelente marcador para monitorar experimentalmente (ROMAO; MÜNZ, 2014).

Uma vez que ocorre o dano celular devido à presença de substâncias exógenas, as células podem produzir proteínas, tais como as peroxidases, a fim de minimizar a extensão do mesmo. Essas enzimas contribuem para desintoxicação, estabilização de matrizes extracelulares e potencial envolvimento na imunidade dos insetos (ZHAO et al., 2001). Nos mosquitos essas proteínas possuem uma alta expressão, principalmente para adaptação ao ambiente terrestre sendo, portanto comum sua ativação após a ecdise de pupa para o inseto adulto (SABOIA-VAHIA et al., 2012). Sua baixa expressão nas pupas é explicada por ela está em fase de renovação do intestino, sem a ocorrência de digestão (FERNANDES, 2014). Desta forma, é esperado que caso ocorra danos as células essas enzimas possam vir a ser ativadas.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade de tiossemicarbazonas derivadas de benzaldeído, acetofenona e benzofenona contra larvas de *Aedes aegypti*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Preparar quatorze tiossemicarbazonas *N*(4)-substituídas derivadas de benzaldeído, acetofenona e benzofenona.
- Avaliar a estabilidade em solução/suspensão dessas tiossemicarbazonas.
- Avaliar a toxicidade dessas tiossemicarbazonas contra larvas de *Aedes aegypti* no estágio L4.
- Avaliar as alterações comportamentais causadas durante a exposição das larvas às tiossemicarbazonas.
- Avaliar as alterações morfológicas causadas pelas tiossemicarbazonas nas larvas de *Aedes aegypti*.
- Investigar potenciais mecanismos de ação dessas tiossemicarbazonas.

### 3 – PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Preparação das tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas utilizadas nesse trabalho foram preparadas pela reação direta de aldeído/cetonas com tiossemicarbazida, seguindo procedimentos descrito na literatura (TENÓRIO et al., 2005; PÉREZ-REBOLLEDO et al., 2007) e apresentado a seguir.

Em um balão de fundo redondo de 100 mL foi solubilizado o aldeído ou a cetona desejada (5 mmol) em 20 mL de etanol. Após a completa dissolução, 5 mmol da tiossemicarbazida foi adicionada. A mistura foi agitada e uma gota de ácido sulfúrico foi adicionada 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. O precipitado foi lavado com álcool isopropílico e armazenado em um dessecador por um período de dois dias.

#### 3.2 Caracterização

Esse trabalho foi dividido em três etapas, sendo duas delas relacionadas a caracterização das tiossemicarbazonas e a outra a avaliação da atividade biológica. Na Figura 9 está apresentado um fluxograma com todas as análises executadas em cada etapa do trabalho.

**Figura 9** - Fluxograma apresentando as etapas desenvolvidas neste trabalho.



Fonte: Própria autora.

A metodologia aplicada a cada uma das análises será melhor descrita a seguir.

### 3.2.1 Caracterização no estado sólido

#### *3.2.1.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)*

Os espectros na região do infravermelho médio ( $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ ) dos compostos puros foram registrados em um equipamento da Perkin Elmer, com transformada de Fourier, modelo Spectrum Two TM, 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 16 varreduras consecutivas, com resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$  e intervalo de onda de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ . Para a aquisição dos espectros foi utilizado o programa Perkin Elmer Spectrum ES (versão do aplicativo: 10.03.08.0133). Os dados foram exportados para edição no programa Microcal Origin 8.0. Pastilhas de KBr puro foram utilizadas como branco. Na Figura 10 estão apresentadas as etapas executadas para a obtenção dos espectros de infravermelho.

**Figura 10** - Esquema do experimento para obtenção dos espectros na região do infravermelho.



Fonte: Própria autora.

### 3.2.2 Caracterização em solução/suspensão

#### *3.2.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*

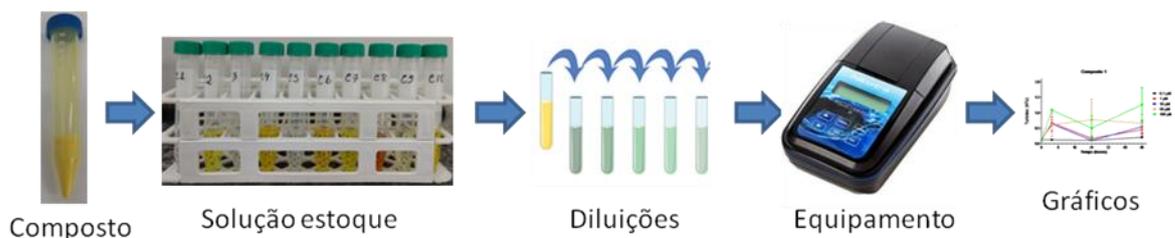
As análises de RMN de  $^1\text{H}$  dos compostos puros foram realizadas pelo professor Dr. Rodrigo Moreira Verly do Departamento de Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri Campus Diamantina. 30 mg de cada amostra foi dissolvida

em 500  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO-}d_6$ ) com tetrametilsilano (TMS). Os espectros dessas amostras foram adquiridos utilizando um espectrômetro Bruker Fourier 300 MHz e editados utilizando os programas TopSpin® 3.5 ou MestreNova®.

### 3.2.2.2 Turbidimetria

Soluções estoques foram preparadas a partir de quantidades equimolares de cada composto diluídos em DMSO. A partir destas soluções foram realizadas diluições em água Milli-Q dando origem às soluções/suspensões de trabalho nas concentrações de 100, 50, 10, 1 e  $0,1\mu\text{M}$  em DMSO 1%. O monitoramento da turbidez das soluções/suspensões foi realizado através de leituras imediatamente após as diluições e em intervalos de 5h, 24h e 48h. O equipamento utilizado foi um turbidímetro PoliControl Ap2000, previamente calibrado com suspensões padrões de sulfato de bário na faixa de 0,1 a 800 NTU (unidade nefelométrica de turbidez). Este experimento foi realizado em duplicata. As curvas de turbidez em função do tempo foram construídas utilizando o programa GraphPad Prism® 5.0. Na Figura 11 estão representadas as etapas envolvidas nesse experimento.

**Figura 11** - Esquema do experimento para determinação da turbidez da solução/suspensão em função do tempo.



Fonte: Própria autora.

### 3.3 Ensaios biológicos

Os ovos de *Aedes aegypti*, doados pelo professor Dr. Gustavo Ferreira Martins do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, foram colocados para eclodir em bacias plásticas contendo 2 L de água decolorada, em ambiente climatizado. Após 24 h, as larvas no estágio L1 foram transferidas para outra bacia contendo 2 L de água decolorada e cerca de 200 mg de alimento (ração de peixe GoldFish®). A partir daí a água foi trocada diariamente, fazendo reposição do alimento até os indivíduos atingirem o estágio de desenvolvimento necessário para cada teste descrito a seguir (ver esquema na Figura 12).

**Figura 12** - Esquema do processo de obtenção das larvas de *Aedes aegypti*.

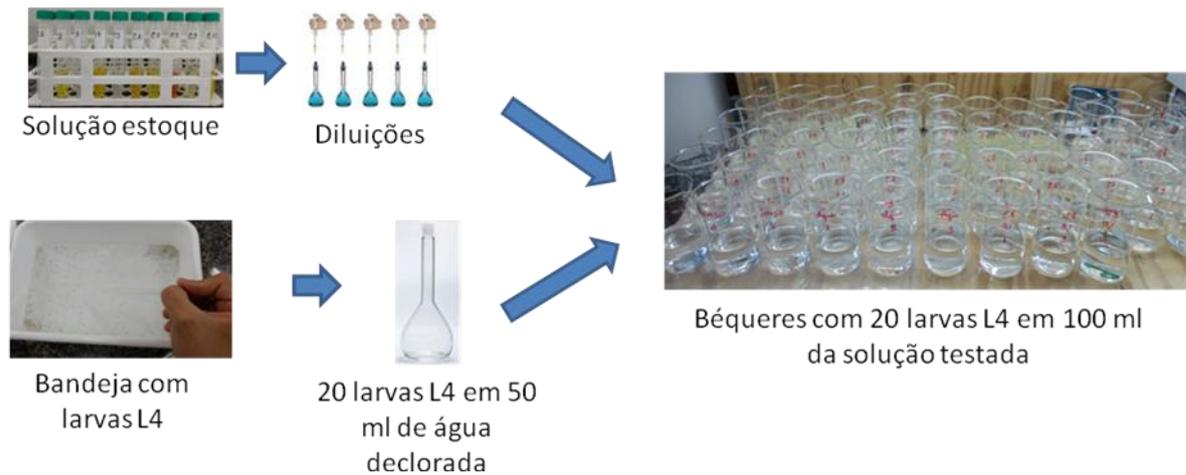


Fonte: Própria autora.

### 3.3.1 Avaliação da toxicidade de tiossemicarbazonas frente à larvas no estágio L4 de *Aedes aegypti*

A avaliação da atividade larvicida dos compostos foi realizada através de uma adaptação do método recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005)<sup>69</sup>. Para este ensaio, soluções estoques foram preparadas a partir da diluição de quantidades equimolares de cada composto em DMSO e diluídas em água deionada, dando assim origem às soluções de trabalho. Em seguida, 20 larvas de *Aedes aegypti* no estágio L4 foram transferidas com o auxílio da pipeta de Pasteur para um balão volumétrico e o volume ajustado para 50 mL com água deionada. Posteriormente, o material foi transferido para um béquer de 250 mL e adicionados 50 mL de solução do composto em concentrações definidas para um volume final de 100 mL, gerando as concentrações teste (100, 50, 10, 1 e 0,1  $\mu$ M em DMSO 1%). Após 24 e 48 h de exposição das larvas ao tratamento foi registrado o número de larvas mortas, sendo a sua morte constatada pela ausência de movimento, mesmo que sob estímulos externos. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada concentração. Somente foram considerados os experimentos que apresentaram formação de pupas menor que 10% no período de até 48h e mortalidade no controle inferior a 20%, conforme recomendações preconizadas pela literatura (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994)<sup>41</sup>. As porcentagens de mortalidade foram calculadas para cada experimento e construídas as curvas em função da concentração para cada composto. Essas curvas foram ajustadas por meio da análise estatística PROBIT pelo programa GraphPad Prism® 5.0, para determinar a dose letal a 50% das larvas ( $DL_{50}$ ). Como controle negativo foi utilizado água e a solução de DMSO 1%. Na Figura 13 estão representadas as etapas envolvidas nesse experimento.

**Figura 13** - Representação esquemática do experimento para avaliação da atividade larvicida.



Fonte: Própria autora.

### 3.3.2 Avaliação do comportamento de nado das larvas no estágio L4 de *Aedes aegypti* durante a exposição às tiosemicarbazonas

Os compostos que apresentaram  $DL_{50}$  a 24 horas menor que  $100 \mu\text{M}$  foram usados no experimento que avalia o comportamento de nado das larvas durante a exposição a agentes tóxicos. Neste experimento, 10 larvas foram transferidas individualmente para placas de Petri (9,0 cm de diâmetro e 2 cm de altura) e expostas aos compostos selecionados na concentração de  $50 \mu\text{M}$  ou soluções do grupo controle. Após um período de três horas, o comportamento de nado das larvas foi avaliado durante 10 minutos, monitorando a distância percorrida, a velocidade média, o tempo de movimento e o tempo parado por meio de uma câmera digital CCD (ViewPoint LifeSciences, Montreal, QC, Canadá) acoplada a um computador. A atividade global da larva foi registrada como seu movimento espacial ao longo do tempo e expresso como  $\Delta\text{pixel}/\text{segundo} \times 10^{-2}$ . Este experimento foi repetido para a mesma placa após cinco e 24h de exposição. Os bioensaios foram realizados a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e luz fluorescente artificial. Como controles negativos foram utilizadas água declorada e uma solução aquosa de DMSO 1%. Os gráficos de comportamento espacial em função do tempo foram construídos usando o programa GraphPad Prism® 5.0. Na Figura 14 estão representadas as etapas envolvidas nesse experimento.

**Figura 14** - Representação esquemática do experimento de comportamento de nado.



Fonte: Própria autora.

### 3.3.3 Análises morfológica de larvas no estágio L4 de *Aedes aegypti* após exposição às tiossemicarbazonas

#### *3.3.3.1 Avaliação da morfologia externa das larvas após exposição às tiossemicarbazonas*

Lâminas semipermanentes foram preparadas a partir de larvas que sobreviveram após 5, 24 e 48 horas de exposição às tiossemicarbazonas em condições similares ao experimento de comportamento de nado. A montagem da lâmina foi realizada derretendo um bloco de gelatina glicerinada corada com azul de bromotimol (~10 mg) sobre uma lâmina previamente aquecida a 40 °C. Em seguida, a larva foi posicionada sobre a gelatina fundida e resfriada rapidamente em freezer por um minuto. As lâminas foram analisadas em um microscópio estereoscópio (Nova Optical Systems), sob um aumento de 25x. As imagens foram adquiridas utilizando uma lente ocular digital (IONLAB) e o software de captura de imagens Future WinJoe.

#### *3.3.3.2 Cortes histológicos do intestino médio das larvas no estágio L4 de *Aedes aegypti* após exposição às tiossemicarbazonas*

Os intestinos médios das larvas submetidas a um experimento similar ao comportamento de nado (larvas no estágio L4 após 24h de exposição ao composto) foram dissecados na presença de solução fisiológica para insetos (0,1 M NaCl, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e transferidos para solução fixadora de Zamboni (STEFANINI; MARTINO; ZAMBONI, 1967) por 2h à temperatura ambiente.

Após a fixação, os intestinos médios [controles (n=10) e tratados (n=10)] foram desidratados em uma série crescente de etanol (70-100%) e embebidos em historesina. Secções de 3 µm de espessura dos intestinos foram coradas com azul de toluidina, montadas sobre lâminas e analisadas no microscópio de luz Olympus BX53 acoplado com a câmera digital Olympus DP 73.

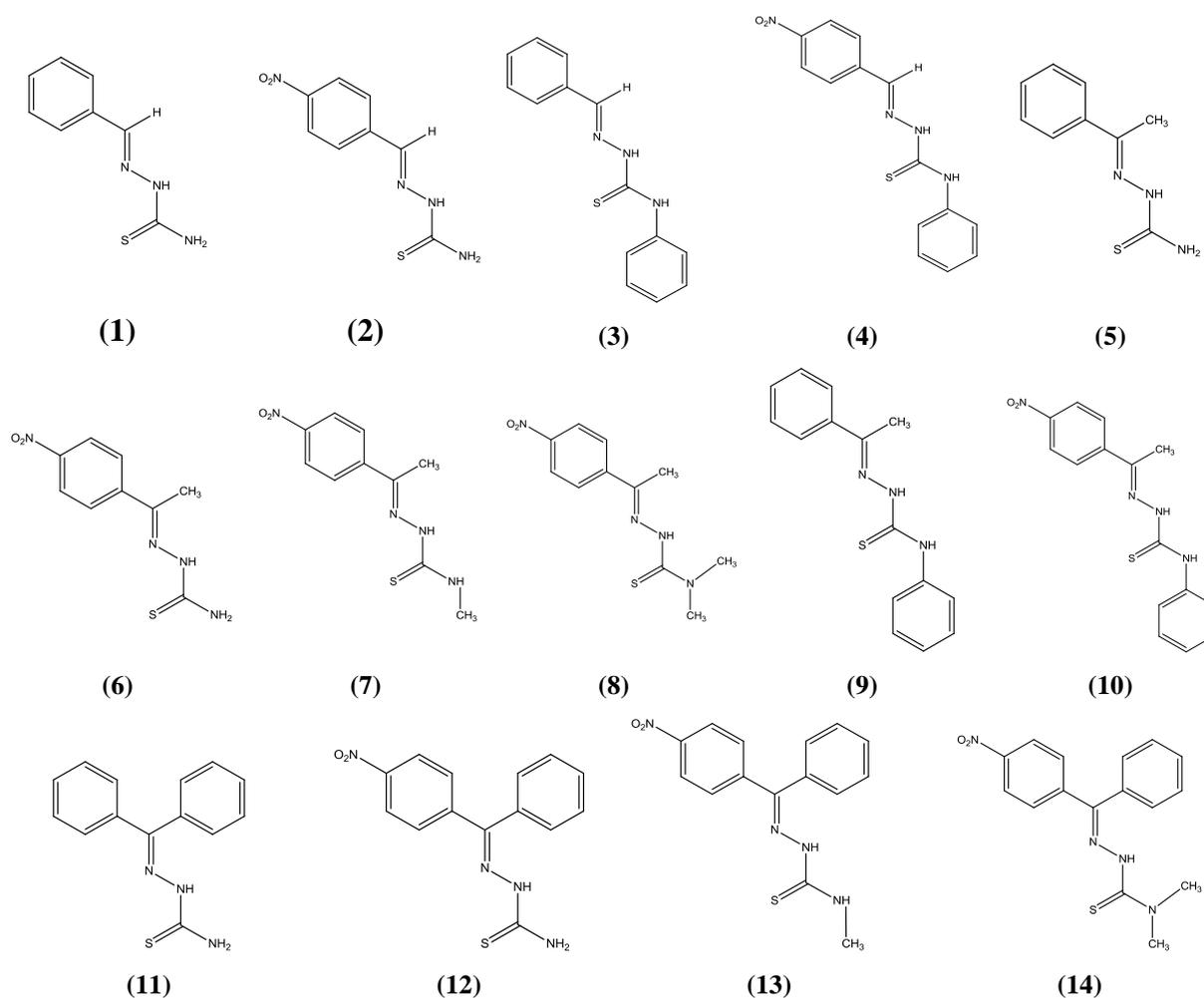
### 3.3.4 Ensaio de imunofluorescência em células do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*

Os intestinos médios das larvas submetidas a um experimento similar ao comportamento de nado (larvas no estágio L4 após 24h de exposição ao composto) foram dissecados na presença de solução fisiológica para insetos (0,1 M NaCl, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e transferidos para solução fixadora de Zamboni (STEFANINI; MARTINO; ZAMBONI, 1967) por 2 h à temperatura ambiente. Os intestinos médios fixados [controles (n=10) e tratados (n=10)] foram submetidos a três lavagens de 30 minutos cada em tampão PBS contendo 1% de Triton X-100 (PBST). Em seguida, as amostras foram incubadas por 24 h a 4°C em solução do anticorpo primário anti-fosfohistona H3 (PH3) (diluição 1:500) em tampão PBST 1%. Após essa etapa, as amostras foram lavadas três vezes por 5 minutos com tampão PBS e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (1:500). Em seguida, foram realizadas três lavagens de 5 minutos cada com tampão PBS. Para a realização da marcação dupla, as amostras previamente marcadas com a anti-fosfohistona H3 (PH3) foram incubadas novamente por 24 h a 4°C em solução contendo um segundo anticorpo primário [anti-proteína de cadeia leve 3 associada a microtúbulos (anti-LC3 A/B) (diluição 1:500), anti-caspase-3 (1:500) ou anti-peroxidase (1:500), em tampão PBST 1%]. Após essa etapa, as amostras foram lavadas três vezes por 5 minutos com tampão PBS e incubadas no anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:500), seguida de três lavagens de 5 minutos cada com tampão PBS. Os núcleos foram corados com DAPI por 30 minutos. As lâminas foram montadas em solução de Mowiol e analisadas no microscópio confocal Zeiss LSM 510 do Núcleo de Microscopia e Microanálises da Universidade Federal de Viçosa (NMM-UFV).

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram preparadas quatorze tiossemicarbazonas cujas prováveis estruturas estão apresentadas na Figura 15. Por não se tratarem de compostos inéditos, apresentaremos apenas alguns dados que confirmam sua formação.

**Figura 15** - Representação estrutural das tiossemicarbazonas estudadas neste trabalho.



Fonte: Própria autora.

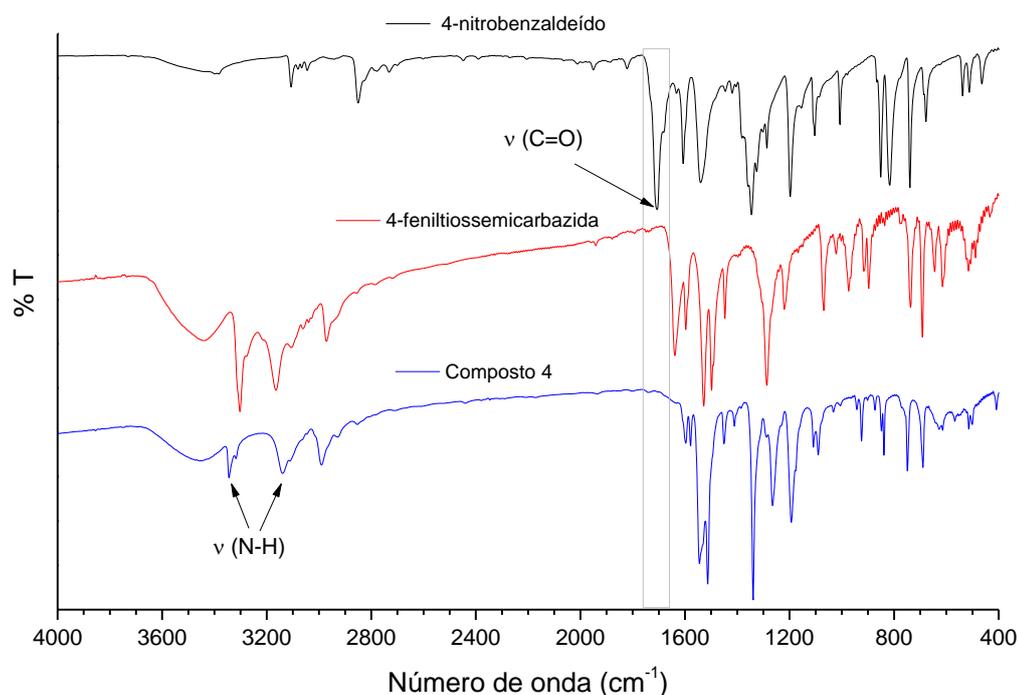
Nota: A numeração abaixo de cada figura será utilizada para identificar cada composto neste trabalho.

### 4.1 Caracterização das tiossemicarbazonas no estado sólido

A técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho é utilizada para caracterizar os grupos funcionais presentes nos compostos. Os espectros de infravermelho obtidos para as tiossemicarbazonas **1 - 14** estão apresentados no Apêndice 1. Em todos os

espectros, foi observada a ausência de absorções na região de  $1700\text{ cm}^{-1}$ , indicando que com a formação do composto houve o desaparecimento da carbonila característica dos precursores aldeído ou cetona. Além disso, foi observado o aparecimento de bandas na região de  $3100$  a  $3500\text{ cm}^{-1}$  atribuídas aos estiramentos de grupos N-H da porção tioamida primária e/ou secundária. O comportamento supracitado pode ser exemplificado através da Figura 16, onde estão apresentados os espectros de infravermelho do 4-nitrobenzaldeído, 4-feniltiossemicarbazida e 4-nitrobenzaldeído-*N*(4)-feniltiossemicarbazona (**4**).

**Figura 16** - Espectros na região do infravermelho do 4-nitrobenzaldeído, 4-feniltiossemicarbazida e 4-nitrobenzaldeído-*N*(4)-feniltiossemicarbazona na faixa de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ , em KBr.



Fonte: Própria autora.

## 4.2 Caracterização das tiossemicarbazonas em solução/suspensão

### 4.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma das ferramentas mais poderosas utilizada na determinação estrutural de moléculas orgânicas. Ela se baseia no estudo da interação da radiação na frequência das ondas de rádio com núcleos atômicos na presença de um campo eletromagnético estático externo.

No Apêndice 2 estão apresentados os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das tiossemicarbazonas preparadas nesse trabalho. Na Tabela 2 estão descritos os valores de deslocamentos químicos atribuídos aos hidrogênios das tiossemicarbazonas. A atribuição dos sinais de hidrogênio foi feita através da comparação direta entre espectros dos compostos, simulação de espectro utilizando um programa do pacote ACD/Lab 6.0 e dados da literatura.

