



Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós-graduação em Química

THIAGO AMÉRICO DINIZZ RODRIGUES

**Síntese e caracterização de complexos de L-Glut.-Cu(II) / L-Glut.-
Fe(III) e L-Asp.-Cu(II) / L-Asp.-(Fe(III) para controle de *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae)**

Dourados-MS
Março de 2013

Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para dissertação intitulada: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE L-GLUT.-CU(II) / L-GLUT.-FE(III) E L-ASP.-CU(II) / L-ASP.-FE(III) PARA CONTROLE DE *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE), de autoria de THIAGO AMÉRICO DINIZ RODRIGUES, apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Eduardo Jose de Arruda (Orientador-UFGD)

Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Jairo Campos Gaona

Membro Examinador (UFGD)

Prof. Dr. Adilson Beatriz

Membro Examinador (UFMS)

Dourados/MS, 27 de março de 2013

Thiago Américo Dinizz Rodrigues

Síntese e caracterização de complexos de L-Glut.-Cu(II) / L-Glut.-Fe(III)
e L-Asp.-Cu(II) / L-Asp.-(Fe(III)) para controle de *Aedes aegypti* (Diptera:
Culicidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Arruda

Co-orientador: Prof. Dr. Gleison Antonio Casagrande

Dourados – MS

2013

Dedico este trabalho a minha esposa Roberta, meus filhos Pedro e João (*in memoriam*) e aos meus pais Marino e Verônica

AGRADECIMENTOS

A DEUS por dar-me força nas horas de aflição, determinação na hora do desânimo e sobre tudo agradeço por minha vida e de meus entes queridos.

A minha esposa Roberta por me apoiar e incentivar e sobre tudo pelo seu companheirismo e afeto.

Ao filho Pedro que apesar de sua ingenuidade sobre a vida me dá forças para lutar, para que através de meus esforços possa vir a dar uma educação e qualidade de vida melhor além de maneira contribuir para um futuro próspero a sua geração.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e me educaram para uma vida digna e reta perante DEUS e os homens.

Ao meu orientador Professor Doutor Eduardo José de Arruda, pela sua paciência, entusiasmo pela ciência, sua sapiência e por me orientar em meu trabalho.

Aos professores doutores Claudio Teodoro de Carvalho, Gleison Antonio Casagrande, Magno Trindade e Carlos Fernando Salgueirosa Andrade (IB/UNICAMP), por ajudarem, orientarem e guiarem por sugestões e idéias para que meu trabalho pudesse ser concluído.

A Doutoranda Magda M. Freitas por ajudar e ensinar conhecimento de extrema relevância ao meu trabalho, e ser excelente amiga.

A Universidade Federal da Grande Dourados, por oferecer o Programa de Pós-graduação.

A FUNDECT pelo apoio financeiro e de incentivo a pesquisa.

A Rede Dengue e todos seus pesquisadores.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais espécies radicalares e oxidantes (EROs) de importância biológica.

Tabela 2: Soluções utilizadas para medidas espectrofotométricas com diferentes razões entre o ácido L-glutâmico (VETEC/SIGMA-ALDRICH 99%) e nitrato de cobre II tri-hidratado $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Dinâmica 99%), sendo que para cada pH houve a adição de hidróxido de sódio 0,3 mol/L, com o intuito de elevar o pH.

Tabela 3: Deslocamentos de banda da carboxila encontrados para os ácidos L-glutâmico, L-aspartico e os complexos L-Glutamato-Cu(II), L-Glutamato-Fe(III) e L-Aspartato-Cu(II), L-Aspartato-Fe(III), os deslocamentos foram comparados conforme descrito por Baran [50].

Tabela 4: Medidas espectrofotométricas de absorvância e λ de máxima absorvância em nanômetros para o $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0,05 mol/L e ácido L-glutâmico 0,05 mol/L.

Tabela 5: Medidas espectrofotométricas de absorvância e λ de máxima absorvância em nanômetros para soluções de L-Glutamato-Cu(II).

Tabela 6: Medidas espectrofotométricas de absorvância e λ de máxima absorvância em nanômetros para soluções de L-Glutamato-Cu(II).