**Tabela 2** – Deslocamentos químicos de hidrogênios (ppm) para as tiossemicarbazonas **1-14**.

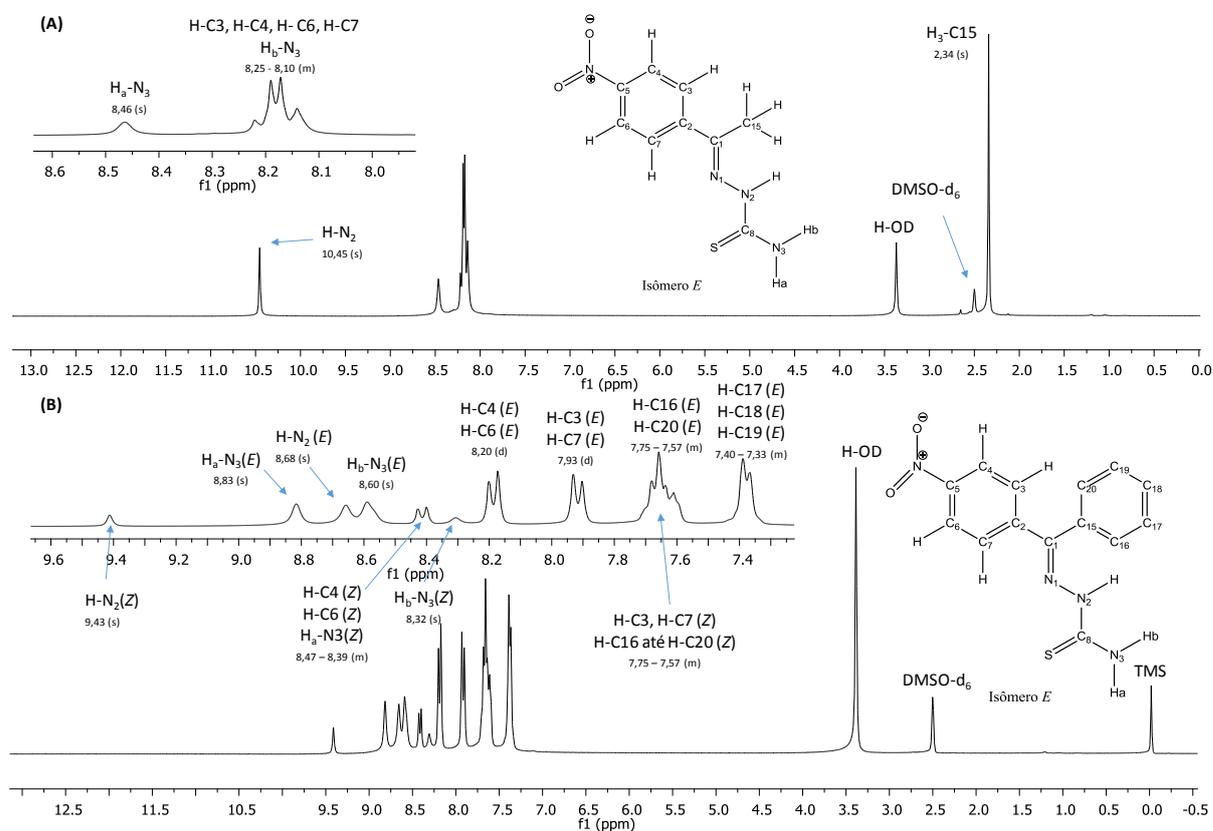
Composto	Deslocamentos químicos atribuídos aos hidrogênios (ppm)
1	11,46 (s, H-N <sub>2</sub> ); 8,23 (s, H <sub>a</sub> -N <sub>3</sub> ); 8,07 (s, H-C1); 8,02 (s, H <sub>b</sub> -N <sub>3</sub> ); 7,80 (m, H-C3, H-C7); 7,40 (m, H-C4, H-C5, H-C6)
2	11,74 (s, H-N <sub>2</sub> ); 8,43 (s, H <sub>a</sub> -N <sub>3</sub> ); 8,28 (d, H-C6); 8,23 (d, H-C6); 8,14 (s, H-C1); 8,10 (d, H-C3, H-C7)
3	11,88 (s, H-N <sub>2</sub> ); 10,15 (s, H-N <sub>3</sub> ); 8,19 (s, H-C1); 7,92 (d, H-C3, H-C7); 7,60 (d, H-C9, H-C13); 7,47 – 7,33 (m, H-C4, H-C5, H-C6, H-C10, H-C12); 7,21 (t, H-C11)
4	12,11 (s, H-N <sub>2</sub> ); 10,34 (s, H-N <sub>3</sub> ); 8,30 – 8,16 (m, H-C1, H-C3, H-C4, H-C6, H-C7); 7,55 (d, H-C9, H-C13); 7,40 (t, H-C10, H-C12); 7,24 (t, H-C11)
5	10,24 (s, H-N <sub>2</sub> ); 8,30 (s, H <sub>a</sub> -N <sub>3</sub> ); 7,98 – 7,89 (m, H <sub>b</sub> -N <sub>3</sub> , H-C3, H-C7); 7,43 – 7,35 (m, H-C4, H-C5, H-C6); 2,31 (s, H <sub>3</sub> -C15)
6	10,45 (s, H-N <sub>2</sub> ); 8,46 (s, H <sub>a</sub> -N <sub>3</sub> ); 8,25 – 8,10 (m, H-C3, H-C4, H-C6, H-C7, H <sub>b</sub> -N <sub>3</sub> ); 2,34 (s, H <sub>3</sub> -C15)
7	10,48 (s, H-N <sub>2</sub> ); 8,54 (s, H-N <sub>3</sub> ); 8,24 – 8,16 (m, H-C3, H-C4, H-C6, H-C7); 3,05 (s, H <sub>3</sub> -C14); 2,34 (s, H <sub>3</sub> -C15)
8	9,75 (s, H-N <sub>2</sub> ); 8,24 (d, H-C4, H-C6); 8,04 (d, H-C3, H-C7); 3,30 (s, H <sub>3</sub> -C9, H <sub>3</sub> -C10); 2,34 (s, H <sub>3</sub> -C15)
9	10,60 (s, H-N <sub>2</sub> ); 10,04 (s, H-N <sub>3</sub> ); 8,00 (d, H-C3, H-C7); 7,57 (d, H-C9, H-C13); 7,49 – 7,33 (m, H-C4, H-C5, H-C6, H-C10, H-C12); 7,21 (t, H-C11); 2,38 (s, H <sub>3</sub> -C15)
10	10,83 (s, H-N <sub>2</sub> ); 10,21 (s, H-N <sub>3</sub> ); 8,30 (d, H-C4, H-C6); 8,21 (d, H-C3, H-C7); 7,57 (d, H-C9, H-C13); 7,41 (t, H-C10, H-C12); 7,26 (t, H-C11); 2,44 (s, H <sub>3</sub> -C15)
11	8,67 (s, H-N <sub>3</sub> ); 8,43 (s, H-N <sub>2</sub> ); 8,40 (s, H <sub>b</sub> -N <sub>3</sub> ); 7,66 (m, H-C3, H-C7, H-C16, H-C20); 7,46 – 7,29 (m, H-C4, H-C5, H-C6, H-C17, H-C18, H-C19)
12	8,83 (s, H <sub>a</sub> -N <sub>3</sub> E); 8,68 (s, H-N <sub>2</sub> E); 8,60 (s, H <sub>b</sub> -N <sub>3</sub> ); 8,20 (d, H-C4, H-C6 E); 7,93 (d, H-C3, H-C7 E); 7,75 – 7,57 (m, H-C16, H-C20 E); 7,40 – 7,33 (m, H-C17, H-C18, H-C19 E)
13	9,43 (s, H-N <sub>2</sub> Z); 8,47 – 8,39 (m, H-C4, H-C6, H <sub>a</sub> -N <sub>3</sub> Z); 8,32 (s, H <sub>b</sub> -N <sub>3</sub> Z); 7,75 – 7,57 (m, H-C3, H-C7, H-C16 até H-C20 Z)
14	8,78 (s, H-N <sub>3</sub> E); 8,20 (d, H-C4, H-C6 E); 8,02 – 7,87 (m, H-C3, H-C7 E); 7,87 – 7,54 (m, H-C16, H-C20 E); 7,42 – 7,32 (m, H-C17, H-C18, H-C19 E)
	9,25 (s, H-N <sub>2</sub> Z); 9,05 (s, H-N <sub>3</sub> Z); 8,36 (d, H-C4, H-C6 Z); 8,02 – 7,87 (m, H-C3, H-C7 Z); 7,87 – 7,54 (m, H-C16 até H-C20 Z)
	9,37 (s, H-N <sub>2</sub> E); 8,23 (d, H-C4, H-C6 E); 8,01 – 7,87 (m, H-C3, H-C7 E); 7,87 – 7,52 (m, H-C16, H-C20 E); 7,52 – 7,26 (m, H-C17, H-C18, H-C19 E)
	9,69 (s, H-N <sub>2</sub> Z); 8,47 – 8,31 (m, H-C4, H-C6 Z); 8,01 – 7,87 (m, H-C3, H-C7 Z); 7,87 – 7,52 (m, H-C16 até H-C20 Z)

Fonte: Própria autora.

Nota: s = singlete; d = duplete; t = tripleto; m = multiplete; Z = configuração *cis*; E = configuração *trans*.

Dos compostos estudados, apenas o **11** não pode apresentar isômeros configuracionais do tipo *E* e *Z* em relação ao grupo imina. Em solução de DMSO foi verificado que **1 – 10** apresentaram apenas o isômero *E*, como exemplificado na Figura 17 (A). A formação deste isômero nesses compostos pode ser justificada pelos estudos de Costa et al. (2003) e Pérez-Rebolledo et al. (2007)<sup>Erro! Indicador não definido.</sup>, que mostram que as tiossemicarbazonas provenientes de aldeídos e acetofenonas geram o isômero *E* em solução de DMSO. Já os compostos **12 – 14** apresentaram todos os sinais de seus hidrogênios duplicados (Figura 17 - B), demonstrando a presença de uma mistura de isômeros em solução. Isso pode ser justificado pelo fato dessas tiossemicarbazonas serem obtidas a partir de cetonas com grupos muito volumosos (fenil e 4-nitrofenil).

**Figura 17** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das tiossemicarbazonas **6** (A) e **12** (B).



Fonte: Própria autora.

Nesses espectros os sinais atribuídos aos hidrogênios dos grupos N-H da porção tioamida encontram-se na região 12,1 até 8,0 ppm dependendo do tipo de isômero, hidrogênios dos grupos C-H dos anéis aromáticos na região de 8,3 a 7,2 ppm, e os

hidrogênios dos grupos C-H alifáticos em 3,4 até 3,0 ppm para os grupos metila ligado a nitrogênio e em 2,5 a 2,3 ppm para os grupos metila ligados ao carbono imínico.

Os dados de espectroscopia na região do infravermelho e de ressonância magnética nuclear confirmam a formação das tiossemicarbazonas.

#### 4.2.2 Turbidimetria

A solubilidade de uma substância, que é a quantidade máxima da mesma que pode ser dissolvida em um determinado solvente a uma dada temperatura, constitui um importante parâmetro para avaliar sua disponibilidade no meio líquido.

Apesar do amplo perfil farmacológico das tiossemicarbazonas, elas apresentam grande dificuldade na sua solubilização em meio biológico. Algumas propriedades físico-químicas calculadas para os compostos **1 - 14** (Tabela 3) corroboram essa informação. Os altos valores de log P (logaritmo do coeficiente de partição) e pKa (negativo do logaritmo da constante de dissociação ácida) encontrados sugerem que os mesmos possuem uma baixa afinidade pela água e baixo grau de ionização. Isso também é demonstrado pelo baixo valor de log S (logaritmo da solubilidade limite do composto em água). A faixa de solubilidade encontrada para **1 - 14** foi de 2,56 a 171,17 mg/L, sugerindo que os compostos são pouco solúveis em água.

**Tabela 3** – Parâmetros físico-químicos calculados para as tiossemicarbazonas **1-14**.

Composto	Valor médio log	Valor médio logS	Solubilidade (mg/L)	pKa
1	1,70 ± 0,20	-3,02	171,17	11,53
2	1,63 ± 0,24	-3,59	57,64	11,09
3	3,45 ± 0,21	-4,47	8,65	11,39
4	3,39 ± 0,26	-4,80	4,76	10,95
5	1,74 ± 0,23	-3,30	96,86	11,59
6	1,68 ± 0,33	-3,85	33,66	11,15
7	2,04 ± 0,29	-3,80	39,99	11,44
8	2,25 ± 0,30	-3,56	73,35	11,46
9	3,54 ± 0,45	-4,64	6,17	11,45
10	3,44 ± 0,49	-4,97	3,37	11,00
11	3,23 ± 0,20	-4,69	5,21	10,85
12	3,15 ± 0,23	-5,07	2,56	10,23
13	3,53 ± 0,22	-4,98	3,29	10,53
14	3,74 ± 0,21	-4,74	5,98	10,54

Fonte: Própria autora.

A fim de melhorar a solubilidade de compostos em água, uma estratégia comum é a dissolução prévia em solventes de alta constante dielétrica ou surfactantes, seguido de sua

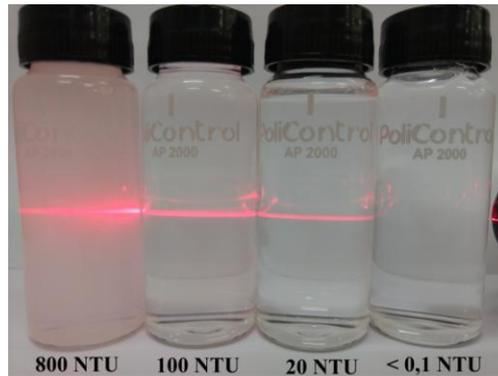
posterior solubilização em água. O DMSO foi utilizado nesse trabalho como co-solvente devido sua capacidade de dissolver um vasto número de moléculas, incluindo as tiossemicarbazonas, além da vantagem de ser um solvente orgânico pouco tóxico para larvas de *Aedes aegypti*, segundo a classificação de Kramer, Schnell e Nickerson (1983) ( $DL_{50} = 10\%v/v$  após 4 horas de exposição). Contudo, nem sempre uma solução é formada da interação entre a tiossemicarbazona, o DMSO e a água, mas sim um coloide estável ou mesmo uma suspensão. Isso indica a necessidade de se estudar o comportamento dos compostos diluídos em DMSO, em solução aquosa visto que alterações no tipo de sistema disperso poderão influenciar a absorção das tiossemicarbazonas pelas larvas.

O comportamento das soluções/suspensões formadas durante o aumento da concentração das tiossemicarbazonas em uma solução aquosa com DMSO 1% foi estudado por turbidimetria, uma vez que não foi possível a determinação do diâmetro hidrodinâmico dessas partículas por espalhamento de luz dinâmico. As curvas de turbidez em função do tempo para os compostos **1 – 14** dissolvidos em solução aquosa com DMSO 1% estão apresentados no Apêndice 3. O tempo máximo do experimento foi de 48 horas, pois foi o mesmo utilizado nos ensaios biológicos.

Neste experimento, os sistemas com turbidez maior ou igual a 20 NTU manifestam o efeito Tyndall (ver Figura 18), que é a dispersão da luz por um coloide ou suspensão. Deste modo, os compostos **1, 5 e 11** não apresentaram significativa turbidez em nenhuma das concentrações testadas, sugerindo que os mesmos são solúveis em solução aquosa com DMSO 1%. Os compostos **2, 3, 8 e 13** apresentaram turbidez acima de 20 NTU apenas nas concentrações de 100  $\mu M$ . Os demais compostos apresentaram turbidez acima de 20 NTU a partir da concentração de 50  $\mu M$ , conforme exemplificado na Figura 19.

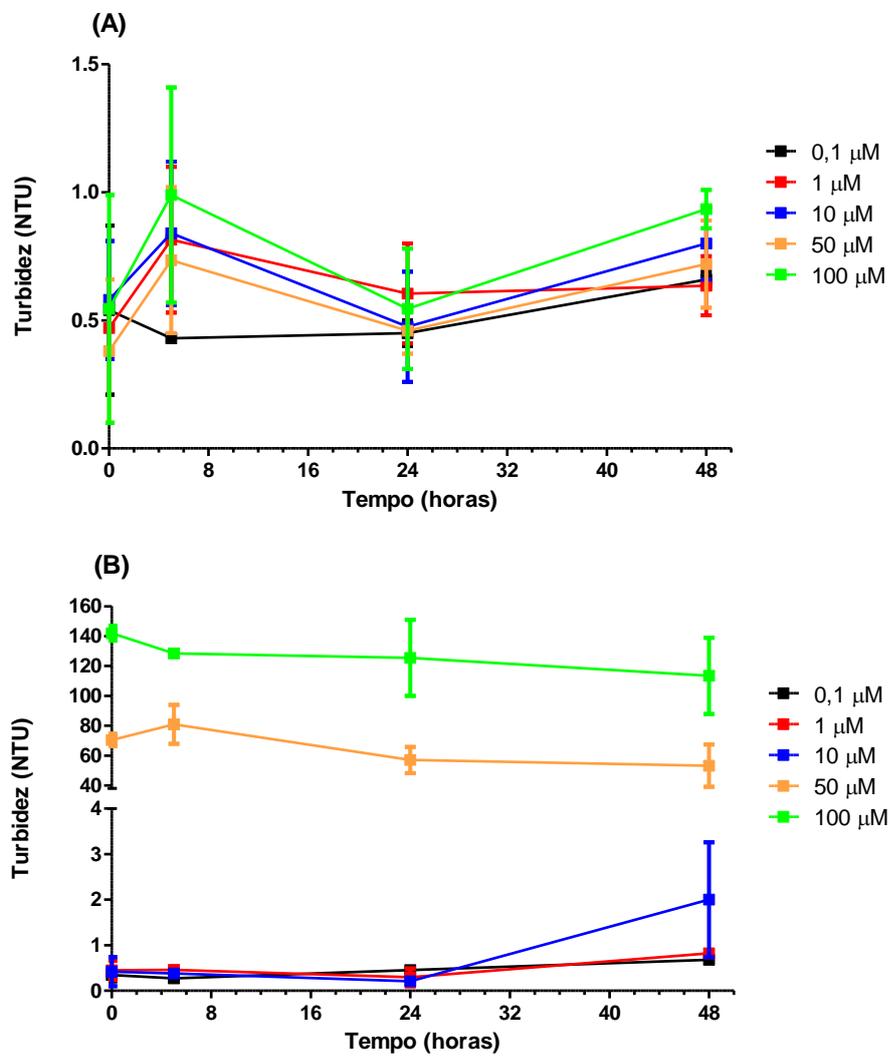
Ao compararmos os compostos sem o grupo nitro (1, 3, 5, 9 e 11) com seus respectivos derivados com grupo nitro (2, 4, 6, 10 e 12) observamos que a presença dessa função aumenta significativamente a turbidez do sistema, sugerindo que esse grupo diminui a solubilidade das tiossemicarbazonas conforme tendência observada para essa propriedade calculada na Tabela 3.

**Figura 18** - Soluções/suspensões de calibração do turbidímetro submetidas a iluminação por um laser vermelho para visualização do efeito Tyndall.



Fonte: Própria autora.

**Figura 19** - Curvas de turbidez em função do tempo para os compostos 5 (A) e 6 (B) em solução aquosa com DMSO 1%.



Fonte: Própria autora.

De modo geral, nas primeiras horas do experimento foi observado um aumento na turbidez da suspensão, demonstrando que seu processo de solubilização na solução aquosa de DMSO 1% não atingiu o equilíbrio e podem ocorrer fenômenos como a coalescência. Isso se justifica pela troca do DMSO na esfera de solvatação das tiossemicarbazonas por moléculas de água, o que leva a sua precipitação no meio.

A alta turbidez encontrada para a maioria dos compostos a 100  $\mu\text{M}$  nos levou a decidir que esta seria a concentração limite utilizada nos testes biológicos, pois em concentrações maiores as tiossemicarbazonas estariam mais sujeitas a precipitação. Contudo, essa baixa solubilidade poderia não ser um problema já que as larvas podem se alimentar de partículas em suspensão no meio aquoso.

### 4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

#### 4.3.1 Avaliação da toxicidade de tiossemicarbazonas frente a larvas no estágio L4 de *Aedes aegypti*

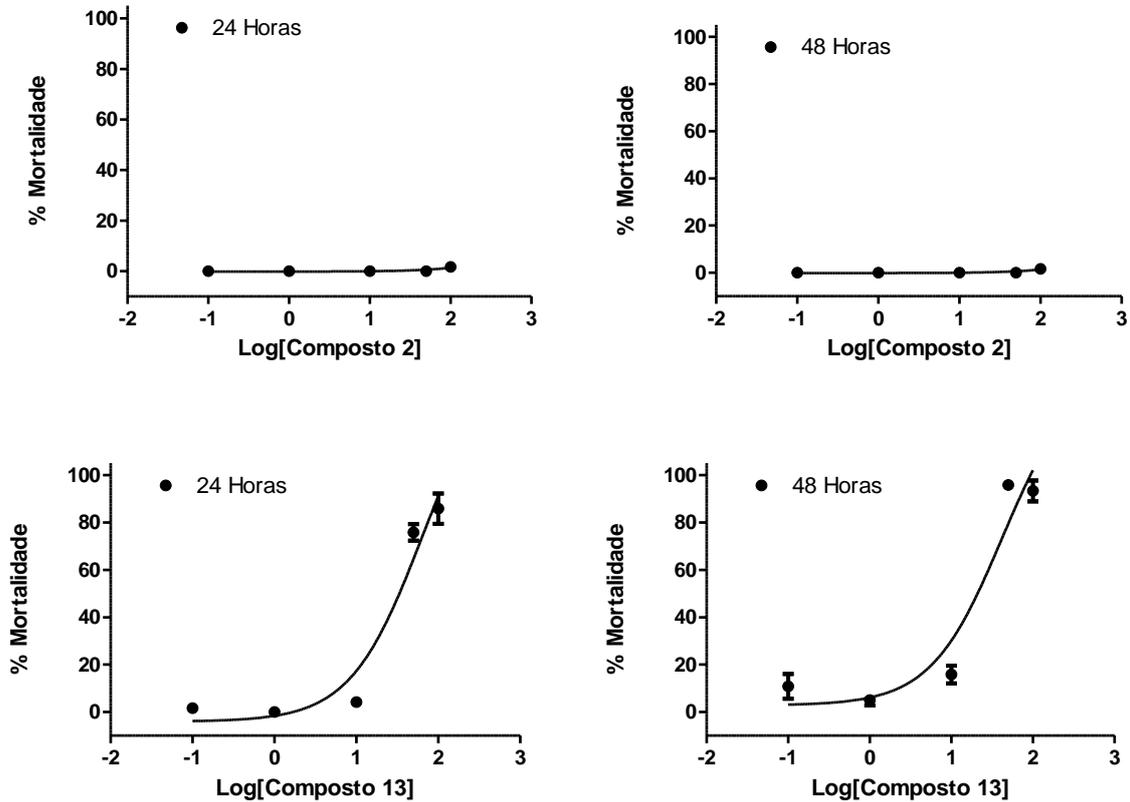
A avaliação da atividade contra larvas no estágio L4 de mosquitos é um teste preconizado pela OMS para verificar a eficiência de novos agentes larvicidas (WHO, 2005)<sup>69</sup>.

Na Figura 20 estão apresentadas as curvas de porcentagem de mortalidade em função da concentração dos compostos **2** e **13** obtidas durante esse experimento. As demais curvas estão apresentadas no Apêndice 4.

O comportamento observado para **2** é característico de compostos que não manifestam efeitos tóxicos agudos nas concentrações analisadas, diferentemente daquele de **13** que é o esperado para potenciais agentes larvicidas. A partir de curvas como a apresentada por **13** foi possível calcular o valor da dose letal a 50% das larvas ( $DL_{50}$ ) para os compostos.

Na Tabela 4 estão apresentados os valores de  $DL_{50}$  em  $\mu\text{M}$  e ppm para as tiossemicarbazonas após 24 e 48 horas de exposição. A água declorada e DMSO 1% foram utilizados como controle, sendo que não foi observada uma porcentagem de mortalidade significativa (< 10%) para o grupo tratado com DMSO 1%. Além disso, menos de 2% das larvas se tornaram pupas durante as 48h do experimento no estágio L4.

**Figura 20** - Curvas de porcentagem de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* no estágio L4 em função do aumento da concentração para os compostos 2 e 13.



Fonte: Própria autora.

**Tabela 4** - Toxicidade das tiossemicarbazonas 1 - 14 frente a larvas de *Aedes aegypti* no estágio L4.

Composto	DL <sub>50</sub> e intervalo de confiança entre parênteses			
	24 h		48 h	
	μM	ppm	μM	ppm
1	>100	>17,92	>100	>17,92
2	>100	>22,42	>100	>22,42
3	>100	>25,53	>100	>25,53
4	>100	>30,03	>100	>30,03
5	>100	>19,32	>100	>19,32
6	>100	>23,82	>100	>23,82
7	>100	>25,23	>100	>25,23
8	137,7* (90,12 - 210,5)	36,67 (24,00 - 56,06)	55,53 (31,63 - 97,48)	14,79 (8,42 - 25,96)
9	>100	>26,93	>100	>26,93
10	>100	>31,43	>100	>31,43
11	72,09 (39,05 - 133,1)	18,41 (9,97 - 33,98)	66,74 (37,06 - 120,2)	17,04 (9,46 - 33,98)
12	38,10 (6,857 - 211,7)	11,44 (2,06 - 63,58)	40,22 (14,74 - 109,8)	12,08 (4,43 - 32,98)
13	62,06 (25,76 - 149,6)	19,51 (8,10 - 47,03)	41,38 (16,83 - 101,7)	13,01 (5,29 - 31,97)
14	125,8* (72,18 - 219,4)	41,31 (23,70 - 72,05)	38,73 (24,38 - 61,52)	12,72 (8,01 - 20,20)

Fonte: Própria autora.

Nota:\* = valores estimados pelo programa.

Os resultados obtidos demonstram que os compostos **1 – 7, 9 e 10** não foram ativos nas concentrações testadas, diferentemente de **8, 11 – 14**. Foi observado que as tiossemicarbazonas derivadas da benzofenona (**11 – 14**) foram mais ativas que as derivadas de benzaldeído e acetofenona, e que a presença do grupo nitro não favorece o aumento da toxicidade. No geral, não foi observado uma diminuição significativa dos valores de DL<sub>50</sub> com o aumento do tempo de exposição.

Considerando a classificação apresentada por Cheng et al. (2003) os compostos **8, 11 – 14** se enquadram como altamente ativos por apresentarem valores de DL<sub>50</sub> menores que 50 ppm. Os demais compostos não podem ser considerados inativos segundo essa classificação, pois não foram testados nas concentrações maiores, até 100 ppm. É importante lembrar que em maiores concentrações eles estarão sujeitos a maior precipitação no meio, conforme observado nos experimentos de turbidimetria.

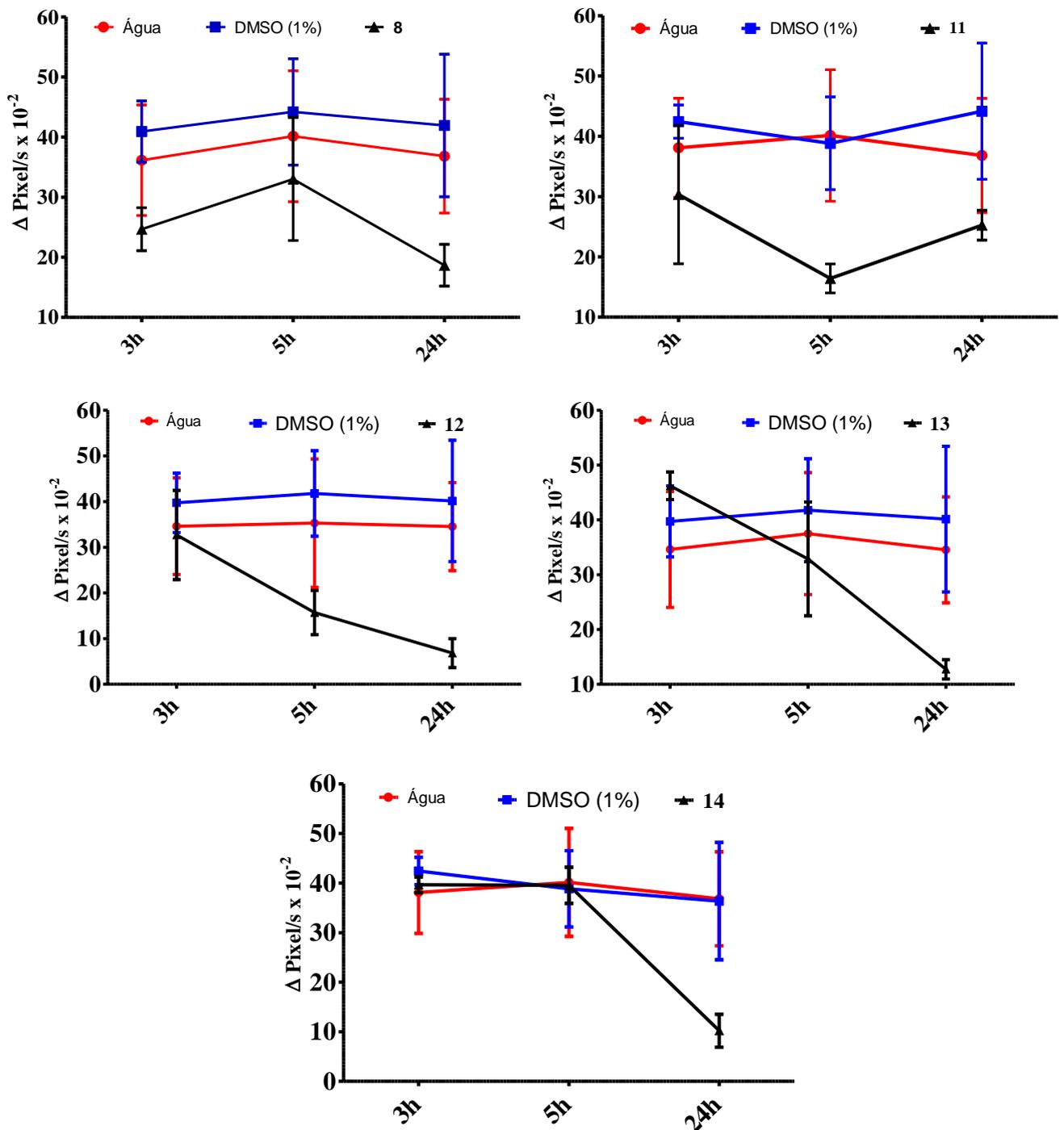
O comportamento de nado das larvas, as alterações morfológicas externas e do intestino médio e os ensaios de imunofluorescência foram avaliados para os compostos **8, 11 – 14** que foram ativos nessa etapa do trabalho.

#### 4.3.2 Avaliação do comportamento de nado das larvas no estágio L4 de *Aedes aegypti* durante a exposição às tiossemicarbazonas

A atividade locomotora de todos os animais é governada por interações entre os vários sistemas do organismo e o ambiente. No caso dos insetos, os larvicidas podem atuar no sistema nervoso ou modificar seu exoesqueleto (BRAGA; VALLE, 2007), promovendo assim um comprometimento da atividade locomotora em indivíduos expostos a esses agentes tóxicos.

Na Figura 21 estão apresentados os gráficos do comportamento de nado das larvas após 3, 5 e 24 horas de exposição às tiossemicarbazonas **8, 11 – 14**. Todas elas foram testadas na concentração de 50 µM. Como controle foi utilizado a água e o DMSO 1%.

**Figura 21** - Comportamento de nado das larvas de *Aedes aegypti* no estágio L4 após 3, 5 e 24 horas de exposição às tiossemicarbazonas **8**, **11** – **14** na concentração de 50  $\mu\text{M}$ .



Fonte: Própria autora.

De modo geral, houve um comprometimento na atividade locomotora das larvas sobreviventes em relação aos grupos controle após serem tratadas com os compostos. Uma redução da mobilidade das larvas foi observada para as tiossemicarbazonas **8** e **11** em relação

aos grupos controle sem alteração com o tempo, enquanto que para **12** – **14** foi observado sua diminuição com o passar do tempo.

Assim como nessas tiossemicarbazonas, já foi relatada na literatura uma redução de mobilidade no experimento de comportamento de nado após 24 horas de exposição a inseticidas, tais como azadiractina, deltametrina e espinosade (TOMÉ et al., 2014; MARRIEL et al., 2016).

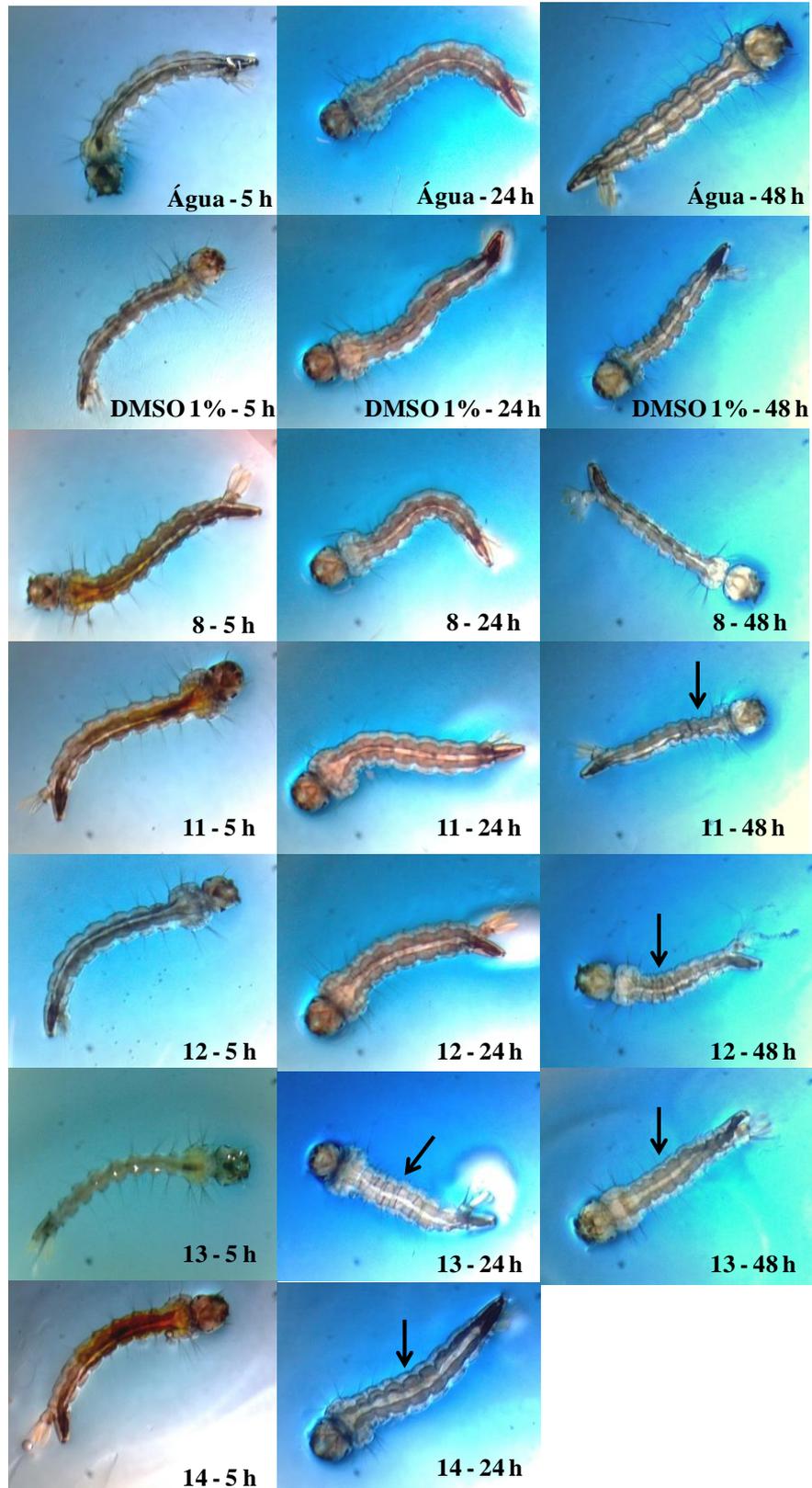
#### 4.3.3 Avaliação da morfologia externa das larvas no estágio L4 de *Aedes aegypti* após exposição às tiossemicarbazonas

Com objetivo de verificar se as alterações ocorridas na atividade locomotora das larvas quando expostas as tiossemicarbazonas estariam relacionadas com modificações na sua morfologia externa, foram preparadas lâminas com larvas expostas as tiossemicarbazonas em condições similares ao experimento de comportamento de nado.

Na Figura 22 estão apresentadas as imagens das lâminas preparadas com as larvas de *Aedes aegypti* no estágio L4 que sobreviveram após 5, 24 e 48 horas de exposição às tiossemicarbazonas na concentração de 50 µM. O controle utilizado foi a água e o DMSO 1%. O tempo de exposição de 48 horas foi avaliado, pois como a concentração utilizada foi pouco acima da DL<sub>50</sub> algumas larvas podem sobreviver nessas condições.

Apesar de qualitativos os resultados, foi observado que com o passar do tempo as larvas expostas aos compostos **11** (48h), **12** (48h), **13** (24 e 48h) e **14** (24h) apresentaram alterações em sua morfologia externa quando comparadas ao controle água. A principal alteração visualizada foi deformidade no abdômen, o que pode estar associado a redução da atividade global da larva durante o experimento de comportamento de nado.

**Figura 22** – Fotomicrografia de lâminas preparadas com larvas que sobreviveram após 5, 24 e 48 horas de exposição aos controles (água e DMSO 1%) ou às tiossemicarbazonas **8**, **11** – **14** na concentração de 50  $\mu$ M.



Fonte: Própria autora.

Nota: Para **14** não houve larvas sobreviventes após 48 horas de exposição ao composto. As setas indicam as larvas que apresentaram deformidades no abdômen.

#### 4.3.4 Análise dos cortes histológicos do intestino médio das larvas no estágio L4 de *Aedes aegypti* após exposição às tiossemicarbazonas

Uma vez que os compostos apresentaram atividade larvicida foi avaliada se a exposição às tiossemicarbazonas levaria a alterações morfológicas nas células do intestino médio das larvas de *Aedes aegypti*. Essa estrutura é o principal alvo de substâncias tóxicas, químicas e biológicas (VALOTTO et al., 2011), sendo assim importante para avaliar se o composto apresenta atividade citotóxica.

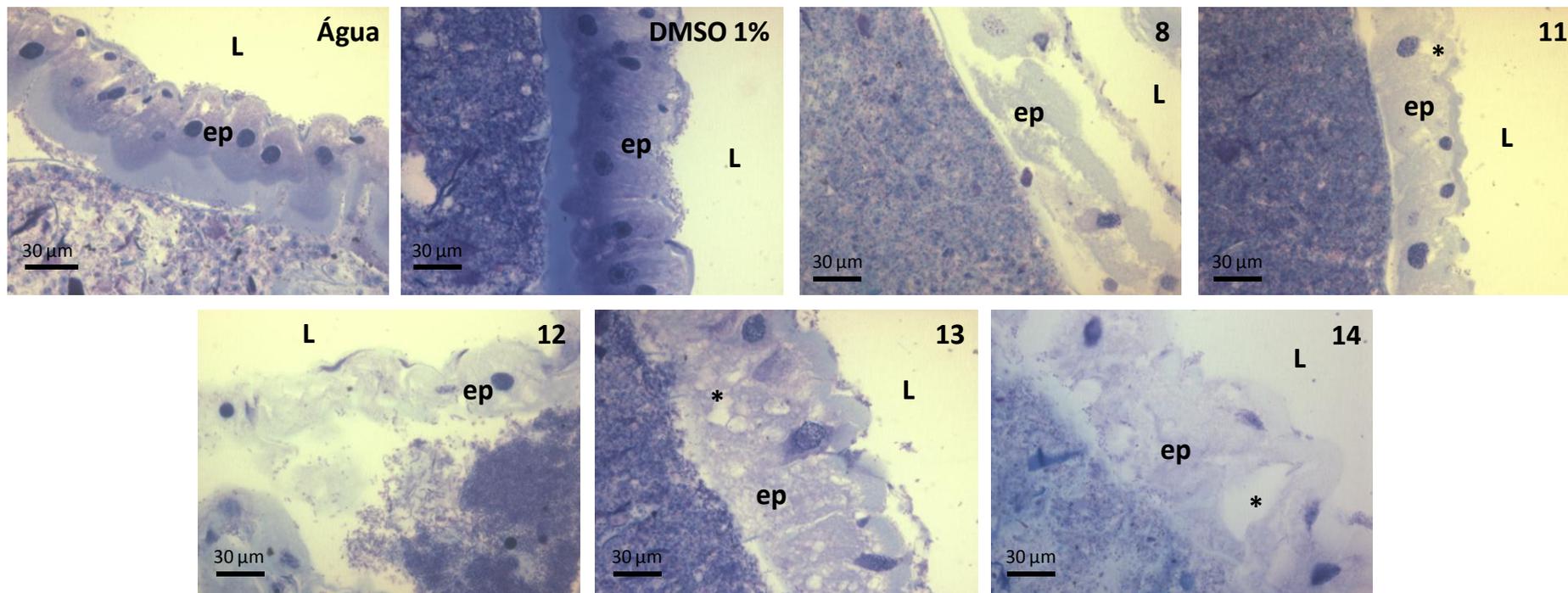
Na Figura 23 e no Apêndice 5 estão apresentados os cortes histológicos do intestino médio das larvas de *Aedes aegypti* no estágio L4 que sobreviveram após 24 horas de exposição às tiossemicarbazonas **8**, **11** – **14** na concentração de 50 µM. Como controle foi utilizado a água e o DMSO 1%.

Nos grupos controle, o intestino médio das larvas possui um epitélio simples (células colunares digestivas e células estaminais), sendo que essas células digestivas possuem um bom desenvolvimento e um núcleo com predominância de cromatina descondensada. Após o tratamento com as tiossemicarbazonas foi observado uma intensa desorganização da camada epitelial, principalmente nas células colunares digestivas, além do aparecimento de vários espaços entre essas células (vacúolos). Não foi observado o aumento no número de camadas epiteliais em nenhuma das imagens.

Ao compararmos os dados obtidos neste trabalho com aqueles de Valotto et al. (2011) avaliando a toxicidade de um tanino isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* em larvas no estágio L3 de *Aedes aegypti*, as alterações observadas evidenciam o processo de degeneração celular e aceleração do processo de lise das células epiteliais pela presença das tiossemicarbazonas.

Esse resultado demonstra que as tiossemicarbazonas apresentam efeito citotóxico alterando a morfologia das células do intestino médio das larvas, o que pode causar prejuízo na absorção de nutrientes levando a morte das larvas.

**Figura 23** - Cortes histológicos do intestino médio de larvas no estágio L4 de *Aedes aegypti* dos grupos controle (água e DMSO 1%) e tratados com as tiossemicarbonas **8**, **11** – **14** na concentração de 50  $\mu$ M.



Fonte: Própria autora.

Nota: As lâminas foram coradas com azul de toluidina. ep = células do epitélio. \* = vacúolos citoplasmáticos nas células. L = lúmen.

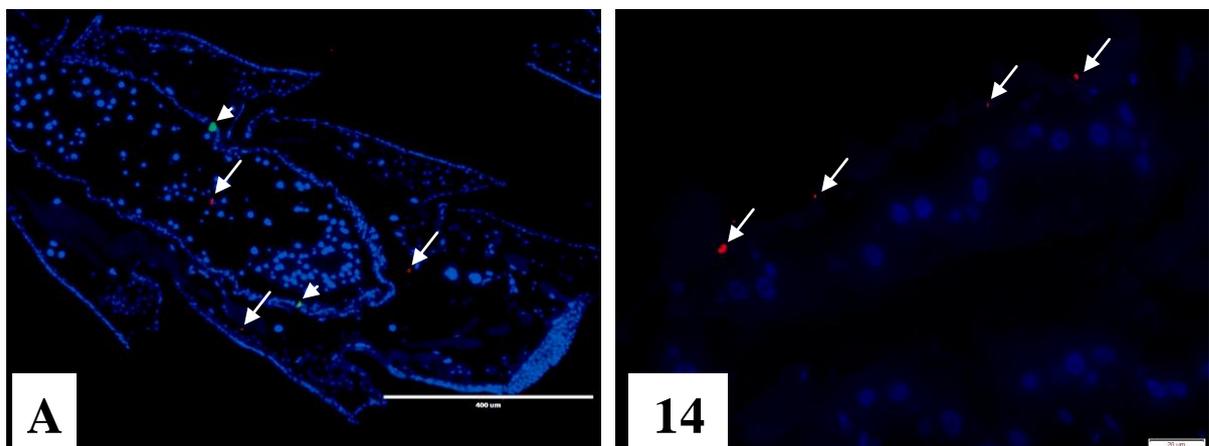
#### 4.3.5 Análise dos ensaios de imunofluorescência em células do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados a fim de verificar se os potenciais mecanismos e processos relacionados à morte celular estariam sendo ativados durante a lise e degeneração celular pelas tiossemicarbazonas, conforme dados obtidos nos estudos de cortes histológicos do intestino médio das larvas.

Os anticorpos primários utilizados nesse estudo foram a anti-fosfohistona H3 (anti-PH3), anti-proteína de cadeia leve 3 associada a microtúbulos (anti-LC3A/B), anti-caspase 3 e anti-peroxidase que estão relacionados a indução da proliferação celular, ativação da autofagia, ativação da apoptose e ao mecanismo de desintoxicação/imunidade dos insetos, respectivamente. Em todos os casos foi realizada uma marcação dupla, sendo usado anti-PH3 como controle.

Na Figura 24 estão apresentados os resultados do ensaio de imunofluorescência com marcação dupla de anti-PH3 e anti-caspase 3 para pupa branca e tratada com a tiossemicarbazona **14**. Os demais resultados estão apresentadas no Apêndice 6.

**Figura 24** - Fotomicrografia dos ensaios de imunofluorescência para marcação dupla com os anticorpos anti-fosfohistona H3 (anti-PH3) e anti-caspase 3 para o controle positivo (A = pupa branca) e grupo tratado com a tiossemicarbazona **14**.



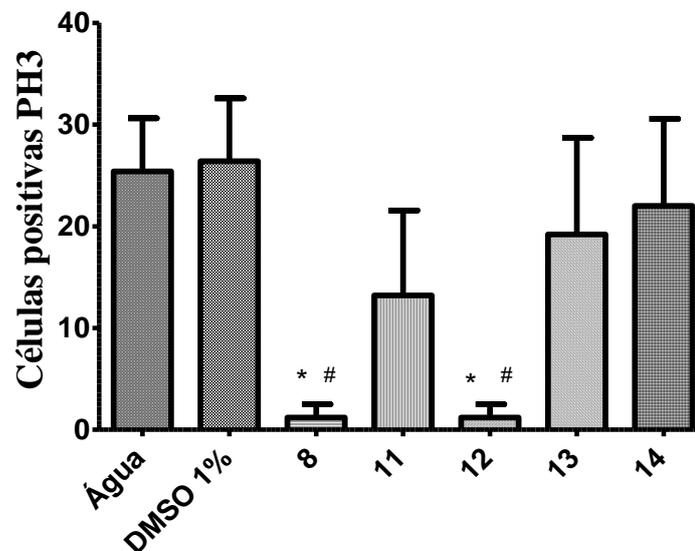
Fonte: Própria autora.

Nota: Núcleos marcados com DAPI (azul). Núcleo de células fosfohistona H3 imunoreativas indicadas pelas setas (vermelho). Núcleo de células caspase imunoreativas indicadas por pontas de seta (verde).

Nos imunoenaios envolvendo a marcação de PH3 foi observada a presença de células regenerativas nos grupos controle água e DMSO 1% (Figura 25), sendo que não há uma

diferença significativa entre o número de células positivas no controle água e DMSO 1%. Já para os grupos tratados com as tiossemicarbazonas **8** e **12** ocorreu uma significativa redução na contagem dessas células em relação aos grupos controle. Para **11**, essa tendência também foi observada, diferentemente de **13** e **14**. Ao compararmos esses dados com as análises histológicas, observamos que apesar de ter ocorrido danos às células digestivas, não foi ativado o mecanismo para regeneração envolvendo a fosfohistona H3 para os compostos **8** e **12**. Isso sugere que as tiossemicarbazonas tem potencial para interferir no processo de regeneração celular.

**Figura 25** – Contagem de células positivas para marcação de fosfo-histona PH3 para os grupos controles e tratados com as tiossemicarbazonas **8**, **11** – **14**.



Fonte: Própria autora.

Nota: \* =  $p < 0.001$  no teste de Tukey *versus* água; # =  $p < 0.001$  *versus* DMSO 1%.

No imunoenensaio envolvendo a marcação de caspase-3 não foi observada uma significativa contagem de células positivas para os controles, bem como para os grupos tratados com as tiossemicarbazonas. Diferente da pupa branca, que sua presença foi ativada devido renovação de células que ocorre nesse estágio. Um resultado similar ao exposto acima foi observado para os grupos controle e tratados com as tiossemicarbazonas durante a marcação da LC3A/B. A ausência de marcação dessas células sugere que a degeneração celular observada através dos cortes histológicos não esteja diretamente relacionada aos processos de apoptose e autofagia.

Não foi observada a marcação das peroxidases nos grupos controle e tratados com tiossemicarbazonas. Isso demonstra que não houve a ativação dessas enzimas nas células do intestino médio quando tratadas com as tiossemicarbazonas, sugerindo que o mecanismo de ação desses compostos não esteja relacionado a geração de radicais livres.

## 5 – CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos durante esse estudo podemos concluir que:

- A preparação e a caracterização das quatorze tiossemicarbazonas não foi uma etapa crítica na execução do trabalho, contudo uma maior atenção deve ser dada, principalmente, durante a caracterização de compostos inéditos em solução, devido à formação de isômeros.

- Com o aumento da concentração da tiossemicarbazona em água ocorre um aumento da turbidez no sistema, realçando que a baixa solubilidade desses compostos em água afeta a estabilidade da solução/suspensão formada na presença do co-solvente (DMSO 1%).

- Com relação à atividade larvicida, as tiossemicarbazonas derivadas de benzofenona foram mais ativas quando comparadas às derivadas de benzaldeído e acetofenona, sugerindo que a preparação de compostos com esse grupo poderia ser uma estratégia interessante para melhorar a atividade larvicida dentro dessa classe. Além disso, podemos destacar que a presença do grupo nitro não afeta essa atividade.

- Os dados do experimento de comportamento de nado e avaliação da morfologia externa e das células do intestino médio das larvas demonstram que as tiossemicarbazonas selecionadas promoveram uma redução na atividade locomotora que pode estar associada a deformações no abdômen e/ou alterações nas células do intestino médio. Essas informações atestam o efeito citotóxico das tiossemicarbazonas sobre as larvas de *Aedes aegypti*.

- Os dados dos ensaios de imunofluorescência utilizando células do intestino médio demonstram que para algumas tiossemicarbazonas testadas houve uma redução na contagem de células regenerativas, não houve ativação de caspases, LC3A/B e peroxidases.

Os dados desse trabalho demonstram que tiossemicarbazonas apresentam potencial para o desenvolvimento de novos agentes larvicidas, e que seriam necessários novos estudos sobre os danos causados nas células do intestino médio para a compreensão do mecanismo de ação desses compostos.

## 6 – REFERÊNCIAS

ACD/Lab 6.0. versão 6.0 (build 6.09/30 Sep. 2002): **HNMR DB software**, Advanced Chemistry Development Inc., 2002 Toronto, Canadá.

ACD/Lab 6.0. versão 6.0 (build 6.09/30 Sep. 2002): **pKa software**, Advanced Chemistry Development Inc., 2002 Toronto, Canadá.

AFRASIABI, Zahra et al. Appended 1,2-naphthoquinones as anticancer agents 1: synthesis, structural, spectral and antitumor activities of ortho-naphthaquinone thiosemicarbazone and its transition metal complexes. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], v. 357, n. 1, p.271-278, jan. 2004.

ALOGPS 2.1. 2001. Disponível em: <<http://www.vcclab.org/lab/alogps/>>. Acesso em: 10 dez. 2017.

ALOMAR, Kusai et al. Synthesis, structure and antifungal activity of thiophene-2,3-dicarboxaldehyde bis(thiosemicarbazone) and nickel(II), copper(II) and cadmium(II) complexes: Unsymmetrical coordination mode of nickel complex. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 126, p.76-83, set. 2013.

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.

ARAÚJO NETO, Luiz Nascimento de et al. Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophene-thiosemicarbazones derivatives. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 272, p.172-181, jun. 2017

ARSHIA, Arshia et al. Synthesis and urease inhibitory activities of benzophenone semicarbazones/thiosemicarbazones. **Medicinal Chemistry Research**, [s.l.], v. 25, n. 11, p.2666-2679, 10 ago. 2016.

BAL, Tanushree Ratan et al. Synthesis and evaluation of anti-HIV activity of isatin  $\beta$ -thiosemicarbazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 15, n. 20, p.4451-4455, out. 2005.

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, Heloísa; GAMBINO, Dinorah. The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. **Mini-reviews In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.31-39, 1 jan. 2004.

BHARTI, Neelam et al. Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 12, n. 23, p.3475-3478, dez. 2002.

BILLINGSLEY, P F. The Midgut Ultrastructure of Hematophagous Insects. **Annual Review Of Entomology**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.219-248, jan. 1990.

BISCEGLIE, Franco et al. Effects of polar substituents on the biological activity of thiosemicarbazone metal complexes. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 179, p.60-70, fev. 2018.

BLOMMEL, M. L. et al. Pregabalin: An antiepileptic agent useful for neuropathic pain. **American Journal Of Health-system Pharmacy**, [s.l.], v. 64, n. 14, p.1475-1482, 15 jul. 2007.

BRAGA, Ima Aparecida; VALLE, Denise. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.279-293, dez. 2007.

BRAGA, Ima Aparecida; VALLE, Denise. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.295-302, dez. 2007.

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, 2009. 160p.

BRASIL. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Dengue, Zika e Chikunguya**. Disponível em: <<https://rededengue.fiocruz.br/noticias/630-iraa-aponta-357-municipios-em-situacao-de-risco-para-dengue-zika-e-chikunguya>>. Acesso em: 26 dez. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Prevenção e combate: Dengue, Zika e Chikunguya** Portal da Saúde. Disponível em: < <http://combateaedes.saude.gov.br/pt/>>. Acesso em: 27 dez. 2017.

BRASIL. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Dengue vírus e vetor**. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html>>. Acesso em: 02 jan. 2018.

BRODOWSKA, Katarzyna et al. Coordination ability and biological activity of a naringenin thiosemicarbazone. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 165, p.36-48, dez. 2016.

CHANDRA, Ramesh; SRIVASTAVA, Pramod K.. Synthesis of 1-aryl-2-amino/anilino-4-phenyl-1,6-dihydro-1,3,5-triazine-6-thione and related thioureas. **Journal Of Chemical & Engineering Data**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.278-279, abr. 1983.

CHAUVIÈRE, Gérard et al. Synthesis and Biological Activity of Nitro Heterocycles Analogous to Megazol, a Trypanocidal Lead#. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 46, n. 3, p.427-440, jan. 2003.

CHENG, S et al. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 89, n. 1, p.99-102, ago. 2003.

COHEN, Ephraim. Chitin Biochemistry: Synthesis and Inhibition. **Annual Review Of Entomology**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.71-93, jan. 1987.

COHEN, Ephraim. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. **Pest Management Science**, [s.l.], v. 57, n. 10, p.946-950, 2001.

CONSOLI, Rotraut A.G.B.; OLIVEIRA, Ricardo Lourenço de. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994. 228p.

COSTA, Paulo et al. **Substâncias carboniladas e derivados**. Porto Alegre/MG: Bookman Companhia Ed, 2003. 411 p.

DIAS, L.c. et al. Design, structural and spectroscopic elucidation of new nitroaromatic carboxylic acids and semicarbazones for the in vitro screening of anti-leishmanial activity. **Journal Of Molecular Structure**, [s.l.], v. 1079, p.298-306, jan. 2015.

FERNANDES, Kenner Moraes. **Caracterização morfológica e da expressão de proteínas no intestino médio de *Aedes aegypti* durante a metamorfose e submetido a diferentes dietas**. 2014. 93 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal Deviçosa, Viçosa, 2014.

FORATTINI, Oswaldo Paulo. **Culicidologia medica: identificacao, biologia, epidemiologia**. 2. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002. Cap. 14. p. 453-492.

FOURNET, F. et al. Effects of Two Insect Growth Regulators on Ecdysteroid Production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal Of Medical Entomology**, [s.l.], v. 32, n. 5, p.588-593, 1 set. 1995.

FUJII, Naoaki et al. A novel assay revealed that ribonucleotide reductase is functionally important for interstrand DNA crosslink repair. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 23, n. 21, p.6912-6921, nov. 2015.

FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. **Dengue**. Instruções para pessoal de combate ao vetor. Manual de normas técnicas. 3 ed. Brasília, DF, 2001.

GANGISHETTI, Umesh et al. Effects of benzoylphenylurea on chitin synthesis and orientation in the cuticle of the *Drosophila* larva. **European Journal Of Cell Biology**, [s.l.], v. 88, n. 3, p.167-180, mar. 2009.

GRAF, J.-F. The role of insect growth regulators in arthropod control. **Parasitology Today**, [s.l.], v. 9, n. 12, p.471-474, dez. 1993.

GREENBAUM, Doron C. et al. Synthesis and Structure–Activity Relationships of Parasitocidal Thiosemicarbazone Cysteine Protease Inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 47, n. 12, p.3212-3219, jun. 2004.

IVACHTCHENKO, Alexandre V. et al. New Scaffolds for Combinatorial Synthesis. 1. 5-Sulfamoylisatins and Their Reactions with 1,2-Diamines. **Journal Of Combinatorial Chemistry**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.419-428, set. 2002.

JACK, David B. One hundred years of aspirin. **The Lancet**, [s.l.], v. 350, n. 9075, p.437-439, ago. 1997.

KANTOR, Isabel N. Dengue, Zika y Chikungunya. **Medicina** (B. Aires), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, v. 76, n. 2, p. 93-97, abr. 2016.

KHANYE, Setshaba D. et al. Synthesis and in vitro evaluation of gold(I) thiosemicarbazone complexes for antimalarial activity. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 104, n. 10, p.1079-1083, out. 2010.

KRAMER, Vance C.; SCHNELL, Danny J.; NICKERSON, Kenneth W. Relative toxicity of organic solvents to *Aedes aegypti* larvae. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.285-287, set. 1983.

LEMKE, Thomas L. et al. Synthesis of 5,6-dihydro-8(7H)-quinolinone thiosemicarbazones as potential antitumor agents. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 20, n. 10, p.1351-1354, out. 1977.

LI, J; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, [s.l.], v. 27, n. 48, p.6194-6206, out. 2008. Springer Nature.

LOPES, Marcos Pereira et al. Spinosad-mediated effects on the walking abilities, midgut, and Malpighian tubules of Africanized honey bee workers. **Pest Management Science**, [s.l.], p.1-27, 1 dez. 2017.

MARRIEL, Nadja Biondine et al. Deltamethrin-mediated survival, behavior, and oenocyte morphology of insecticide-susceptible and resistant yellow fever mosquitos (*Aedes aegypti*). **Acta Tropica**, [s.l.], v. 158, p.88-96, jun. 2016.