Tabela 7: Medidas espectrofotométricas de absorvância e λ de máxima absorvância em nanômetros para soluções de L-Glutamato-Cu(II).

Tabela 8: Medidas espectrofotométricas de absorvância e λ de máxima absorvância em nanômetros para soluções de L-Glutamato-Cu(II).

Tabela 9: Medidas espectrofotométricas de absorvância e λ de máxima absorvância em nanômetros para soluções de L-Glutamato-Cu(II).

Tabela 10: Dados de refinamento obtidos por cristalografia

Tabela 11: Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros de deslocamento isotrópico equivalente ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para o L-Glutamato-Cu(II).

Tabela 12: Comprimentos de ligação entre os átomos (Å).

Tabela 13: Ângulos de torção para o L-Glutamato-Cu(II).

Tabela 14: Bandas de Hidrogênio.

Tabela 15: Análise elementar de C, H e N para o composto L-Glutamato-Cu(II), os resultados estão em porcentagem e a massa utilizada foi 2,903mg.

Tabela 16: Análise elementar de C, H e N para o composto L-Glutamato-Cu(II), os resultados estão em porcentagem e a massa utilizada foi 1,714mg.

Tabela 17: Análise elementar de C, H e N para o composto L-Aspartato-Cu(II), os resultados estão em porcentagem e a massa utilizada foi 1,235mg.

Tabela 18: Análise elementar de C, H e N para o composto L-Aspartato-Cu(II), os resultados estão em porcentagem e a massa utilizada foi 1,829mg.

Tabela 19: Análise elementar de C, H e N para o composto L-Glutamato-Fe(III), os resultados estão em porcentagem e a massa utilizada foi 1,925mg.

Tabela 20: Análise elementar de C, H e N para o composto L-Glutamato-Fe(III), os resultados estão em porcentagem e a massa utilizada foi 1,536mg.

Tabela 21: Análise elementar de C, H e N para o composto L-Aspartato-Fe(III), os resultados estão em porcentagem e a massa utilizada foi 2,192mg.

Tabela 22: Análise elementar de C, H e N para o composto L-Aspartato-Fe(III), os resultados estão em porcentagem e a massa utilizada foi 2,247mg.

Tabela 23: Susceptibilidade de larvas de terceiro (3º) estágio de *Aedes aegypti* (linhagem Rockefeller) aos complexos de L-Glutamato-Cu(II), L-Glutamato-Fe(III) e L-Aspartato-Cu(II), L-Aspartato-Fe(III), concentrações estão em ppm (mg/L).

Tabela 24: Concentração Inibitória Mínima (CIM) para *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 Gram-positiva, *Escherichia coli* ATCC-25922 Gram-negativa. As concentrações em ppm (mg/L).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Distribuição do *Aedes aegypti* e dengue no mundo (Fonte: WHO, 2006).
- Figura 2: Modelo de uma partícula do vírus da dengue (fonte: Ministério da Saúde, 2010)
- Figura 3: Imagem *Aedes aegypti* adulto (inseto alado) realizando hematofagia em humano (Fonte: Ministério da Saúde, 2006).
- Figura 4: Estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti* (Fonte: Ministério da Saúde, 2006)
- Figura 5: Células do sistema digestório de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*. A) células normais com microvilosidades, e B) células destruídas. Ampliação 500x (Fonte: Gaban *et al.*, 2012)
- Figura 6: Modelo geral de formação de radicais livres induzidas por grupo heme e ferro (Fonte: Graça-Souza A.V., 2006)
- Figura 7: Larvas de *Aedes aegypti* utilizadas para os bioensaios de toxicidade
- Figura 8: Teste de susceptibilidade de larvas *Aedes aegypti* com L-Glutamato-Cu(II).
- Figura 9: Teste de susceptibilidade de larvas *Aedes aegypti* com L-Glutamato-Fe(III)
- Figura 10: Cristais de L-Glutamato-Cu(II) feitas com objetiva de 4X. Foto: Thiago A.D. Rodrigues, 2013
- Figura 11: Espectros de Infravermelho; 1) ácido L-aspartico, 2) L-Aspartato-Fe(III), 3) L-Aspartato-Cu(II).
- Figura 12: Espectros de infravermelho; 1) ácido L-glutâmico, 2) L-Glutamato-Fe(III), 3) L-Glutamato-Cu(II).
- Figura 13: Gráfico da titulação potenciométrica do ácido L-aspartico 0,05 mol/L (1), complexo L-Aspartato-Cu(II) 0,05 mol/L (2).
- Figura 14: Ácido L-aspartico e suas desprotonações em meio aquoso.
- Figura 15: Formas estruturais para o L-Aspartato-Cu(II).
- Figura 16: Gráfico da titulação potenciométrica do ácido L-glutâmico 0,05 mol/L (1), complexo L-Glutamato-Cu(II) 0,05 mol/L (2).
- Figura 17: Ácido L-glutâmico e suas desprotonações em meio aquoso.
- Figura 18: Formas estruturais para o L-Glutamato-Cu(II) em diferentes pH's.
- Figura 19: Espectro de soluções de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0,05 mol/L e ácido L-glutâmico 0,05 mol/L, gráfico obtido através do programa Microcal Origin 6.0.
- Figura 20: Espectro de soluções em pH6, gráfico obtido através do programa Microcal Origin 6.0.
- Figura 21: Espectro de soluções em pH7, gráfico obtido através do programa Microcal Origin 6.0.
- Figura 22: Espectro de soluções em pH8, gráfico obtido através do programa Microcal Origin 6.0.