MATSUMOTO, Julia et al. LC–MS/MS assay for the quantitation of the ribonucleotide reductase inhibitor triapine in human plasma. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 146, p.154-160, nov. 2017.

MICCHELLI, Craig A.; PERRIMON, Norbert. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. **Nature**, [s.l.], v. 439, n. 7075, p.475-479, 7 dez. 2005.

MICHIGAN MOSQUITO CONTROL ASSOCIATION (United States). **Michigan mosquito manual**. Michigan, 2002. 108 p.

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

MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, [s.l.], v. 71, n. 1, p.67-70, jan. 2015.

NATAL, Delsio. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.205-207, jul./dez. 2002.

NOLDUS, Lucas P.j.j; SPINK, Andrew J; TEGELENBOSCH, Ruud A.j. Computerised video tracking, movement analysis and behaviour recognition in insects. **Computers And Electronics In Agriculture**, [s.l.], v. 35, n. 2-3, p.201-227, ago. 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Vigilância da infecção pelo vírus Zika, microcefalia e síndrome de Guillain-Barré. Orientações provisórias 7 de Abril de 2016 WHO/ZIKV/SUR/16.2 Rev.1, 2016.

OTA, André T et al. Modeling of the interconversion between *Z* and *E* isomeric forms of pyridine-2-formyl thiosemicarbazone. **Journal Of Molecular Structure: THEOCHEM**, [s.l.], v. 451, n. 3, p.269-275, out. 1998.

PALANIMUTHU, Duraippandi et al. A novel class of thiosemicarbazones show multi-functional activity for the treatment of Alzheimer's disease. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 139, p.612-632, out. 2017.

PAULA, Fávero Reisdorfer; SERRANO, Silvia Helena Pires; TAVARES, Leoberto Costa. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.1013-1020, mar. 2009.

PÉREZ-REBOLLEDO, Anayive et al. N(4)-Methyl-4-nitroacetophenone thiosemicarbazone and its nickel(II) complex: Experimental and theoretical structural studies. **Polyhedron**, [s.l.], v. 26, n. 7, p.1449-1458, maio 2007.

REEVE, Wilkins; BARRON, Eugene R. New syntheses of thiadiazinones, thiazolidinedione hydrazones, and hydroxythiazoles from phenyl (trichloromethyl) carbinols. **The Journal Of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 40, n. 13, p.1917-1920, jun. 1975.

ROGOLINO, Dominga et al. Anti-proliferative effects of copper (II) complexes with hydroxyquinoline-thiosemicarbazone ligands. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 128, p.140-153, mar. 2017.

ROMAO, Susana; MÜNZ, Christian. LC3-associated phagocytosis. **Autophagy**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.526-528, 7 jan. 2014. Informa UK Limited.

ROSE, Robert I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerging Infectious Diseases**, Washington, v. 7, n. 1, p. 17-23, fev. 2001.

ROSS, Ted M.. Dengue Virus. **Clinics In Laboratory Medicine**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.149-160, mar. 2010.

SABOIA-VAHIA, Leonardo et al. Protein expression in the midgut of sugar-fed *Aedes albopictus* females. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.290-295, 2012. Springer Nature.

SALGADO, Vincent 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 jan. 2018.

SARODNICK, Gerhard et al. Quinoxalines. Part 12: Synthesis and structural study of 1-(thiazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-b]quinoxalines—the dehydrogenative cyclization with hydroxylamine hydrochloride. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 59, n. 33, p.6311-6321, ago. 2003.

SCUDELER, Elton Luiz; SANTOS, Daniela Carvalho dos. Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). **Micron**, [s.l.], v. 44, p.125-132, jan. 2013.

SHIFF, Clive. Vector Control: Methods for Use by Individuals and Communities. **Parasitology Today**, [s.l.], v. 14, n. 11, p.470, nov. 1998.

SIDDAL, J. B. Insect growth regulators and insect control: A critical appraisal. **Environmental Health Perspectives**, [s.l.], v.14, p. 119-126, abr. 1976.

SILVA, Jeferson G. da et al. Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper (II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 65, p.415-426, jul. 2013.

SILVA, João Bosco P. da et al. Thiosemicarbazones as *Aedes aegypti* larvicidal. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 100, p.162-175, jul. 2015.

SOARES, Mariana A. et al. Thiosemicarbazones as inhibitors of tyrosinase enzyme. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 27, n. 15, p.3546-3550, ago. 2017.

SOARES, Tatiane Sanches. **Construção de uma biblioteca de inibidores de proteases em sistema phage display e seleção de inibidores específicos para proteases digestivas de larvas de *Aedes aegypti***. 2012. 85 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo (unifesp), São Paulo: [s.n.], 2012. 85 p, 2012.

SOARES, Tatiane Sanches. **Estudos moleculares de enzimas do tipo tripsina presentes no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti***. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo (unifesp), São Paulo: [s.n.], 2009. 106 p, 2009

SOUZA, Marina Azevêdo et al. The antimicrobial activity of lapachol and its thiosemicarbazone and semicarbazone derivatives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 3, p. 342-351, maio 2013.

STEFANINI, Mario; MARTINO, Cesare de; ZAMBONI, Luciano. Fixation of Ejaculated Spermatozoa for Electron Microscopy. **Nature**, [s.l.], v. 216, n. 5111, p.173-174, out. 1967.

TANIDA, Isei; UENO, Takashi; KOMINAMI, Eiki. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 36, n. 12, p.2503-2518, dez. 2004. Elsevier BV.

TAUIL, Pedro Luiz. Urbanização e ecologia do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 17 (Suplemento), p.99-102, 2001.

TAVARES, Tatiane Teixeira et al. Gold(I) complexes with aryl-thiosemicarbazones: Molecular modeling, synthesis, cytotoxicity and TrxR inhibition. **Polyhedron**, [s.l.], v. 132, p.95-104, ago. 2017.

TENÓRIO, Rômulo P. et al. Tiosemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, [s.l.], v. 28, n. 6, p.1030-1037, dez. 2005.

TOMÉ, Hudson W. et al. Survival and swimming behavior of insecticide-exposed larvae and pupae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.195-203, 2014.

TUA SAÚDE (Org.). **Saiba como é o Ciclo de vida do *Aedes Aegypti***. 2016. Disponível em: <[www.tuasaude.com/ciclo-de-vida-do-aedes-aegypti](http://www.tuasaude.com/ciclo-de-vida-do-aedes-aegypti)>. Acesso em: 01 dez. 2017

ULLAS, Giliyar V. et al. Synthesis of C-nucleoside analog of (S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenine and related acyclonucleosides. **The Journal Of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 53, n. 11, p.2413-2418, maio 1988.

VALOTTO, Cleyde Ferreira Barreto et al. Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pelo tanino catéquico isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae). **Revista de Patologia Tropical**, [s.l.], v. 39, n. 4, p.309-321, 31 jan. 2011.

VALOTTO, Cleyde Ferreira Barreto 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**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.194-200, abr. 2011.

VUTEY, Venn et al. Human topoisomerase IB is a target of a thiosemicarbazone copper (II) complex. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 606, p.34-40, set. 2016.

WEB OF SCIENCE. Disponível em: <<https://clarivate.com/products/web-of-science/>>. Acesso em: 09 jan. 2018.

WILKINSON, David A. et al. Straightforward multi-object video tracking for quantification of mosquito flight activity. **Journal Of Insect Physiology**, [s.l.], v. 71, p.114-121, dez. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance**. WHO/CDS/WHOPES/97.2; 1996.

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

XUE, Chao-bin et al. 3D-QSAR and molecular docking studies of benzaldehyde thiosemicarbazone, benzaldehyde, benzoic acid, and their derivatives as phenoloxidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 15, n. 5, p.2006-2015, mar. 2007.

ZARA, Ana Laura de Sene Amâncio et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.1-2, jun. 2016.

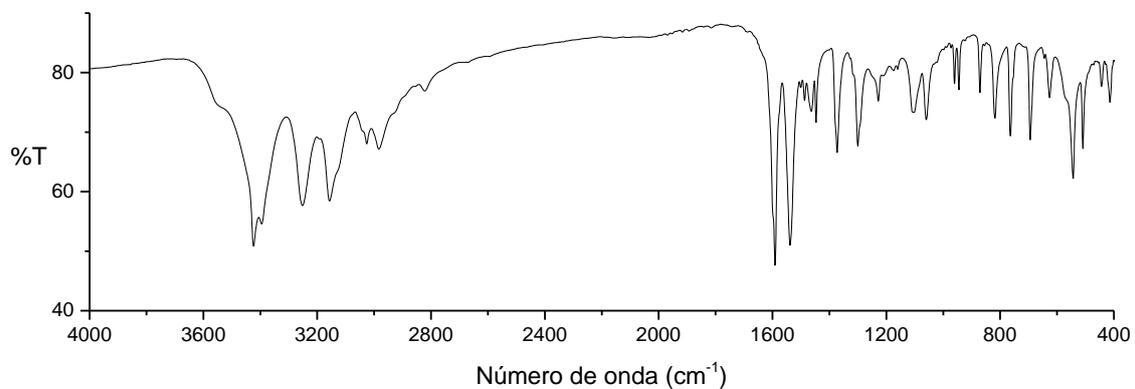
ZHANG, Jianzhen; ZHU, Kun Yan. Characterization of a chitin synthase cDNA and its increased mRNA level associated with decreased chitin synthesis in *Anopheles quadrimaculatus* exposed to diflubenzuron. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [s.l.], v. 36, n. 9, p.712-725, set. 2006.

ZHAO, Xueling et al. *Aedes aegypti* peroxidase gene characterization and developmental expression. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [s.l.], v. 31, n. 4-5, p.481-490, mar. 2001.

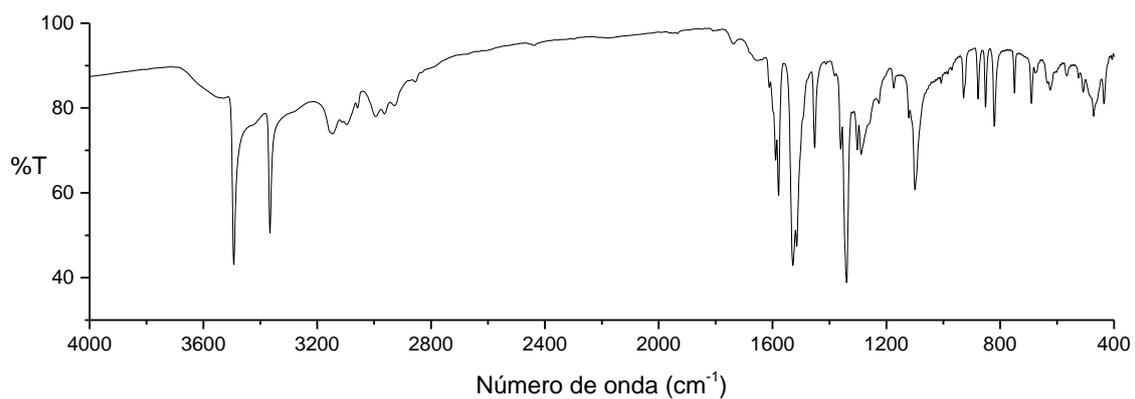
ZHAO, Zhigang et al. Microwave-assisted synthesis and in vitro antibacterial activity of novel steroidal thiosemicarbazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 22, n. 24, p.7730-7734, dez. 2012.

# APÊNDICES

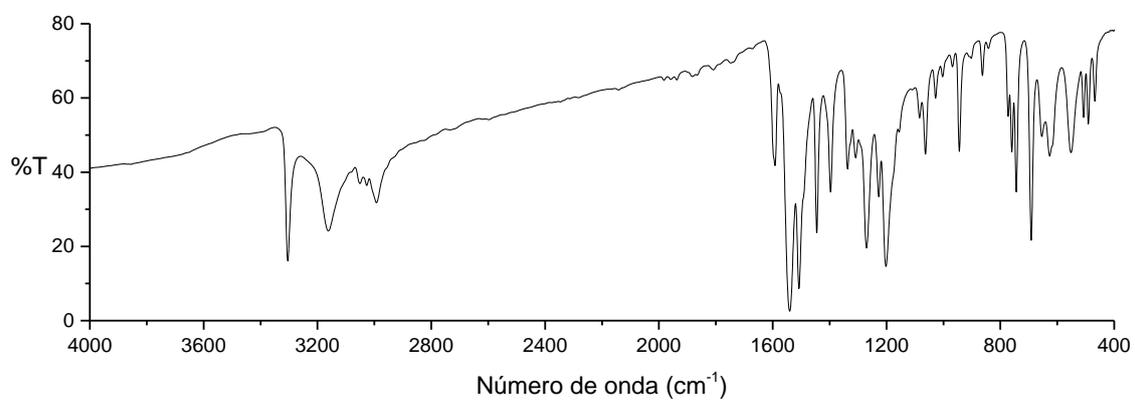
## Espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas estudadas nesse trabalho



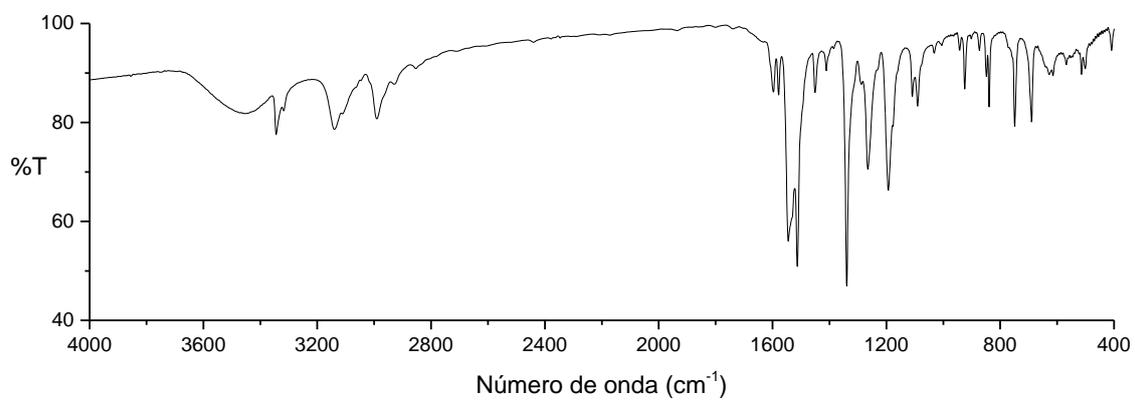
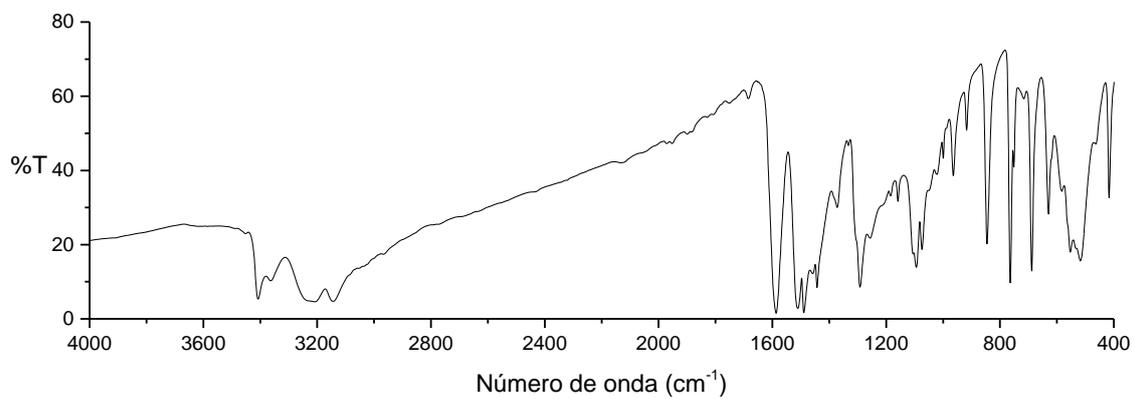
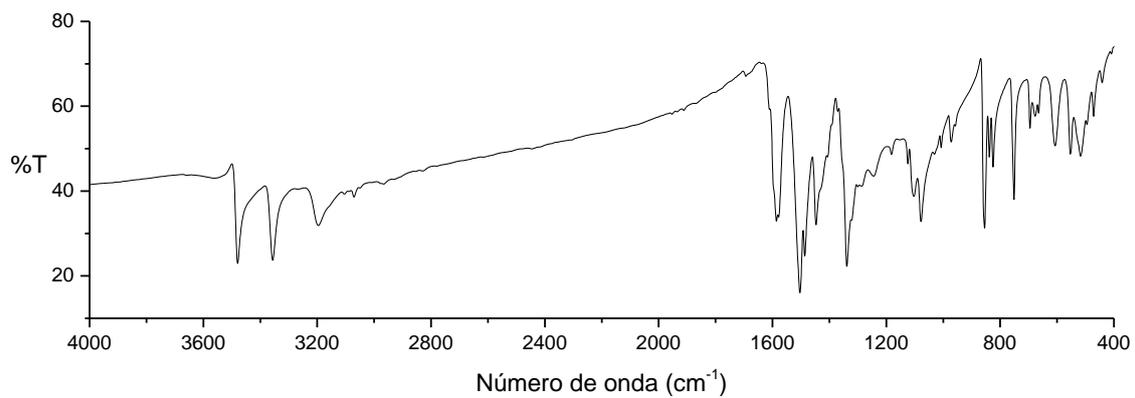
**Composto 1**

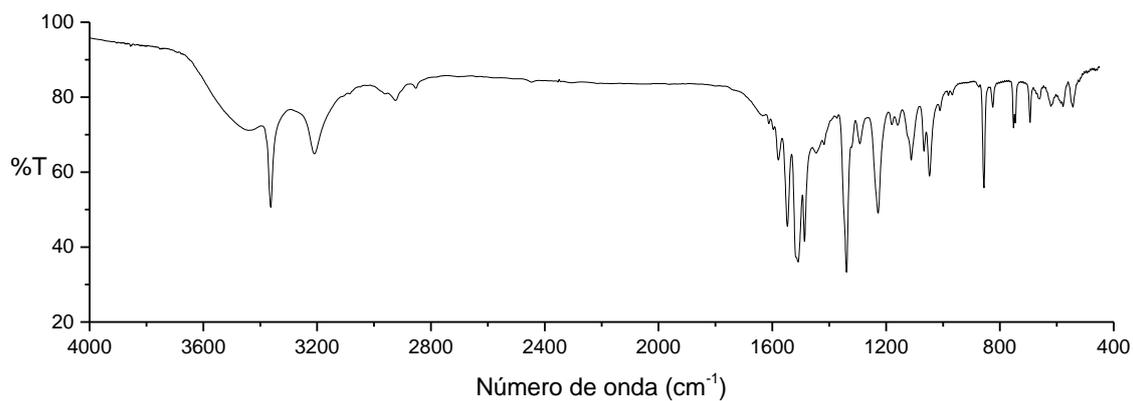
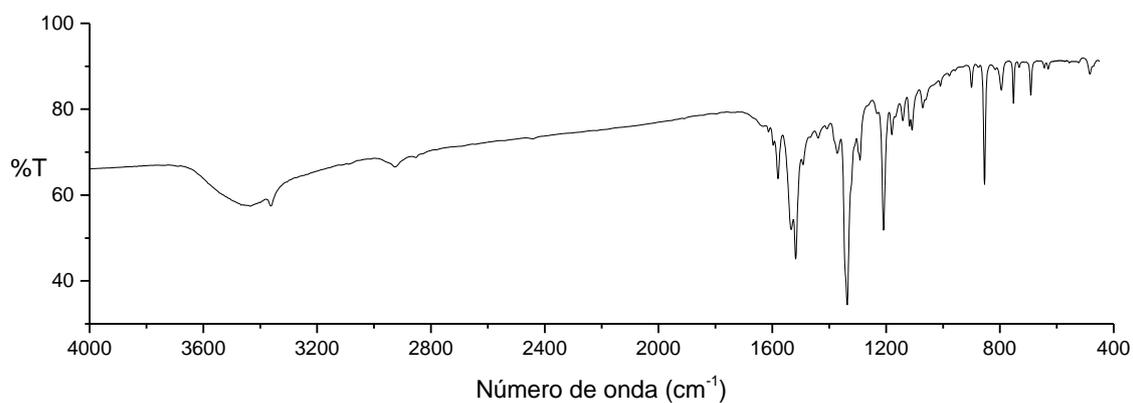
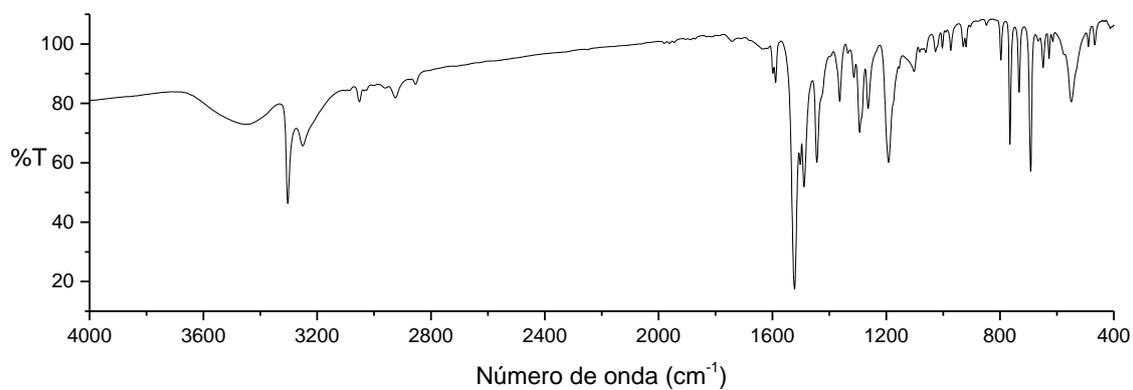


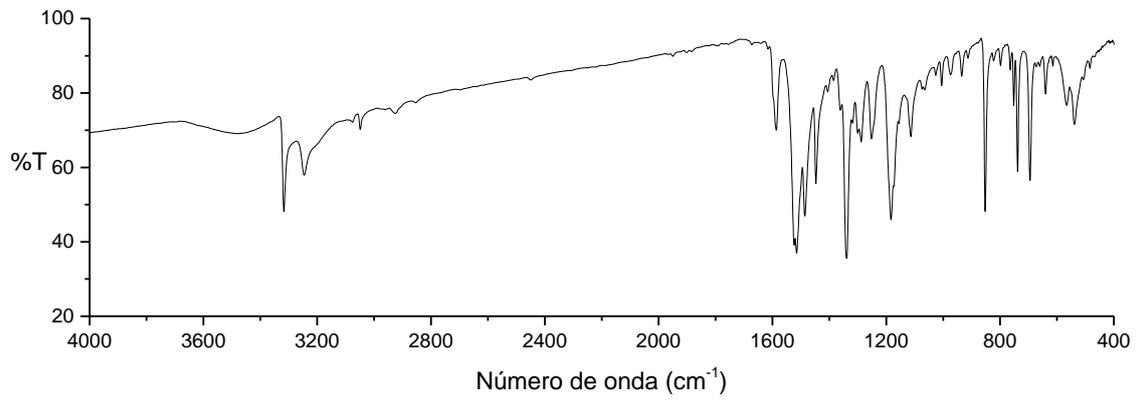
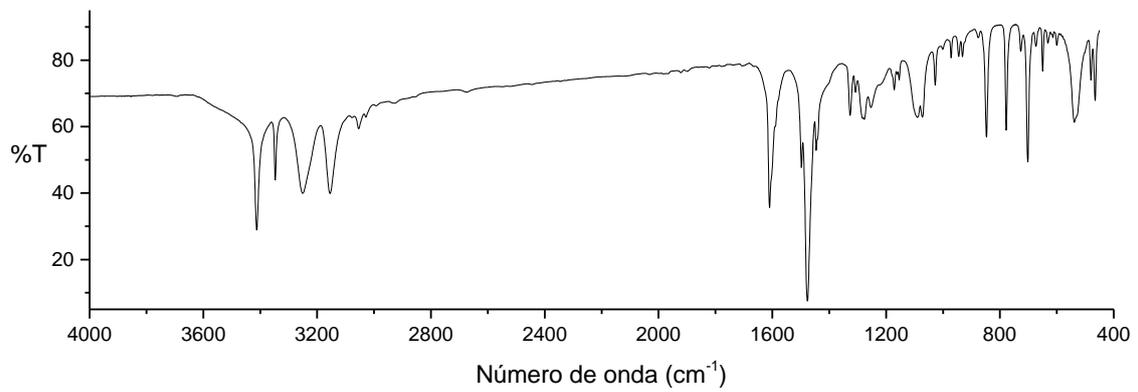
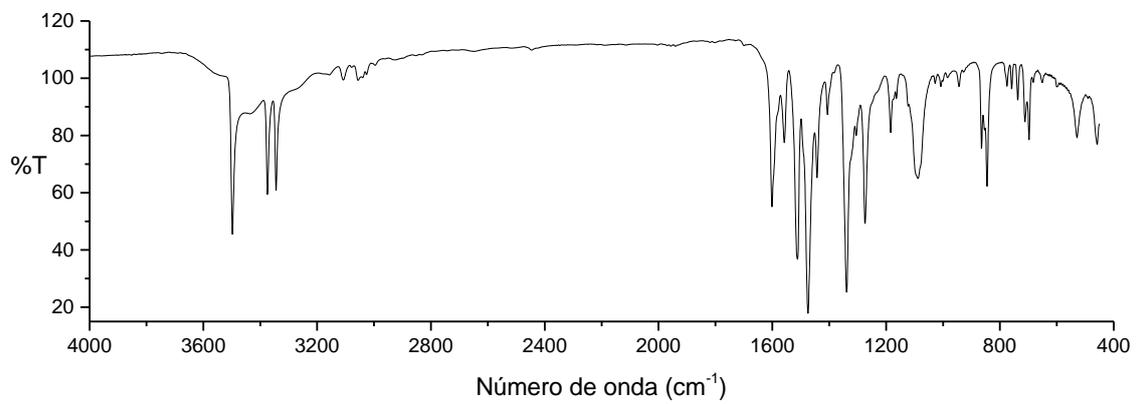
**Composto 2**

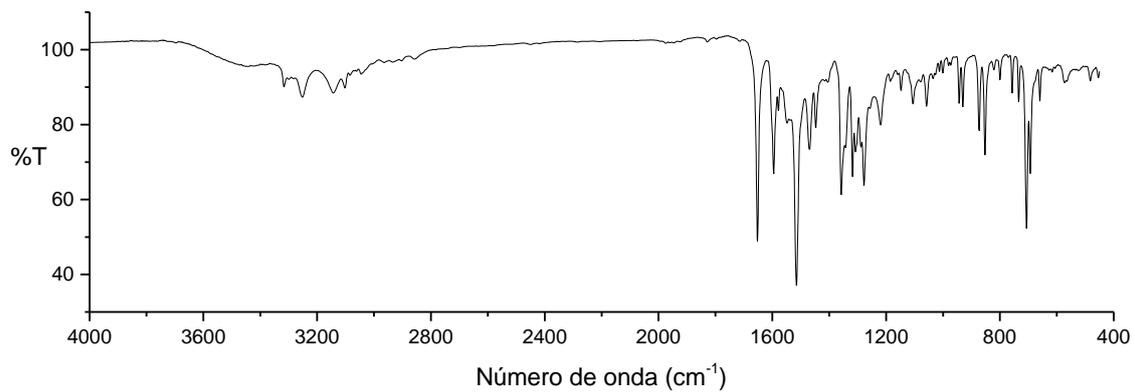
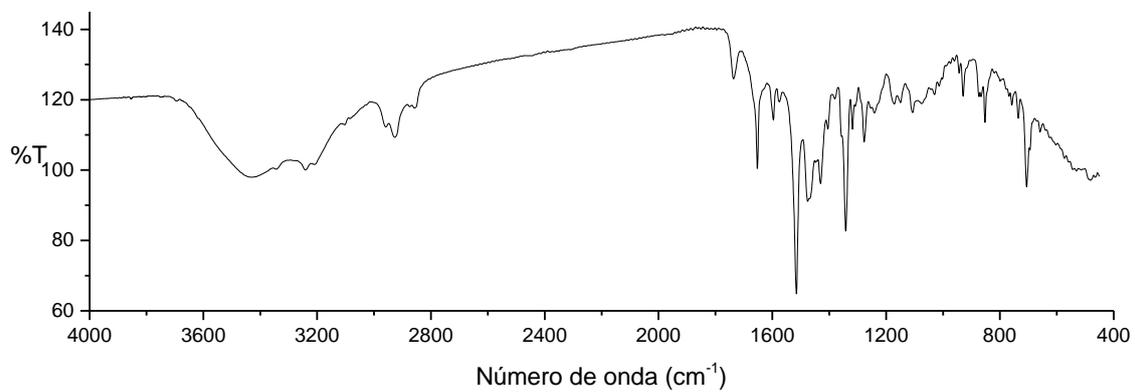


**Composto 3**

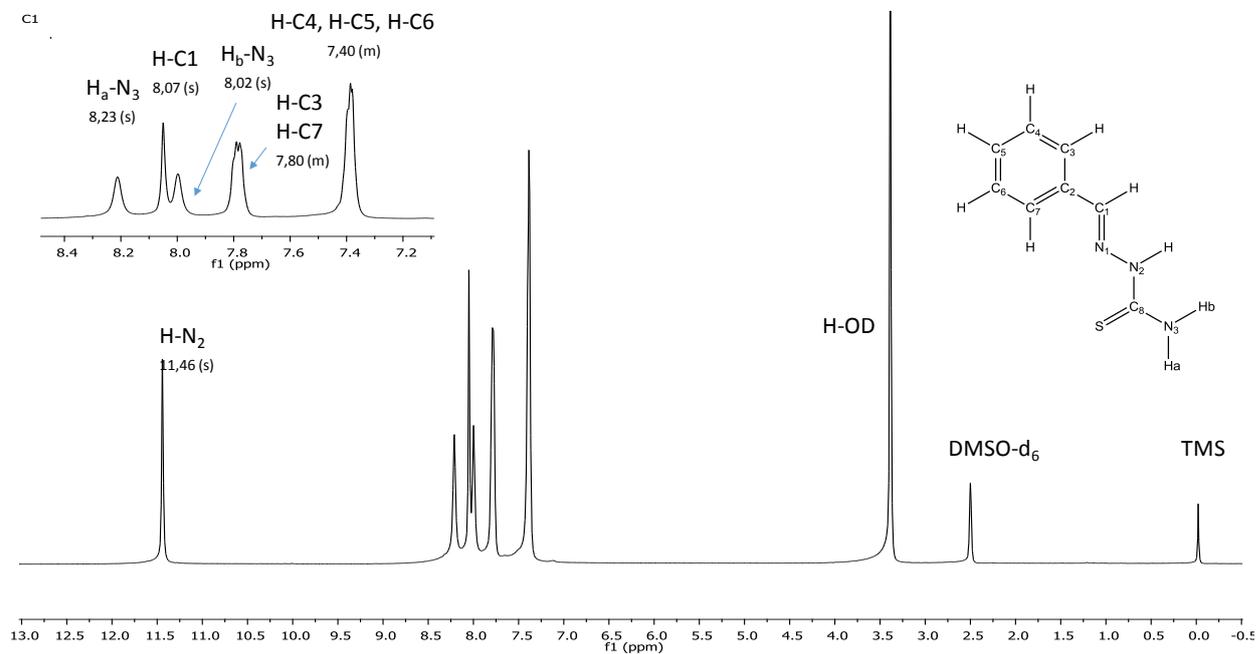
**Composto 4****Composto 5****Composto 6**

**Composto 7****Composto 8****Composto 9**

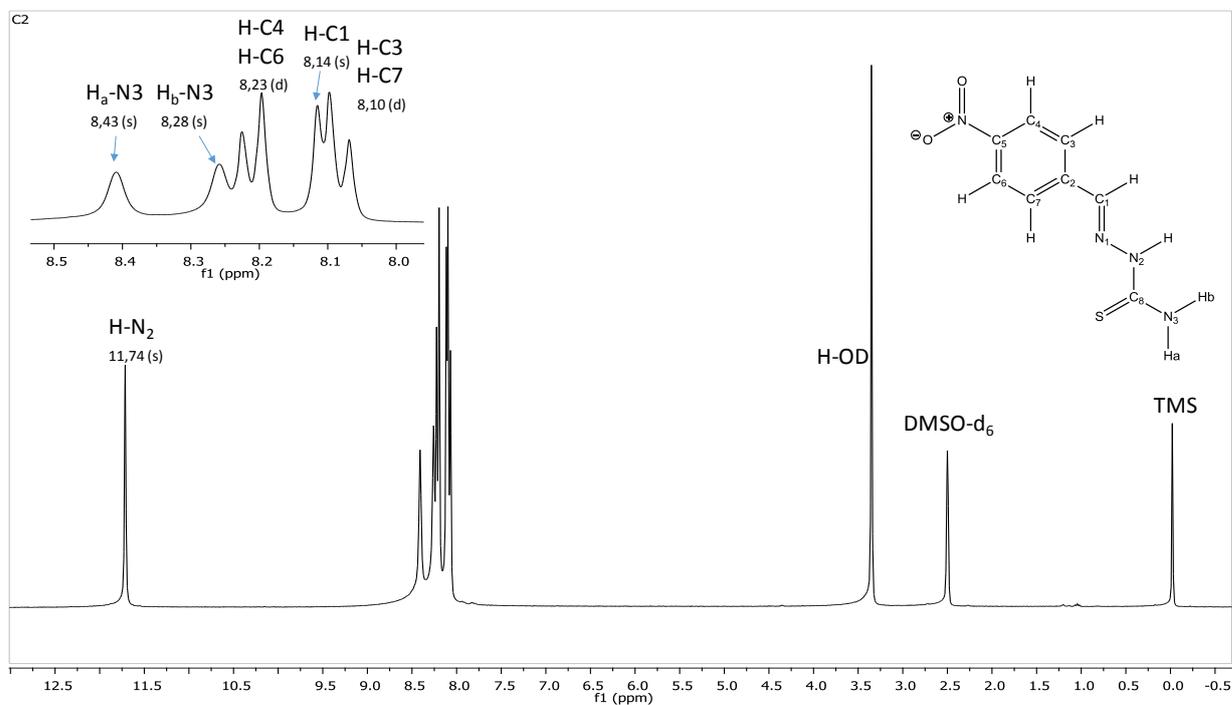
**Composto 10****Composto 11****Composto 12**

**Composto 13****Composto 14**

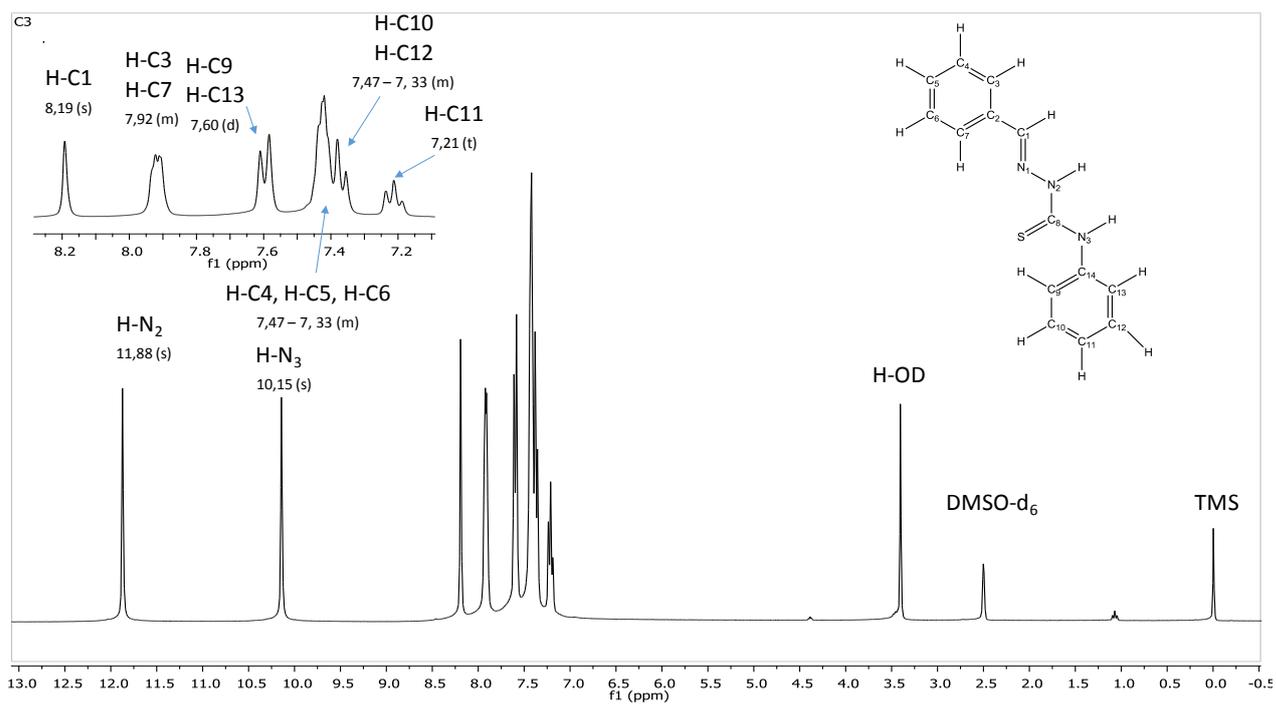
## Espectros de ressonância magnética nuclear das tiossemicarbazonas estudadas nesse trabalho



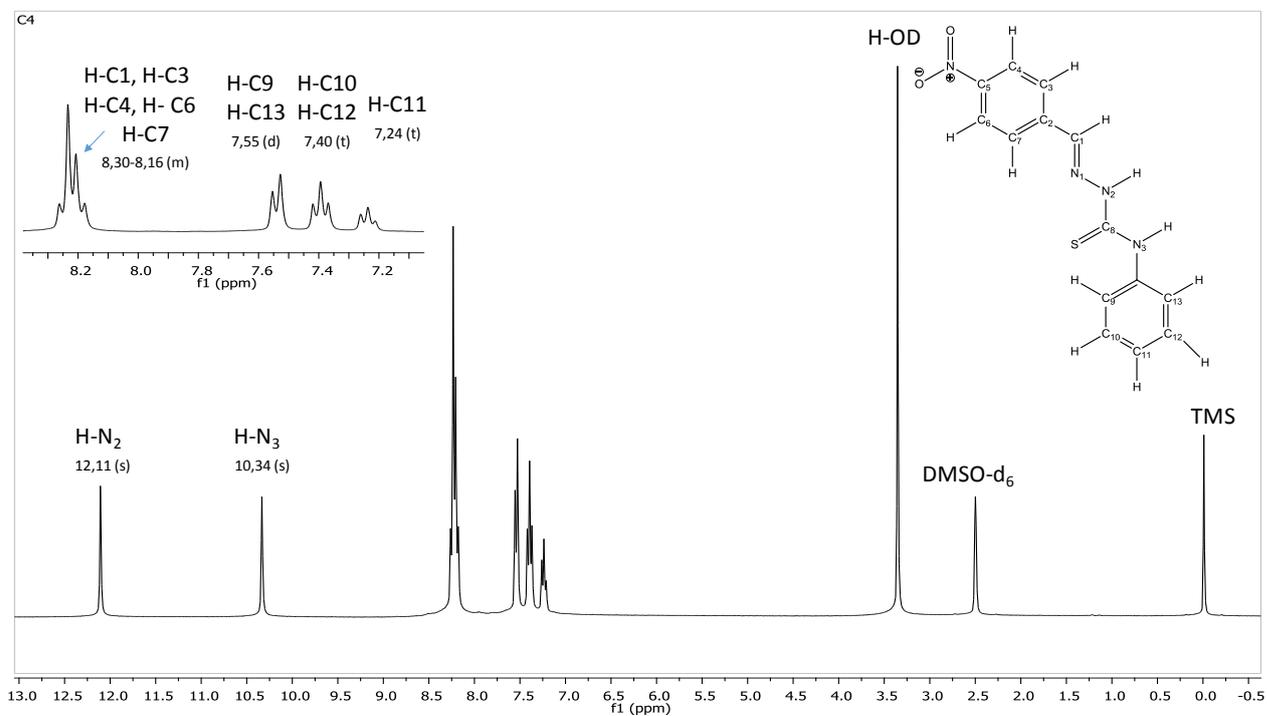
**Composto 1**



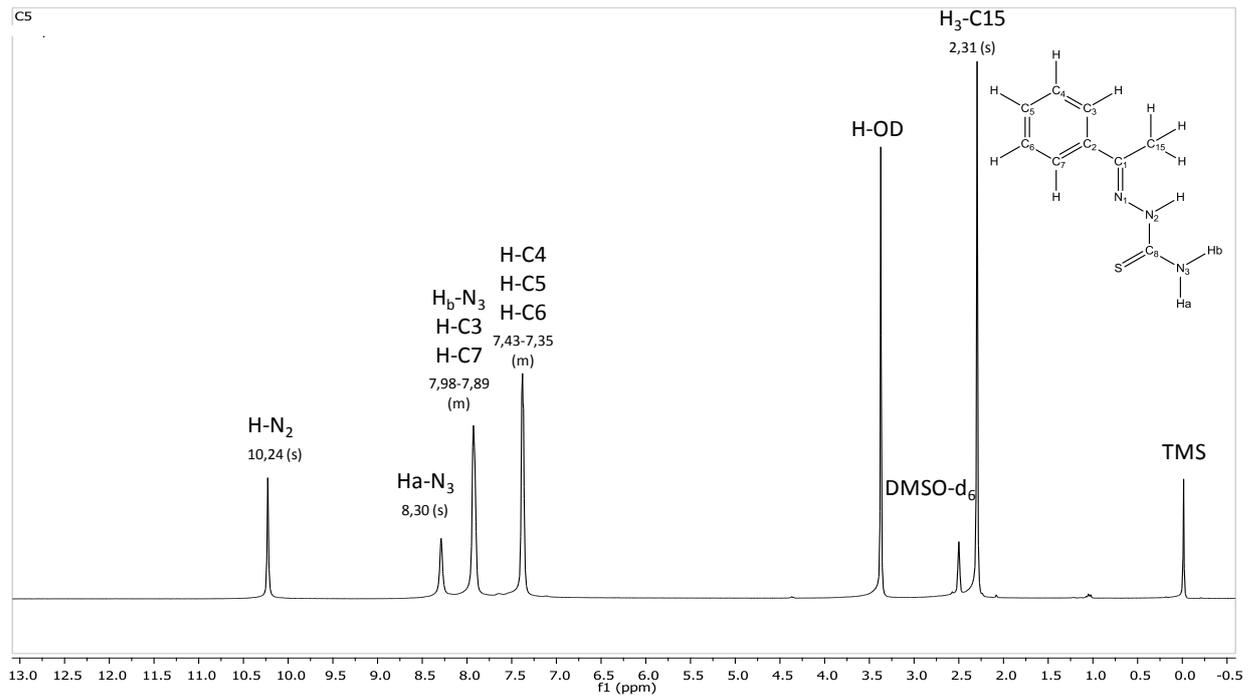
**Composto 2**



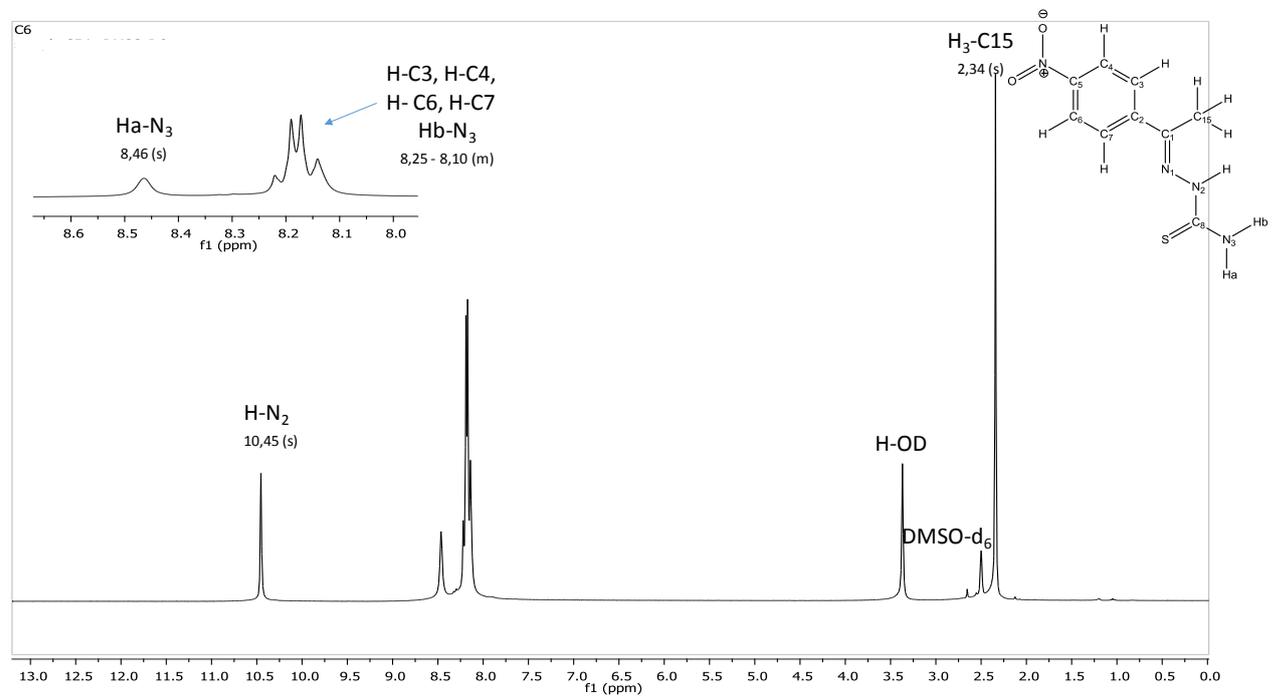
Composto 3



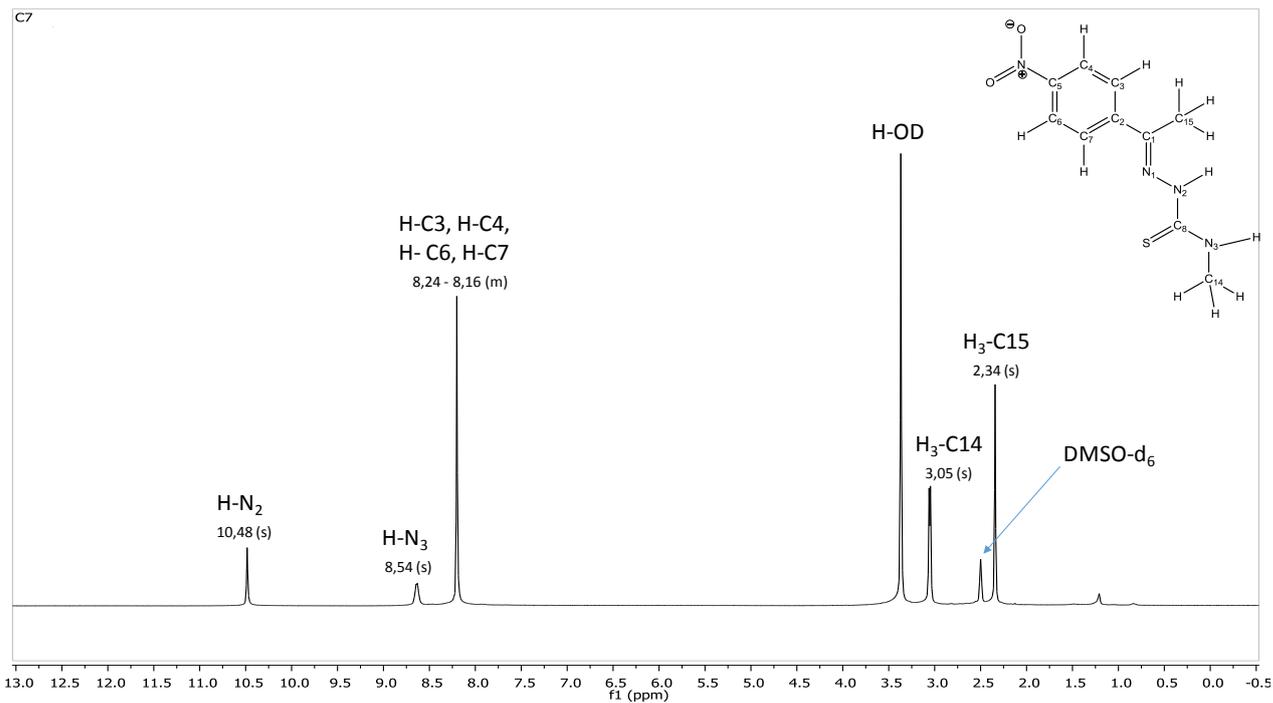
Composto 4



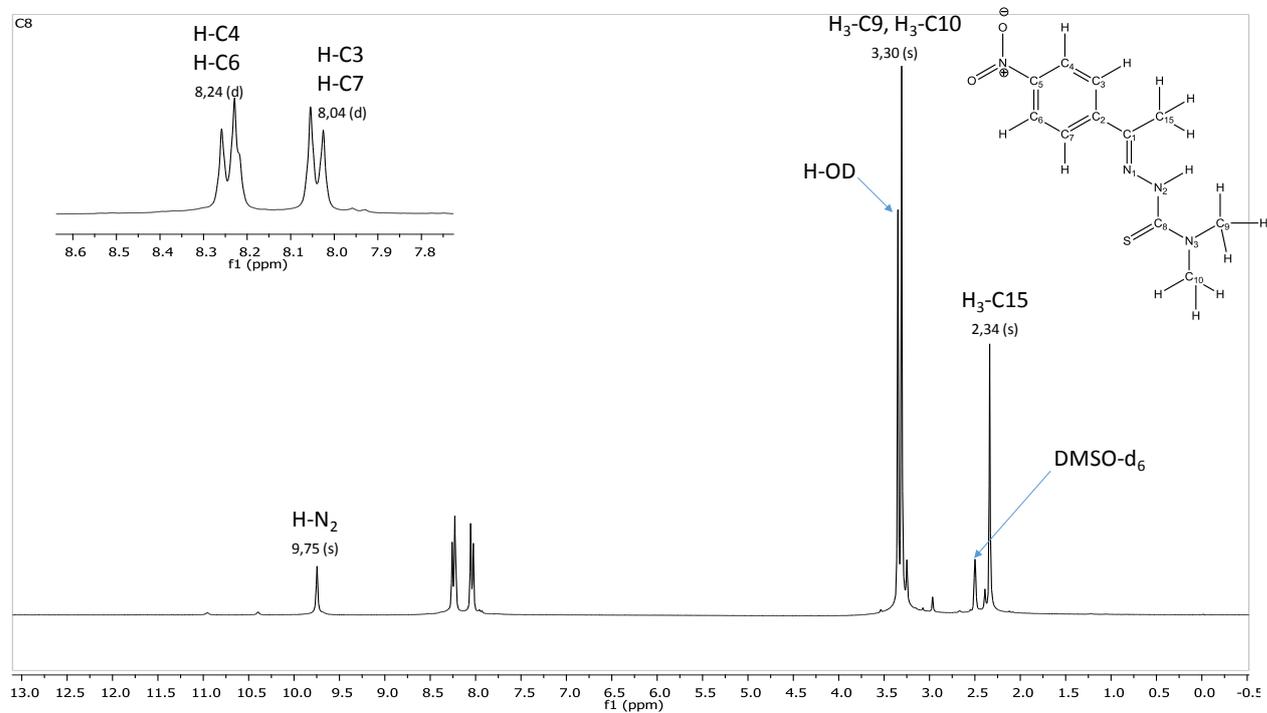
Composto 5



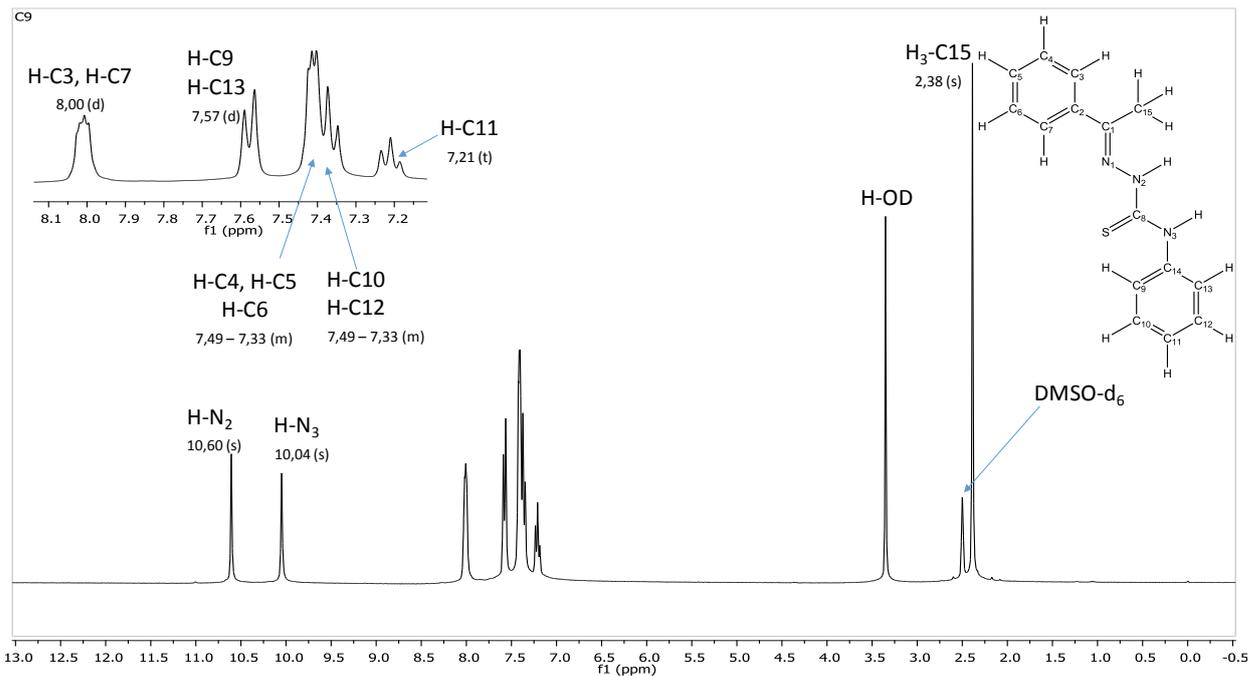
Composto 6



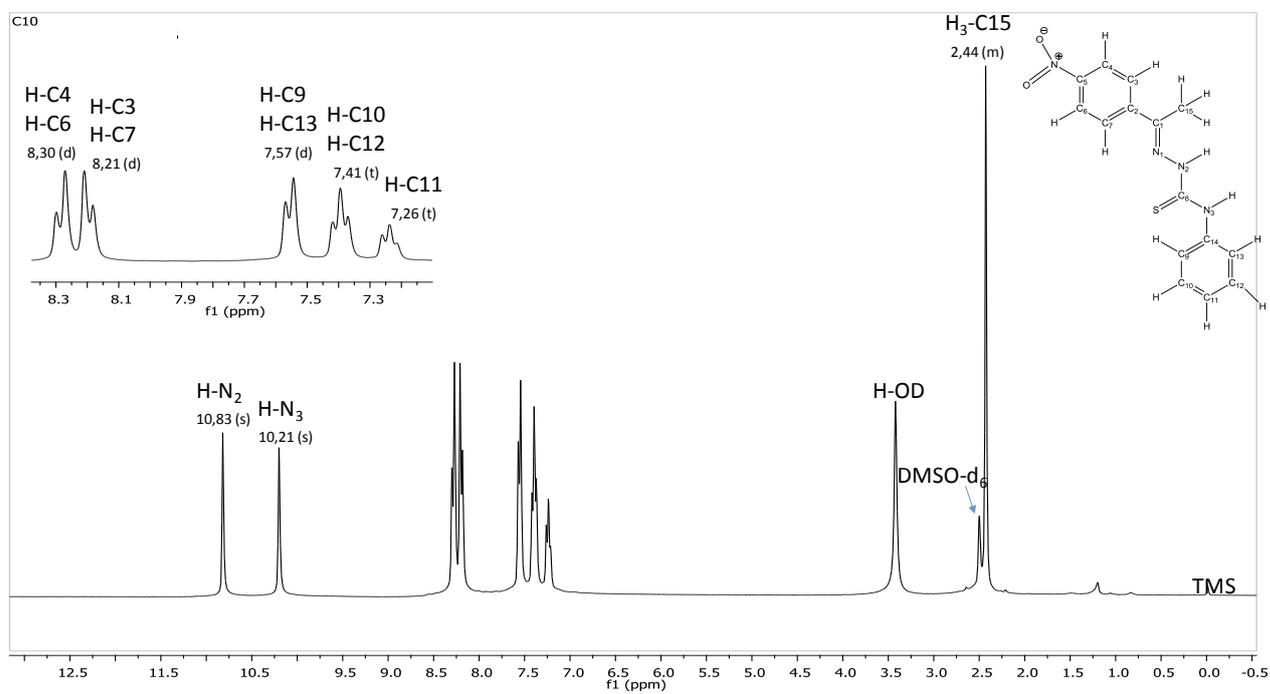
Composto 7



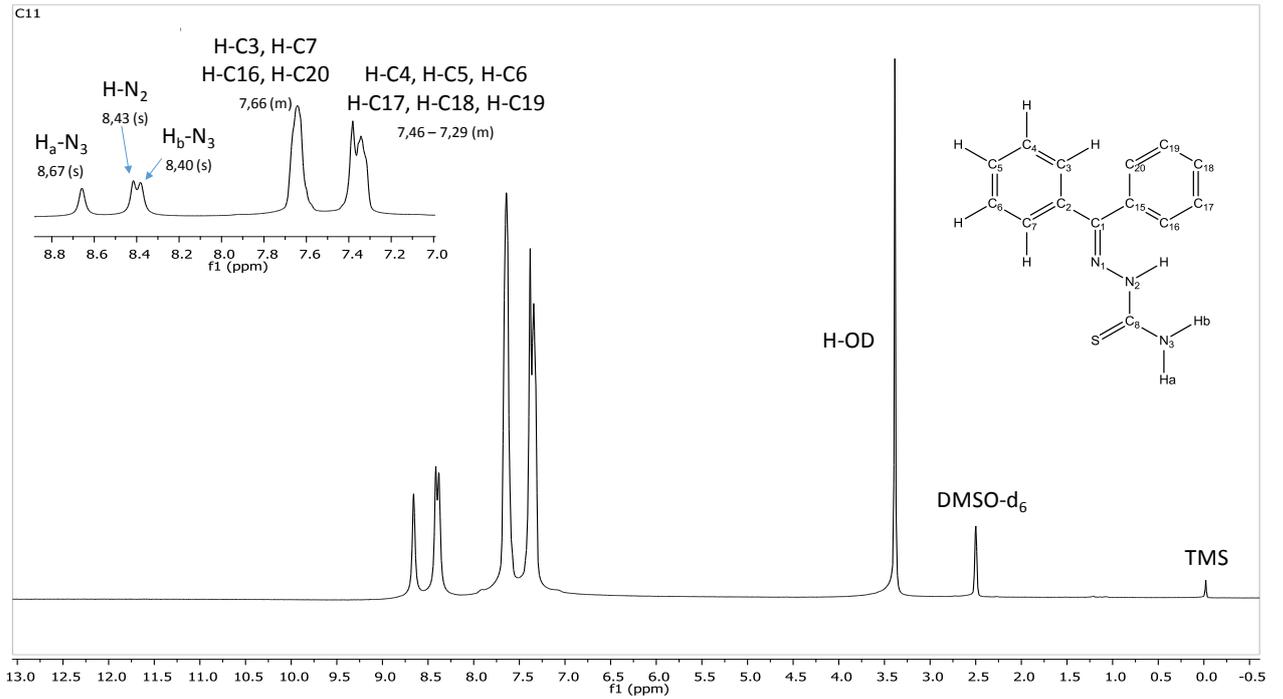
Composto 8



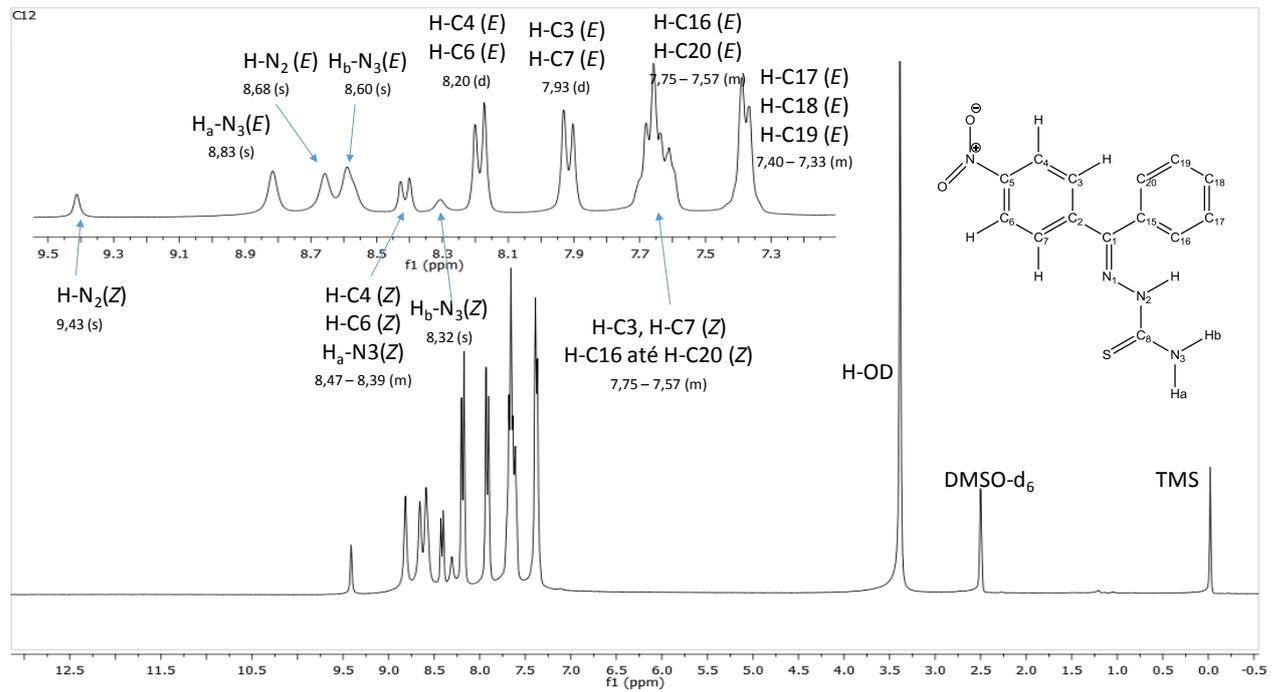
Composto 9



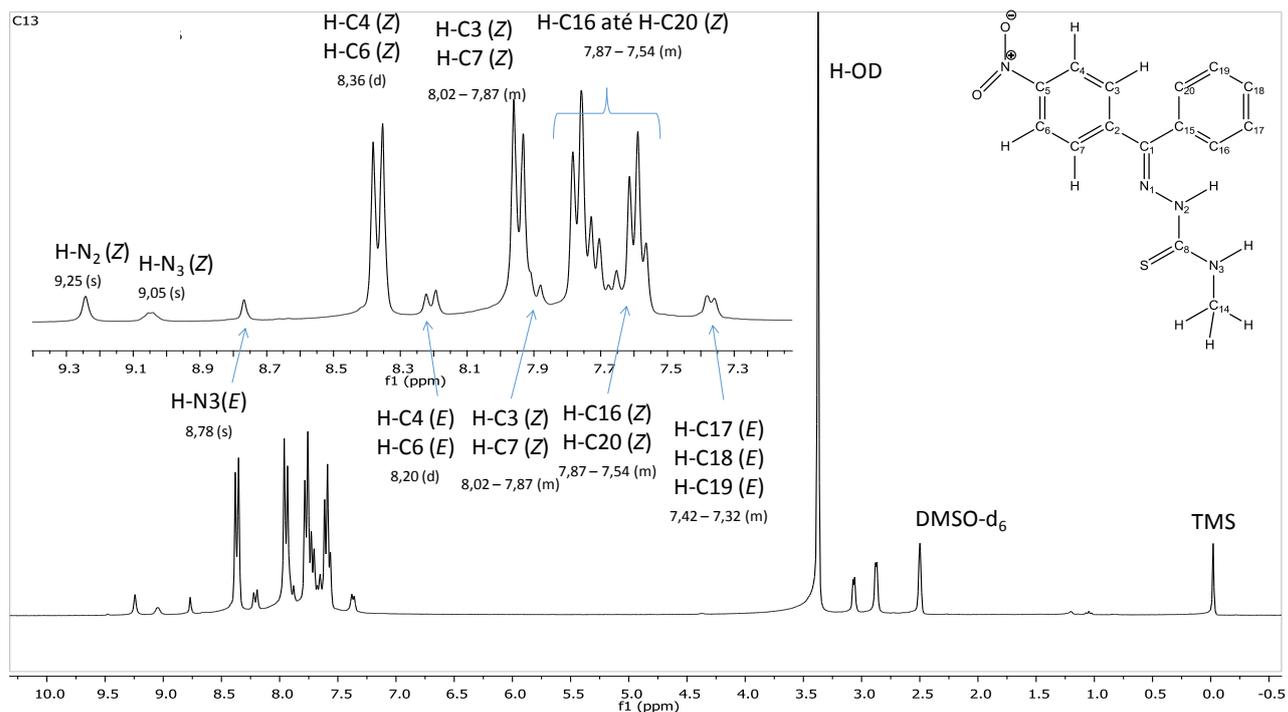
Composto 10



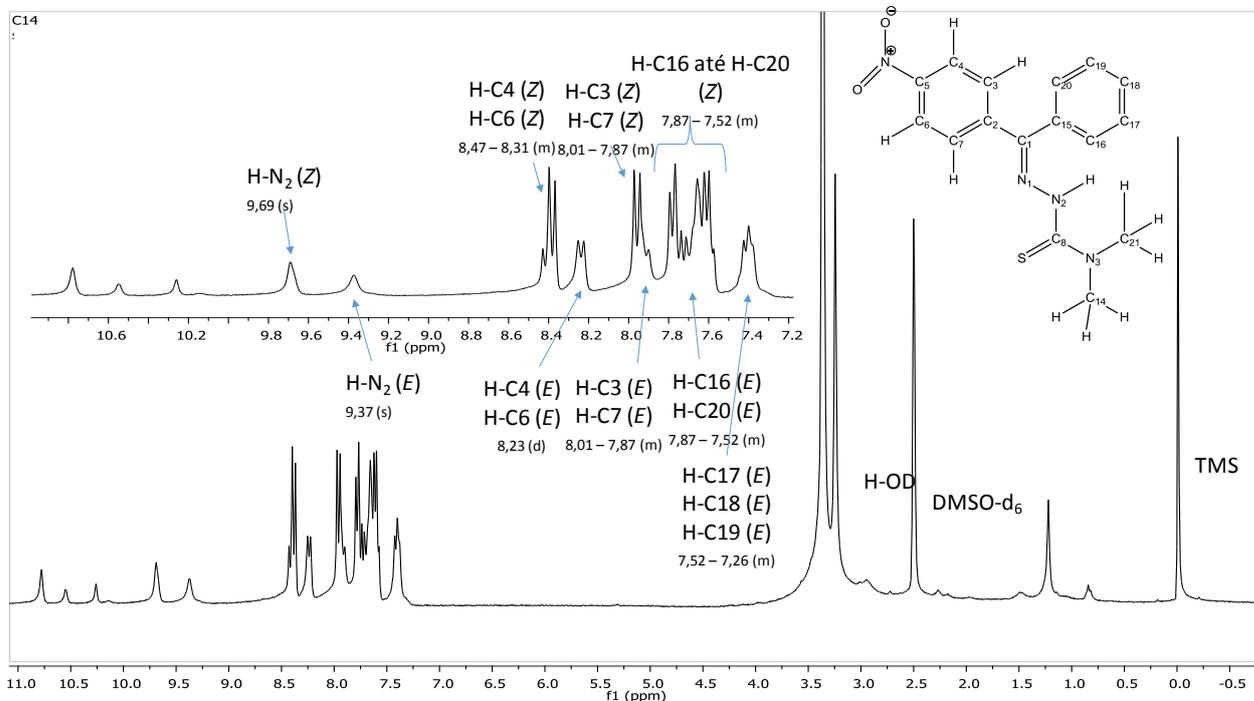
Composto 11



Composto 12

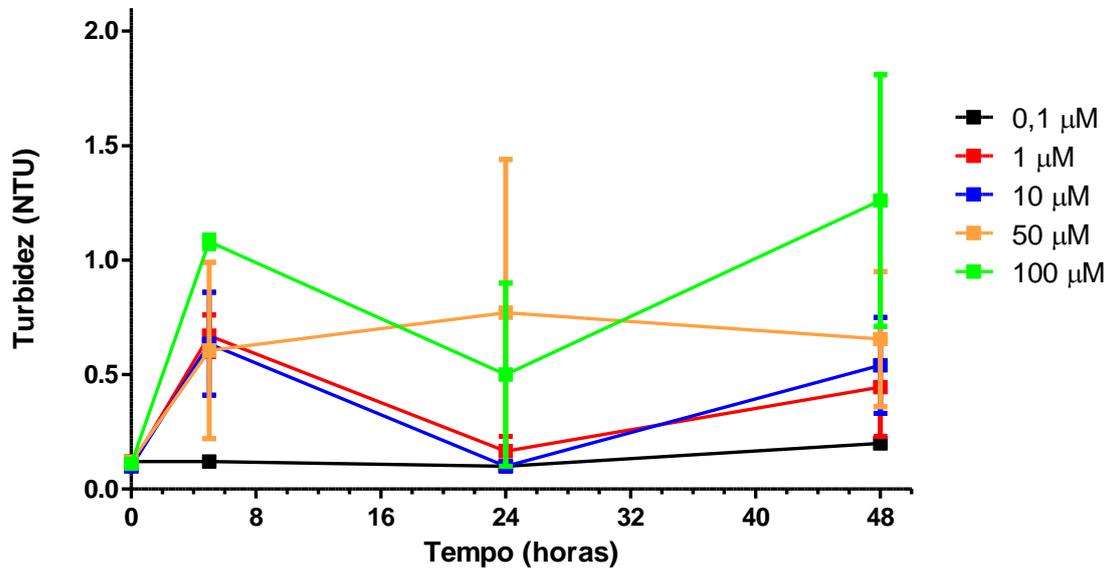


Composto 13

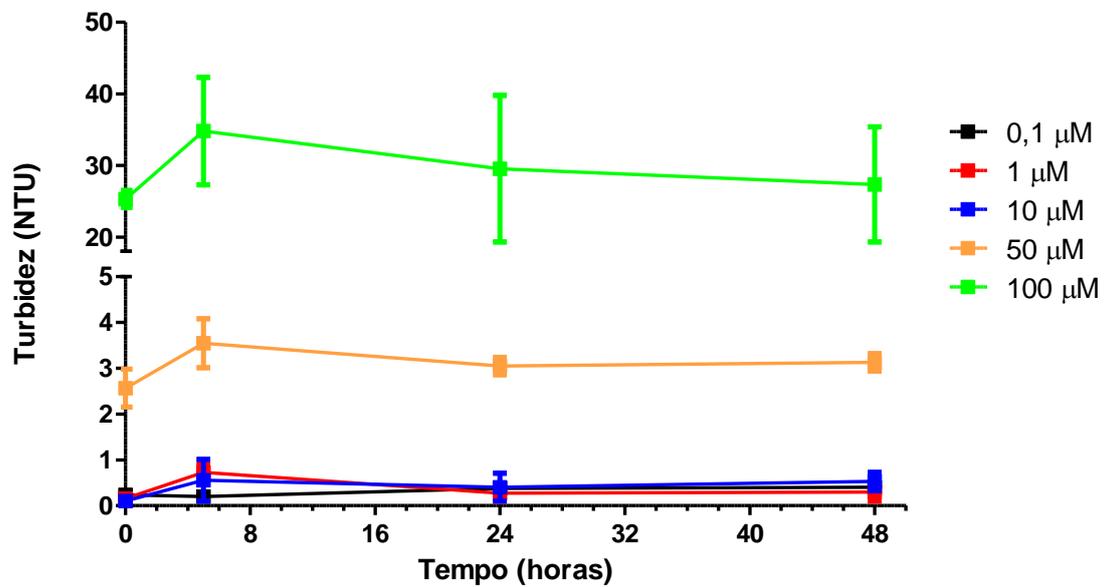


Composto 14

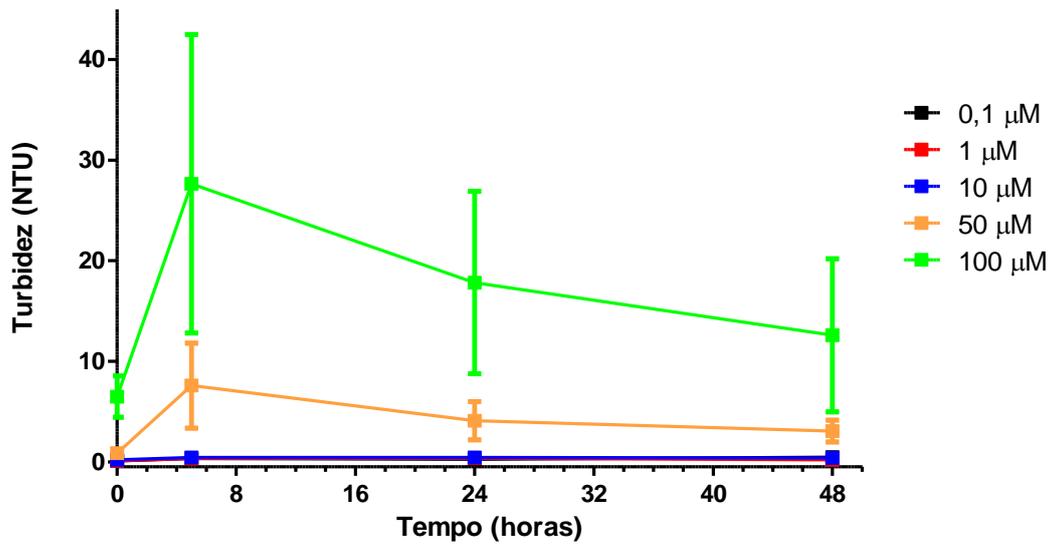
**Gráficos de turbidez em função do tempo para as tiosemicarbonas estudadas nesse trabalho**



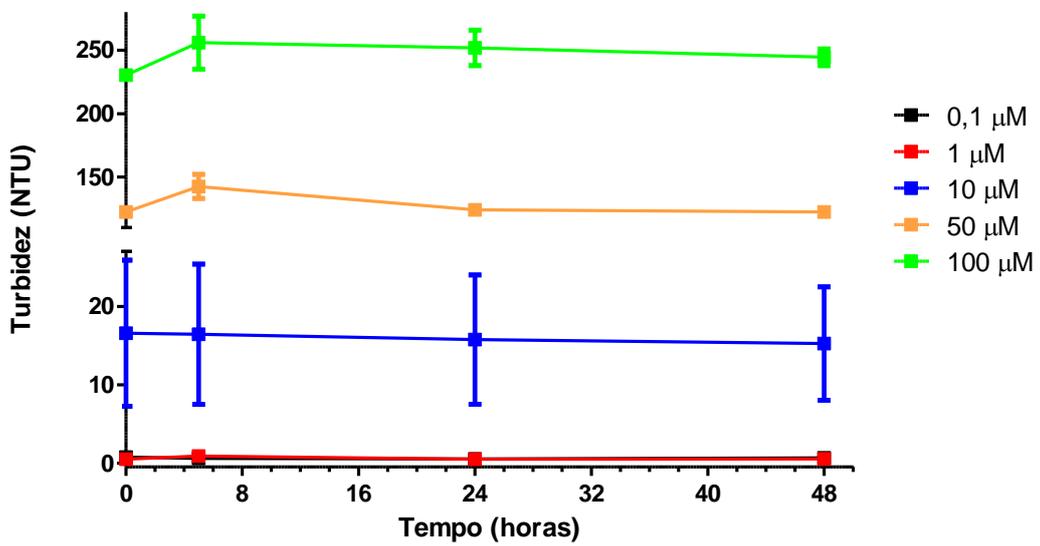
**Composto 1**



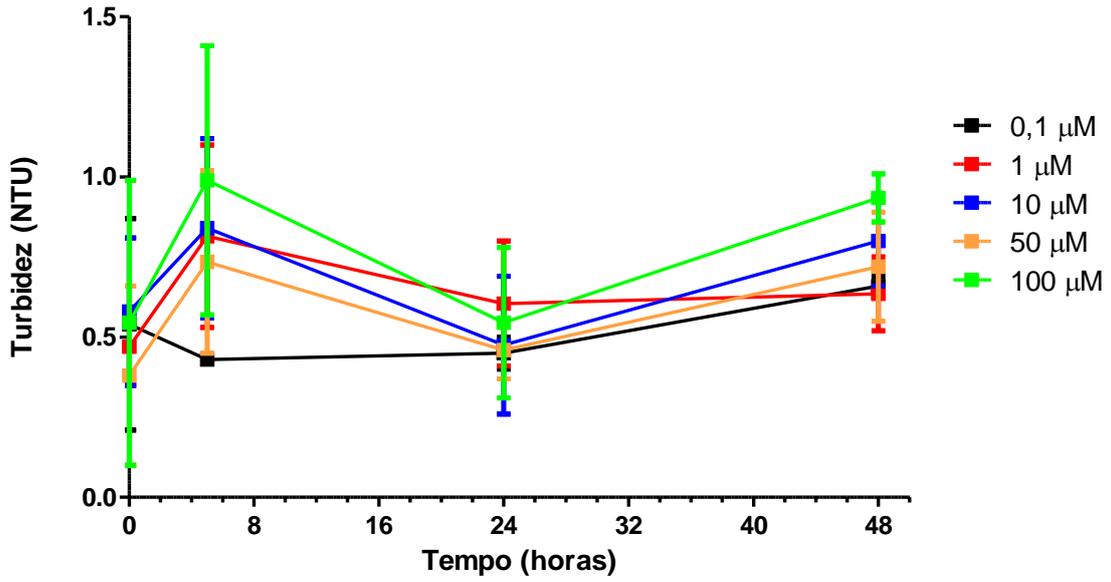
**Composto 2**



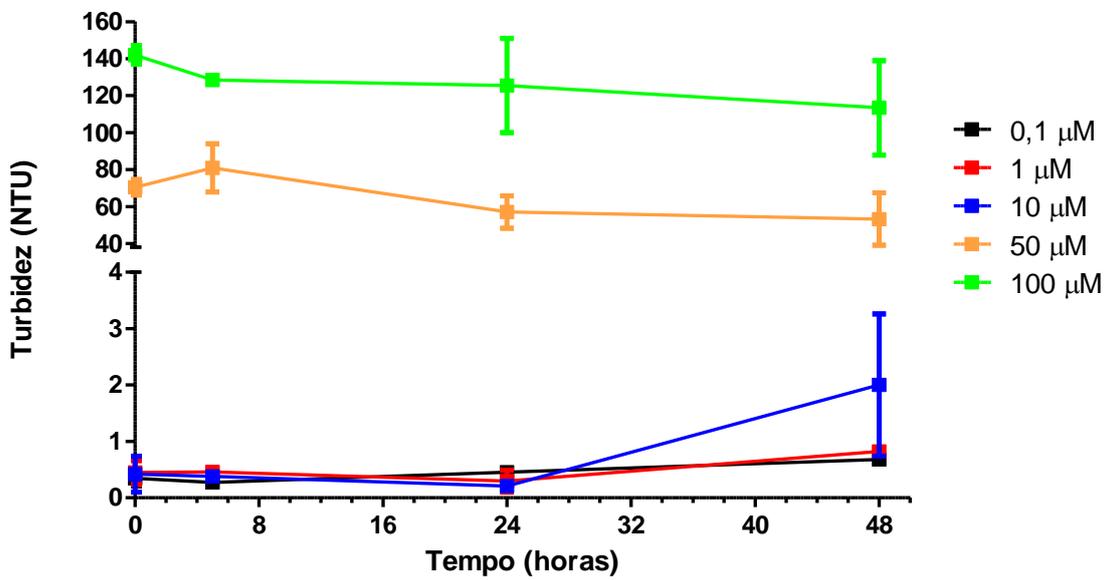
**Composto 3**



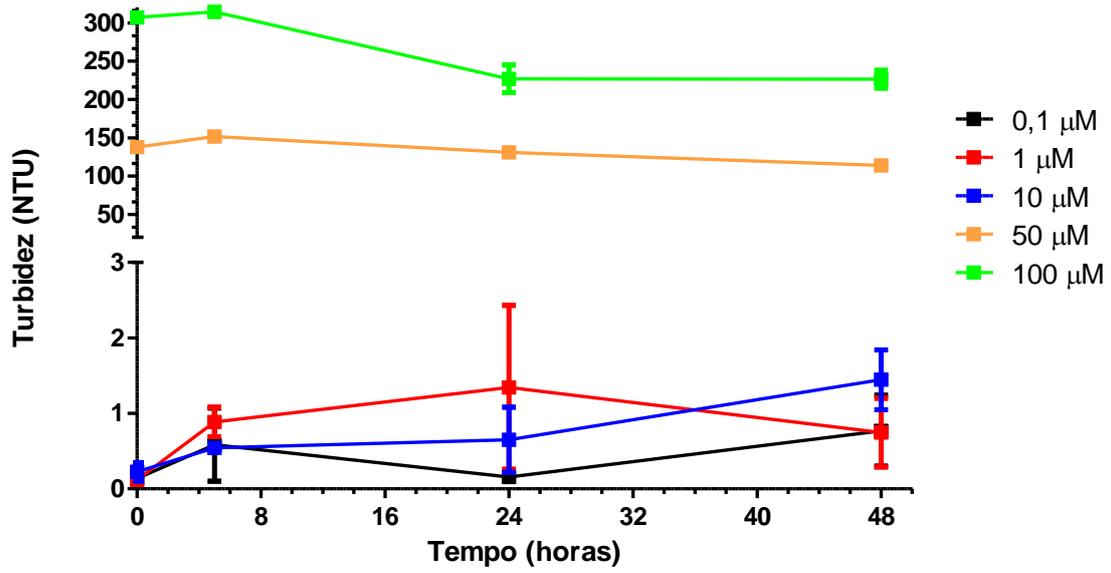
**Composto 4**



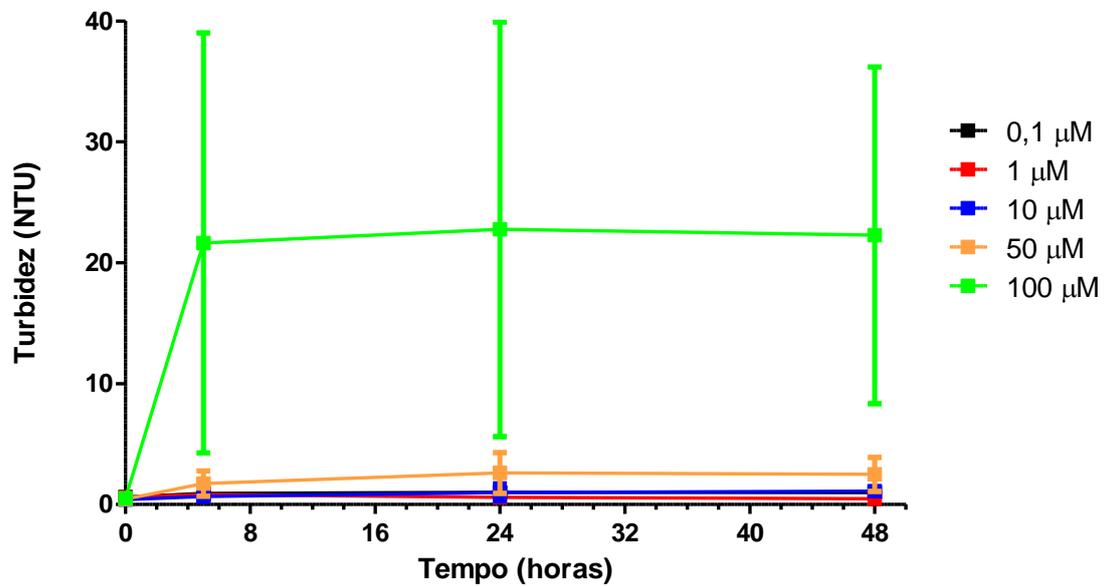
Composto 5



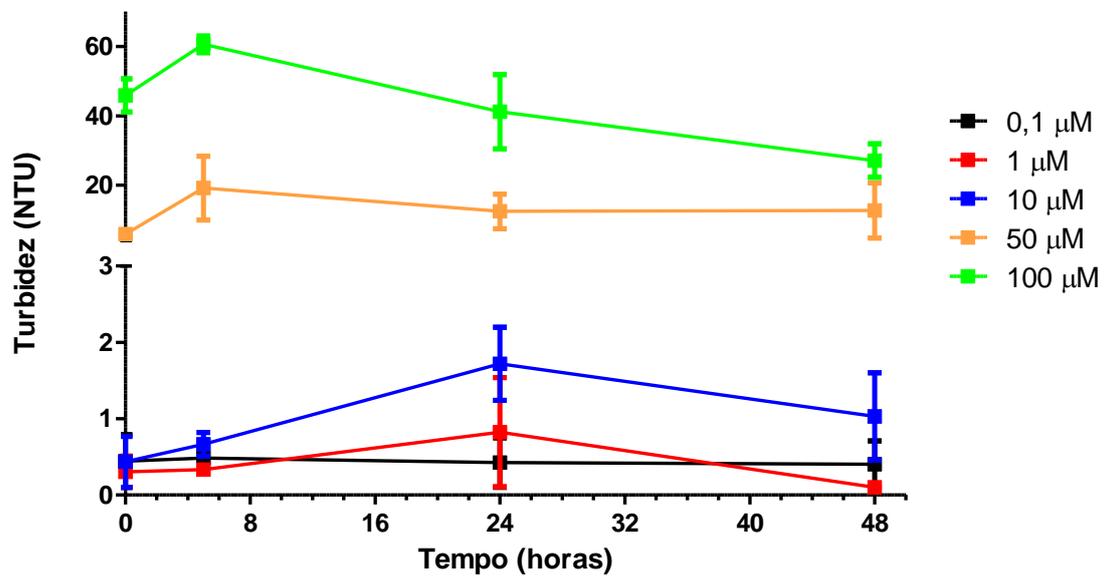
Composto 6



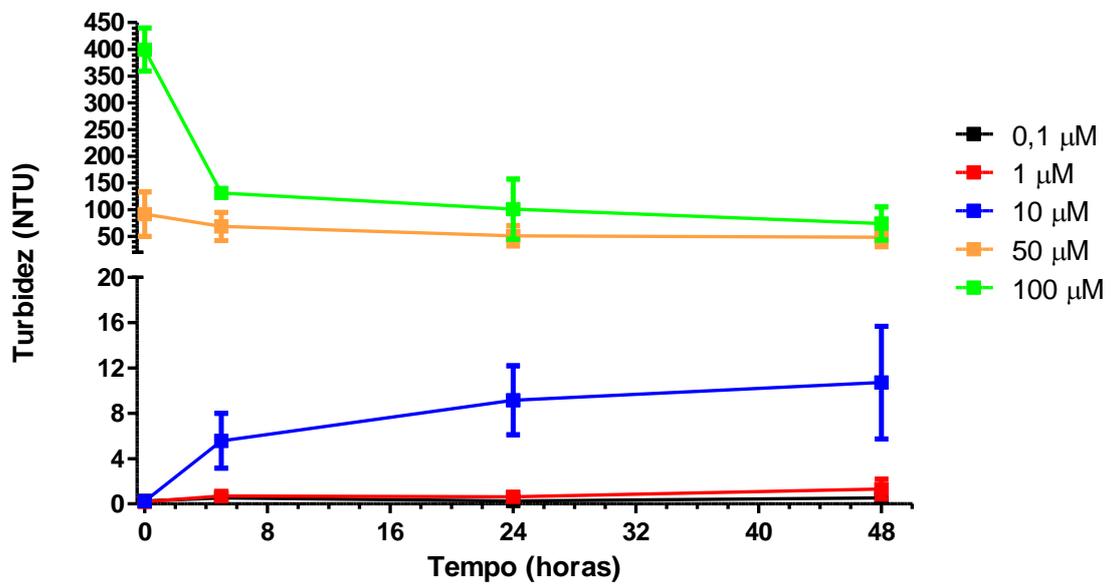
### Composto 7



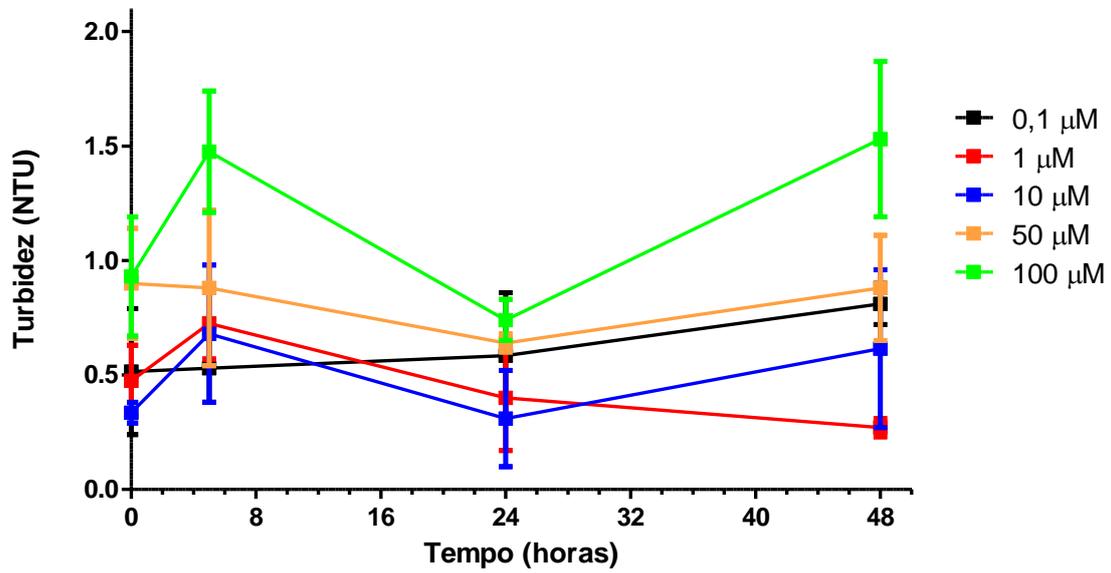
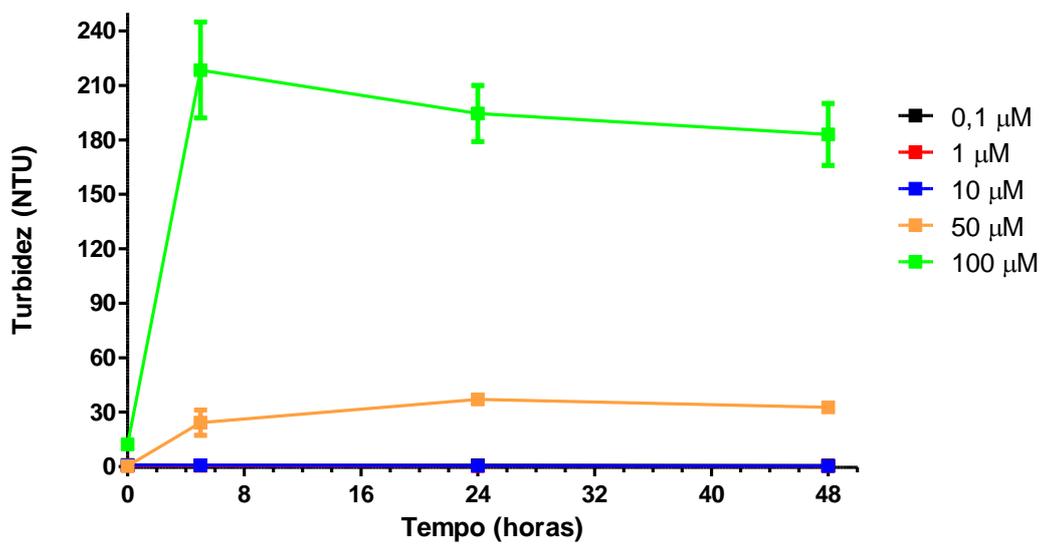
### Composto 8

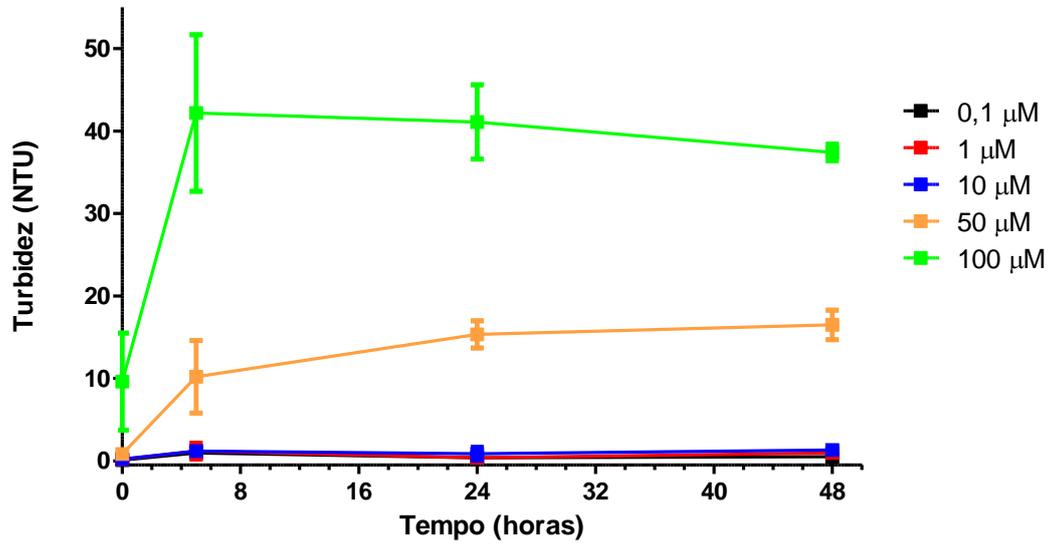
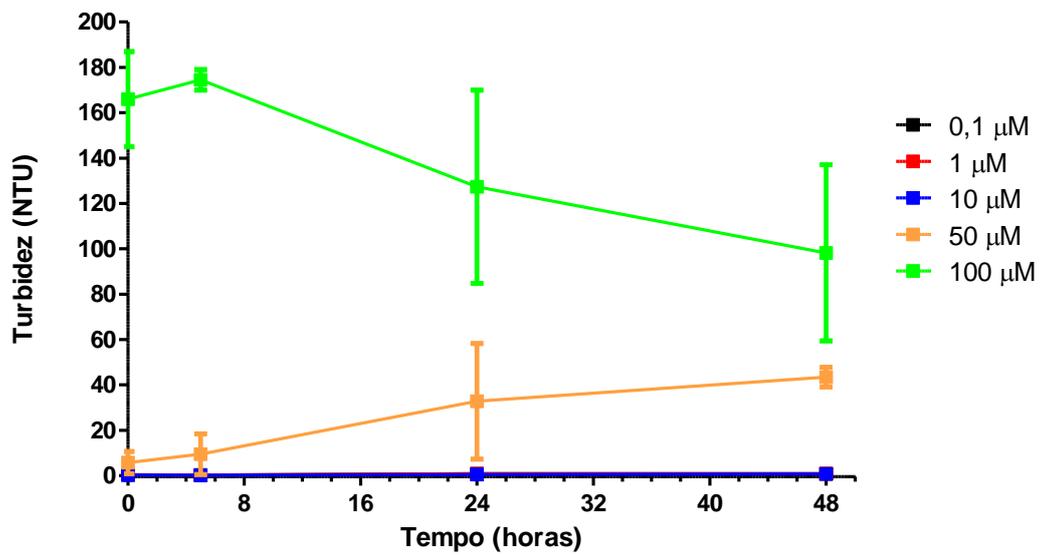


Composto 9

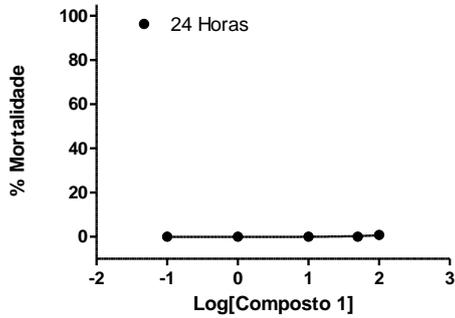


Composto 10

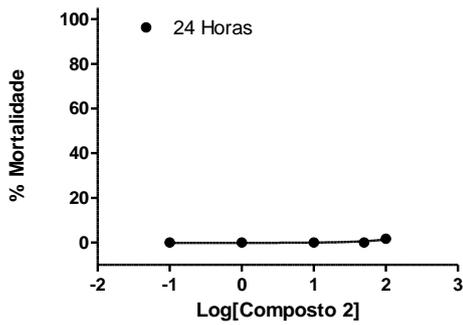
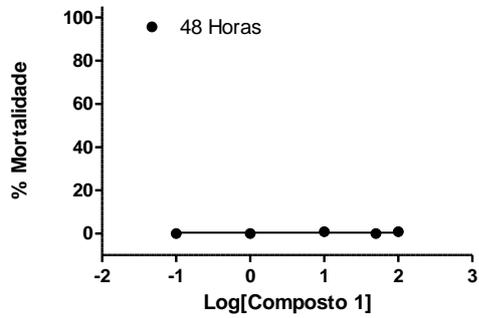
**Composto 11****Composto 12**

**Composto 13****Composto 14**

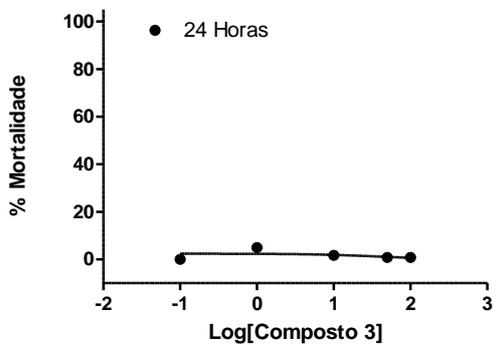
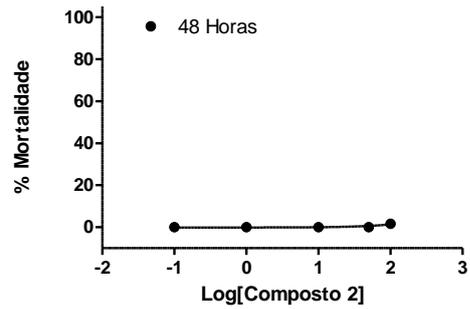
Curvas de porcentagem de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* no estágio L4 em função do aumento da concentração dos compostos 1 a 14.



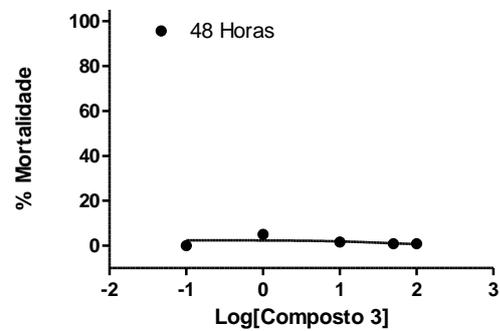
Composto 1



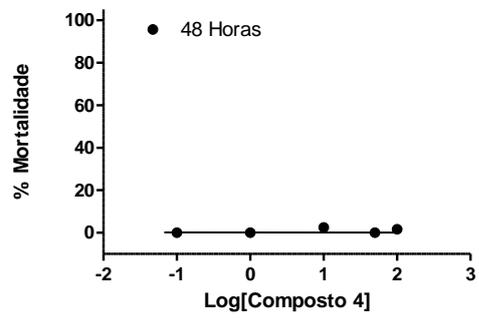
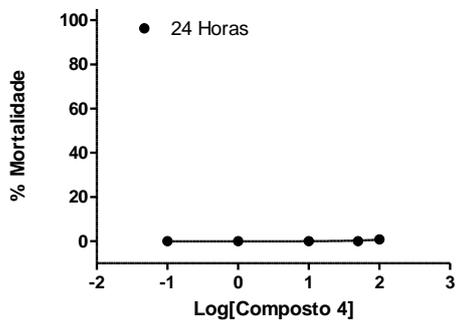
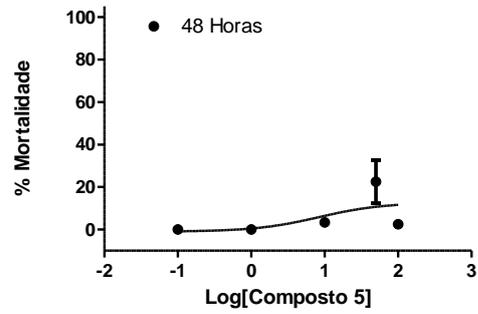
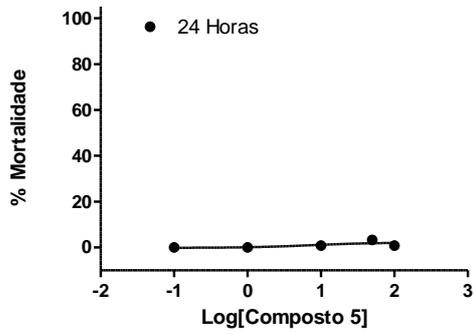
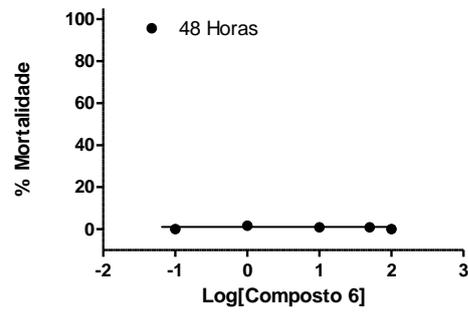
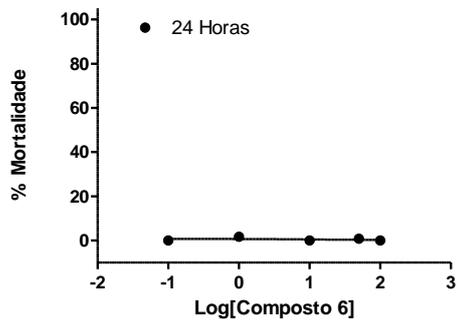
Composto 2

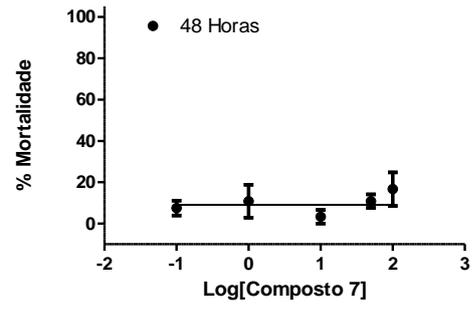
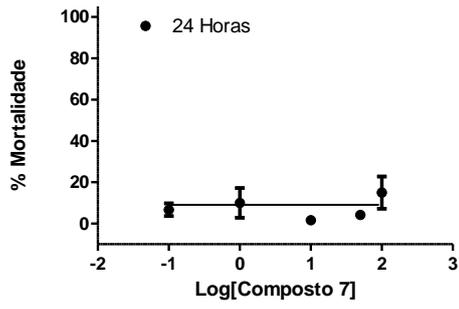
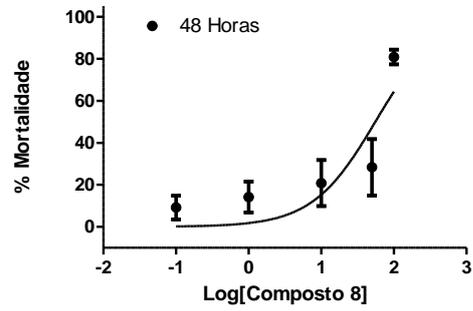
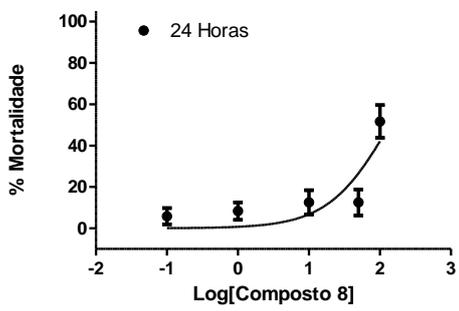
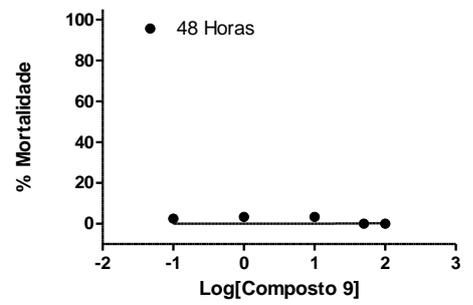
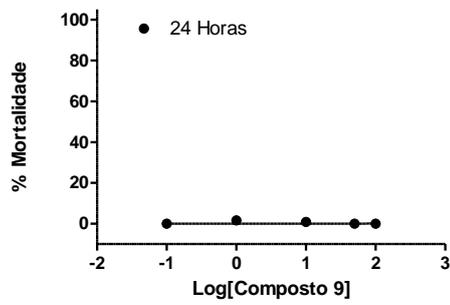


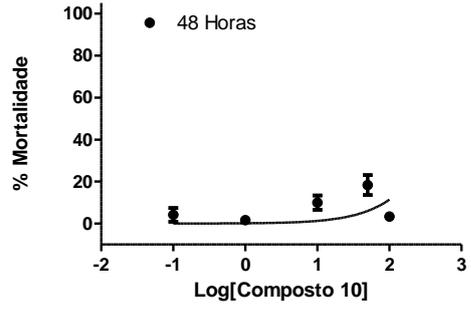
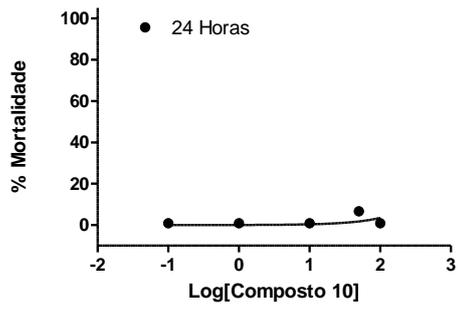
Composto 3



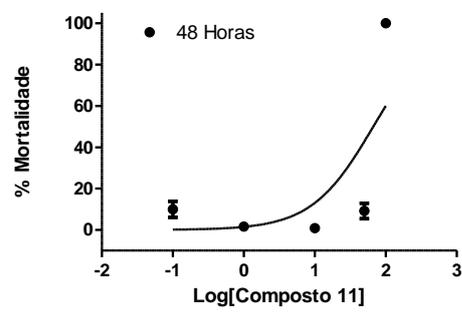
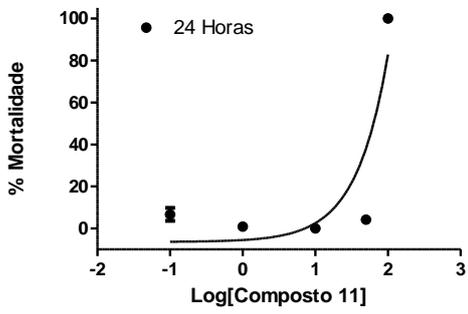
A 4

**Composto 4****Composto 5****Composto 6**

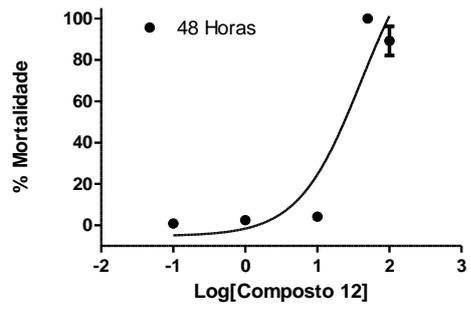
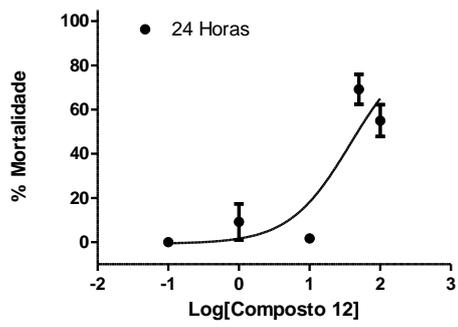
**Composto 7****Composto 8****Composto 9**



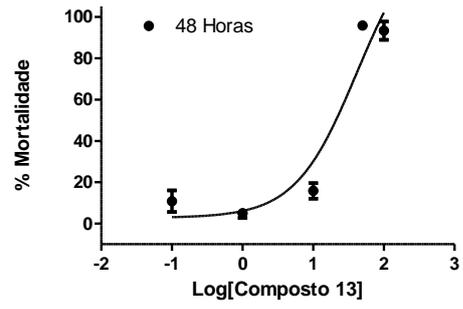
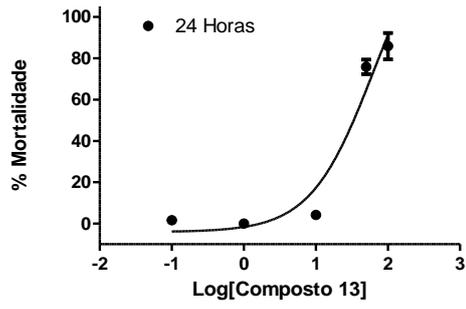
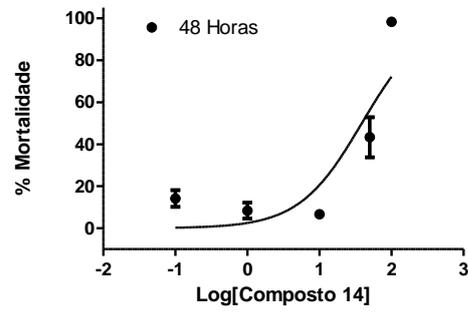
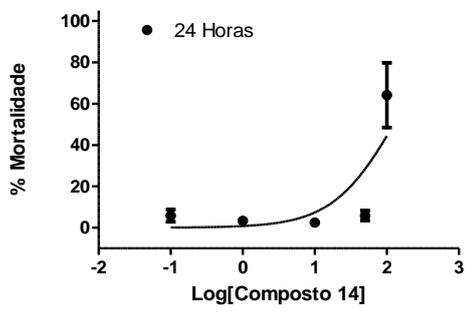
**Composto 10**



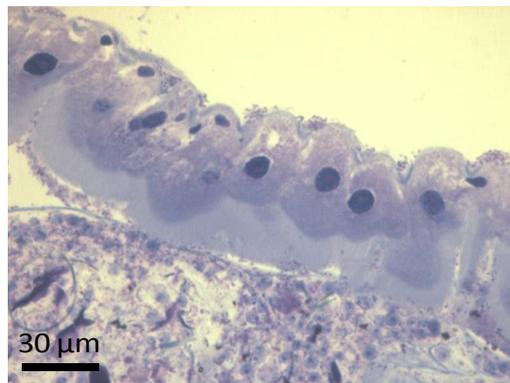
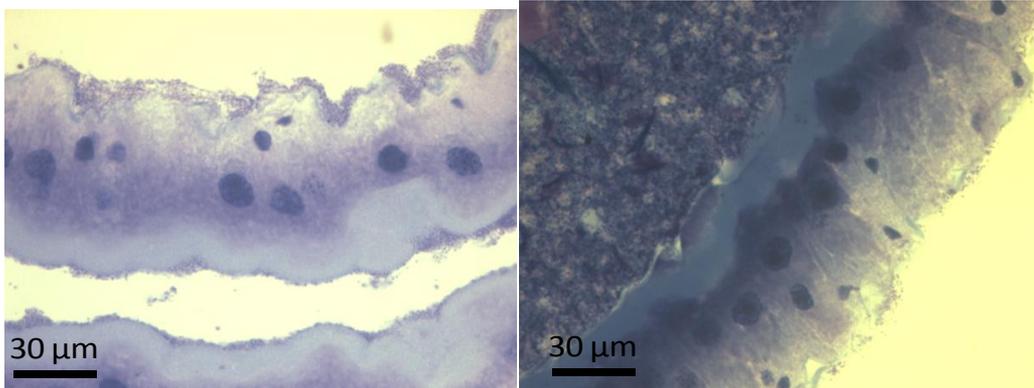
**Composto 11**



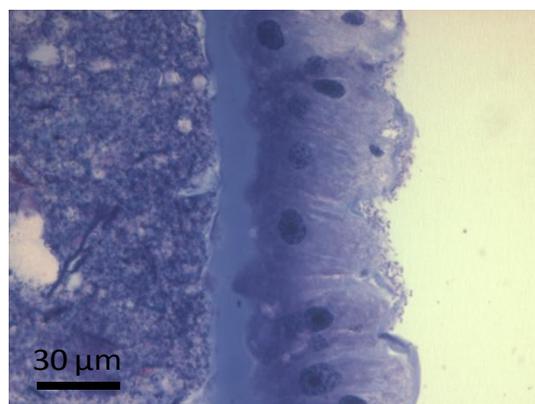
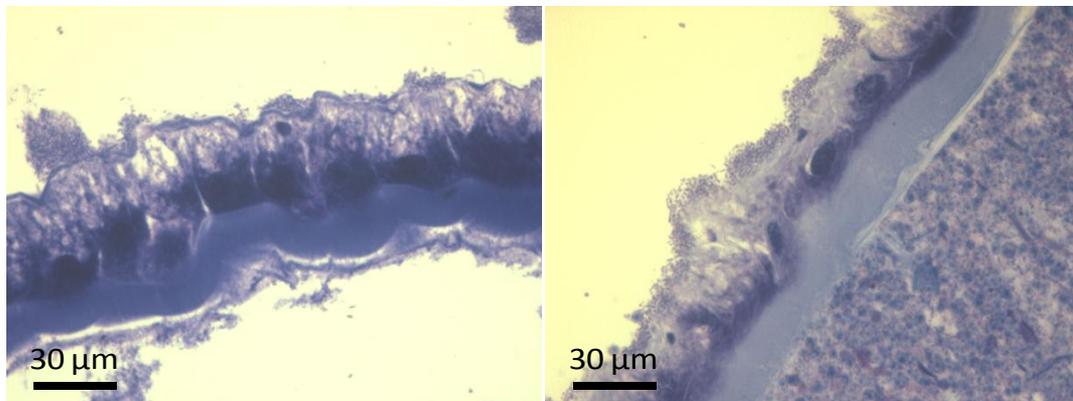
**Composto 12**

**Composto 13****Composto 14**

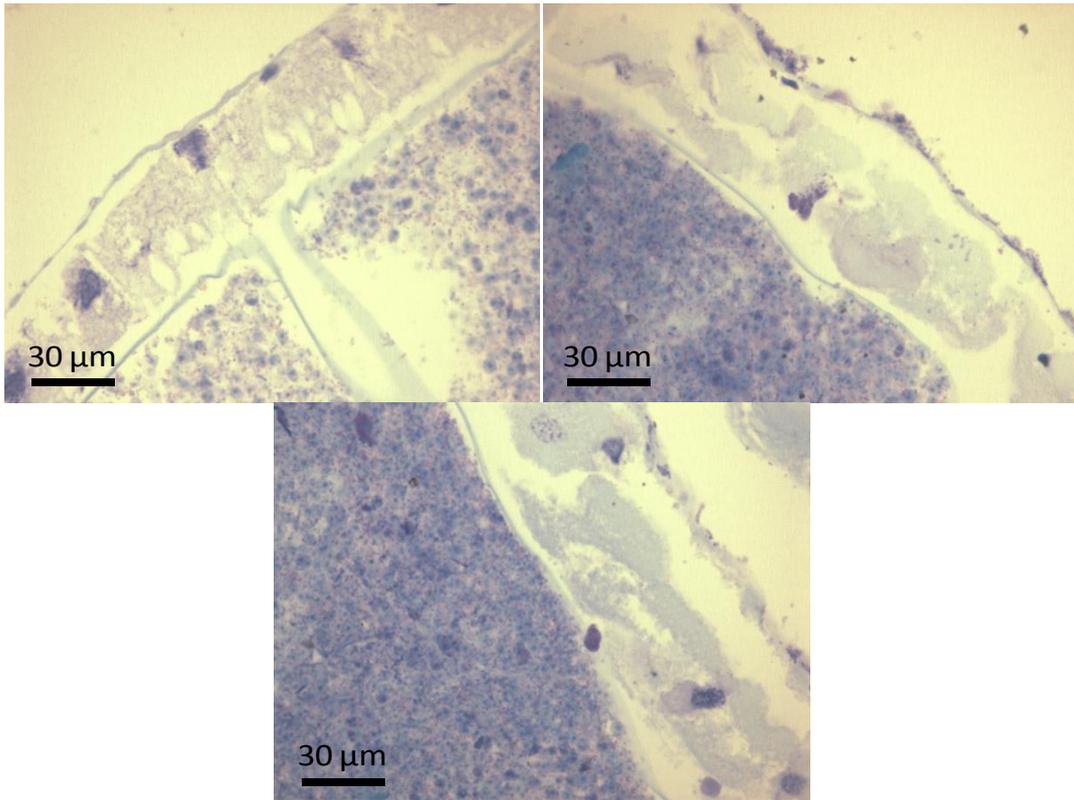
**Cortes histológicos do intestino médio de larvas no estágio L4 de *Aedes aegypti* dos grupos controle e tratados com as tiossemicarbazonas 8, 11 – 14.**



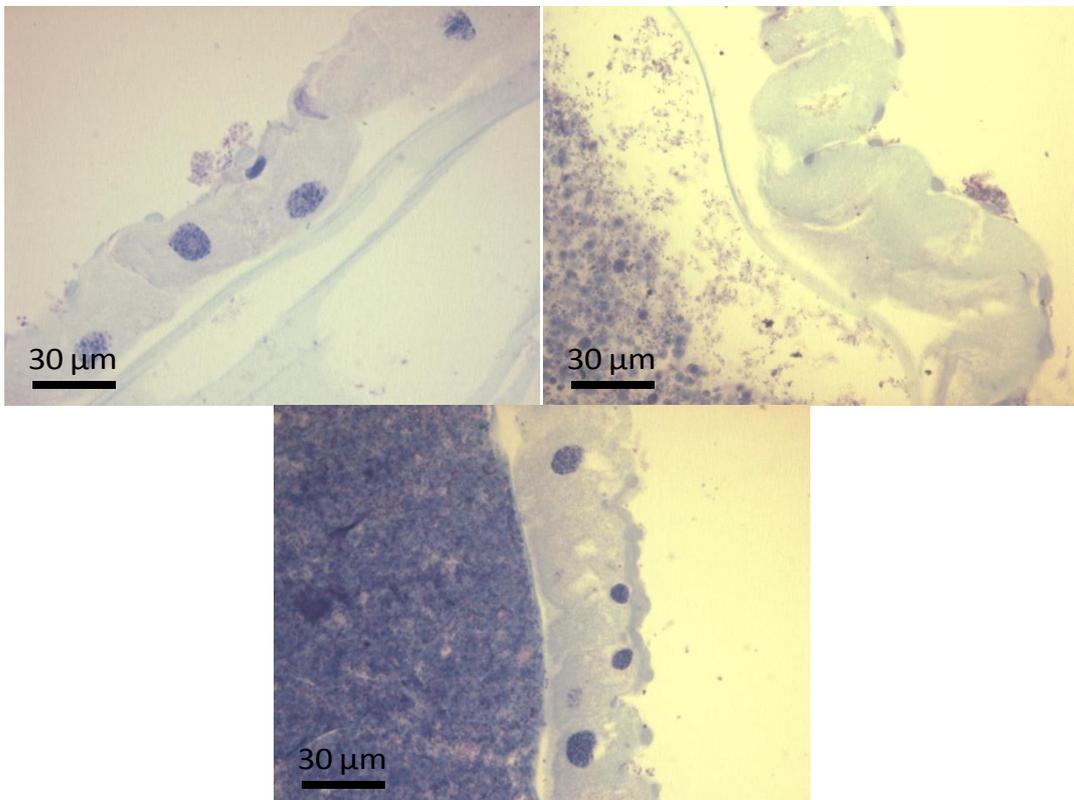
**Controle água**



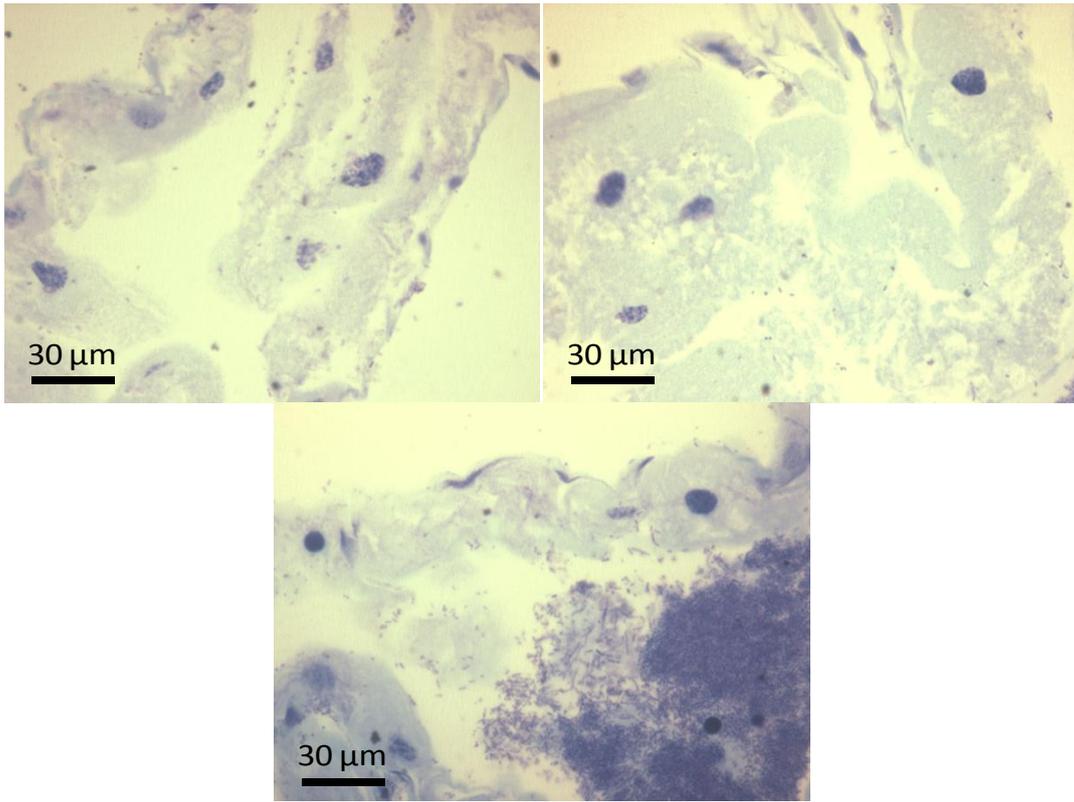
**Controle DMSO**



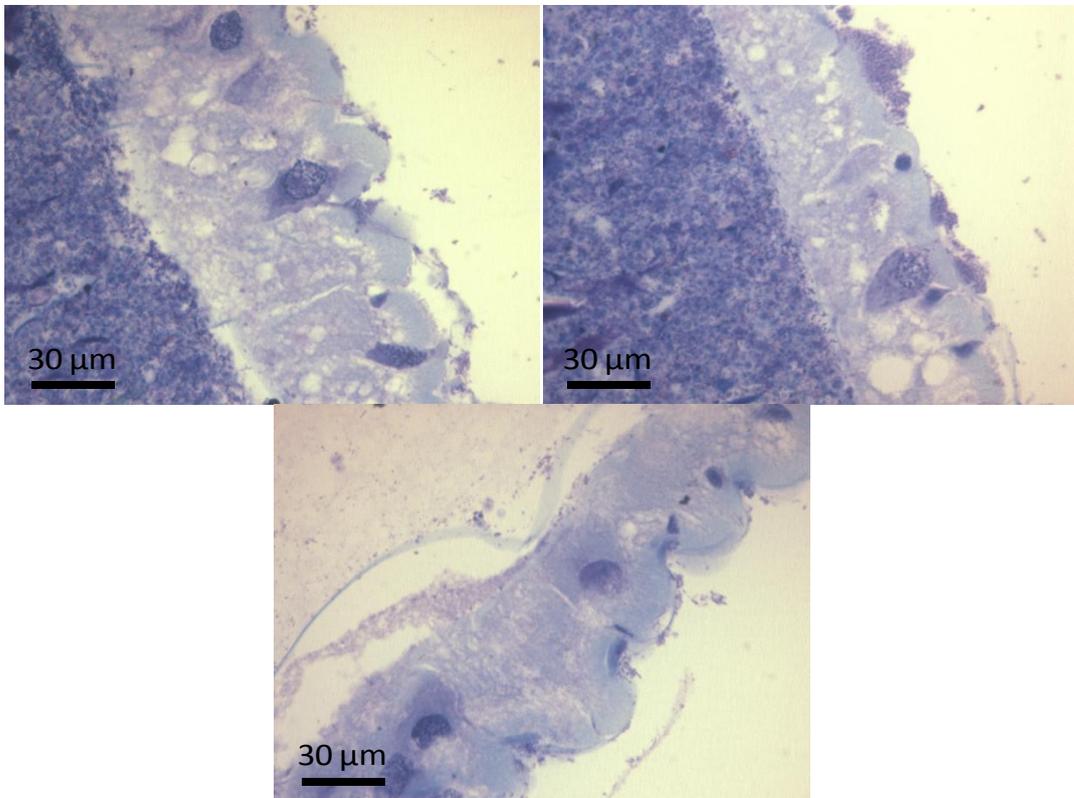
**Composto 8**



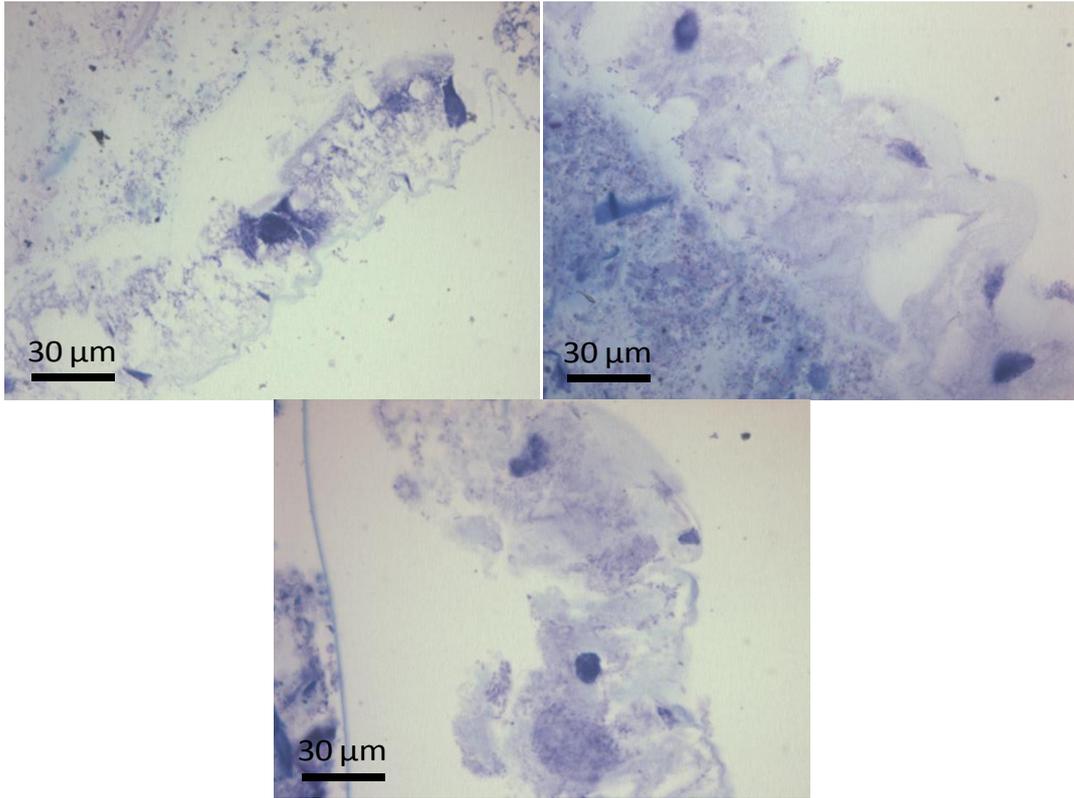
**Composto 11**



**Composto 12**

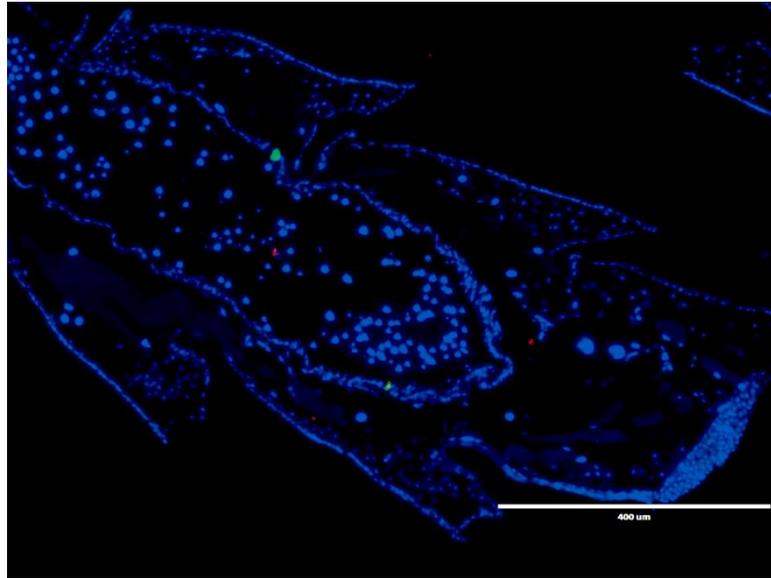


**Composto 13**

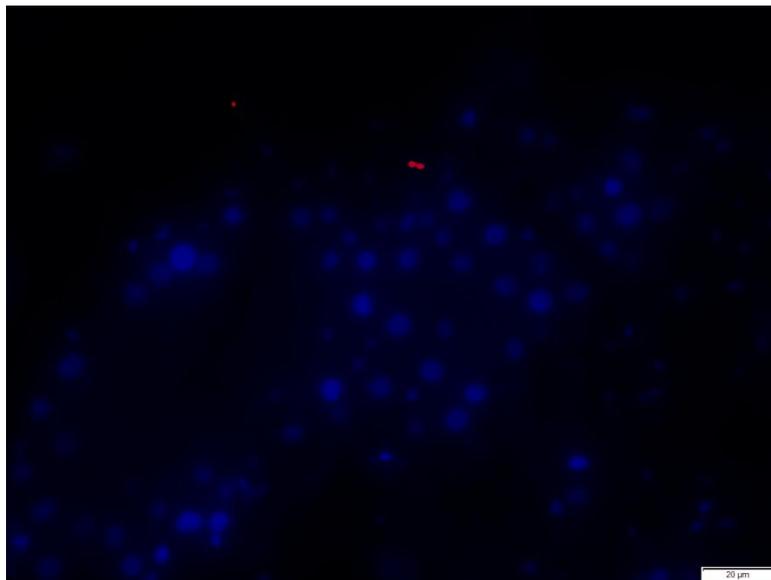


**Composto 14**

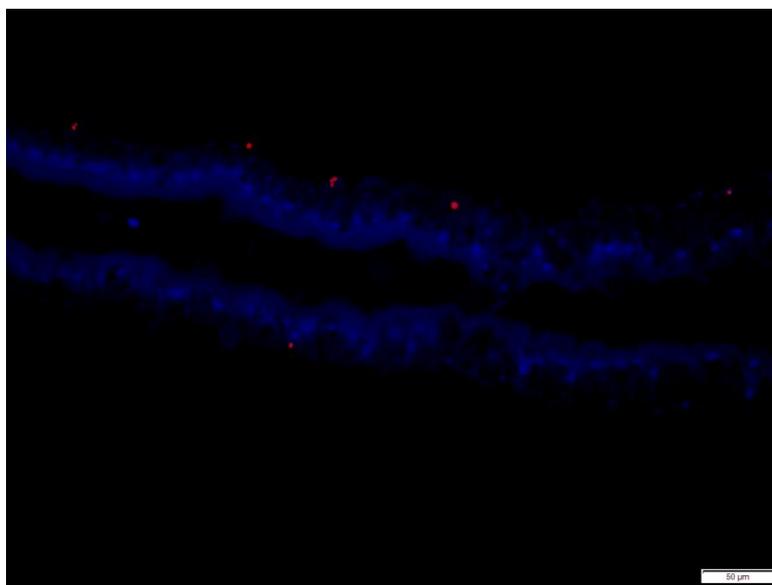
**Fotomicrografia dos ensaios de imunofluorescência para marcação dupla com os anticorpos anti-fosfohistona H3 (PH3) e anti-caspase 3 no intestino médio das larvas de *Aedes aegypti* para os grupos controle e tratados com as tiossemicarbazonas 8, 11 – 14.**



**Controle positivo – Pupa branca**



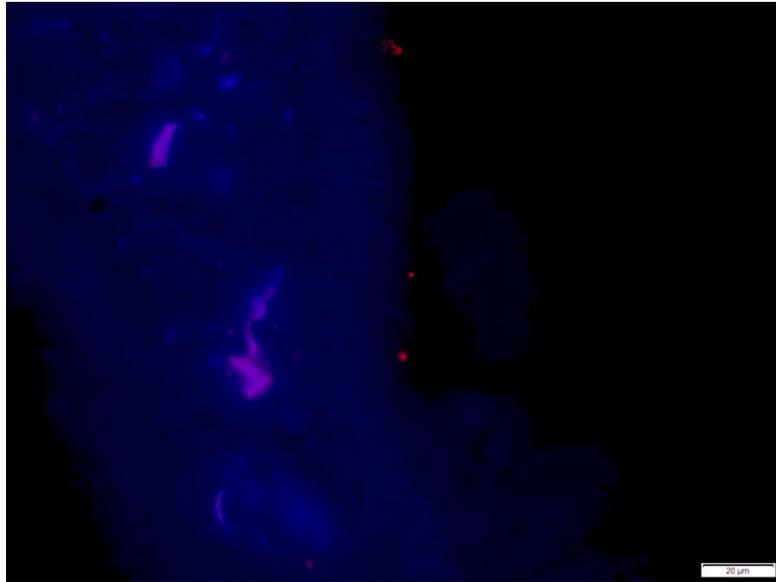
**Controle água**



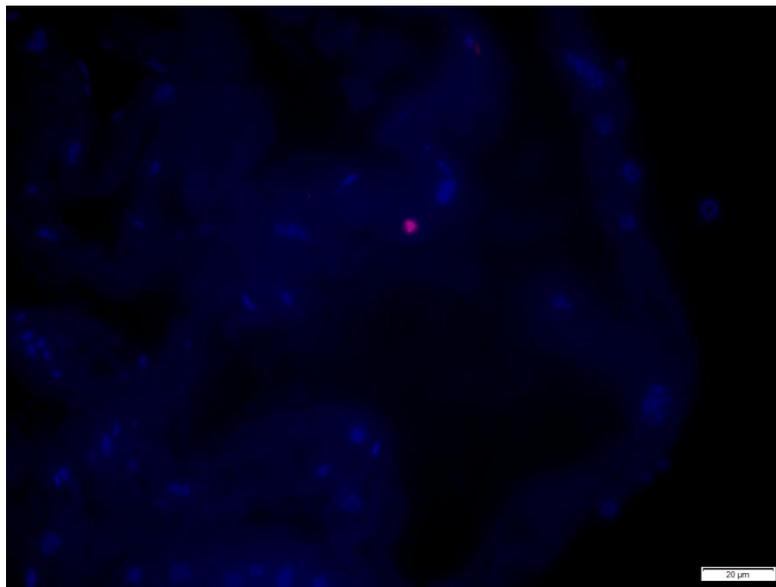
**Controle DMSO**



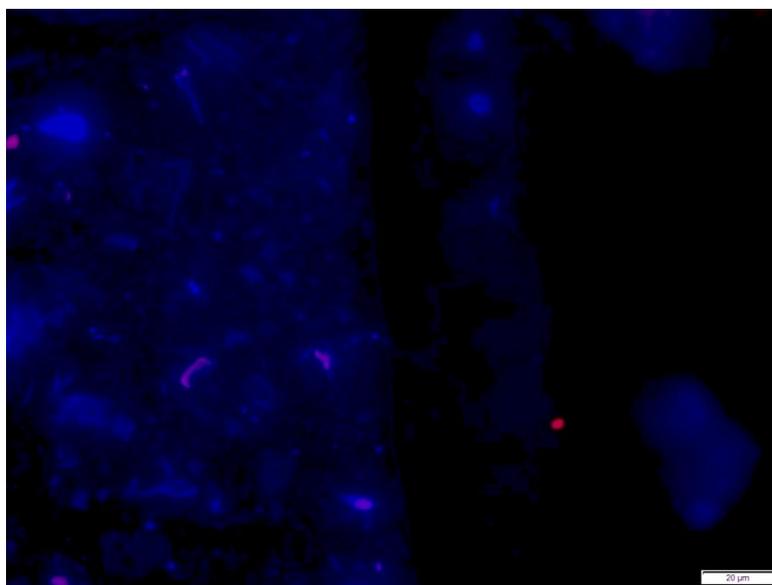
**Composto 8**



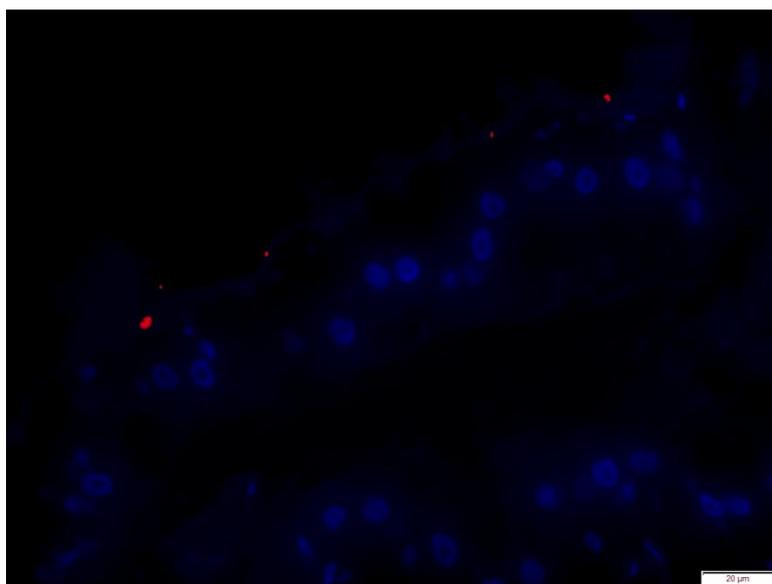
**Composto 11**



**Composto 12**



**Composto 13**



**Composto 14**