Figura 23: Espectro de soluções em pH9, gráfico obtido através do programa Microcal Origin 6.0.

Figura 24: Espectro de soluções em pH10, gráfico obtido através do programa Microcal Origin 6.0.

Figura 25: Termo análise do L-Glutamato-Cu(II).

Figura 26: Representação Ortep do complexo com elipsóides de deslocamento atômico representando 30% de probabilidade.

Figura 27: Possível estrutura para o complexo L-Glutamato-Cu(II).

Figura 28: Arranjo molecular sugerido para o L-Aspartato-Cu(II)

Figura 29: Complexo L-Glutamato-Cu(II) em pH10, carga elétrica neutra

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
Abs.	Absorbância
DENV	Vírus da dengue
WHO	World Health Organization
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
SD	Sistema digestório
MP	Matriz peritrófica
IV	Infravermelho
UV/Vis	Ultra Violeta/Visível
CL	Concentração letal
CLs	Concentrações letais
CIM	Concentração Inibitória Mínima
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERS	Espécie reativa de enxofre
ERCI	Espécie reativa de cloro
ERC	Espécie reativa de carbon
ERM ⁿ⁺²	Espécie reativa de metais de transição
AA	Aminoácido
SCN	Sistema Nervoso Central
NMDA	ácido (2R)-2-(metilamino) butanóico
LIV	Laboratório de Insetos Vetores
FCBA	Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
CL10	Concentração letal para 10% de mortes
CL50	Concentração letal para 50% de mortes
CL90	Concentração letal para 90% de mortes
UFC	Unidade Formadora de Colônia
Máxima Abs.	Máxima Absorbância

LISTA DE SIMBOLOS

λ	Comprimento de onda em nanômetros
μ	Micro
Nm	Nanômetro
pH	- log da concentração de íons H ⁺
μL	10 ⁻⁶ litros
V_{as}	Estiramento assimétrico
V_s	Estiramento simétrico
COO ⁻	Íon carboxilato
pK _a	- log constante ácida
pK _{a's}	- log constantes ácidas
pK _r	- log constante ácida radicalar
pK ₁	- log constante Ácida de Primeira Ordem
pK ₂	- log constante Ácida de Segunda ordem
Cu(II)	Cobre +2
Cu(I)	Cobre +1
Fe(III)	Ferro +3
Fe(II)	Ferro +2
ppm	Partes por milhão (miligrama por litro)
OH [*]	Radical Hidroxila
R [*]	Radical Alquila
KBr	Brometo de Potássio
Cu(NO ₃) ₂ .3H ₂ O	Nitrato de Cobre(II) tri-hidratado
Cu(NO ₃) ₂ .	Nitrato de Cobre(II)

RESUMO

A dengue é doença viral transmitida pela picada de fêmeas de *Aedes aegypti*. Os vírus DENV 1 a 4 tem como vetores os culicídeos e o mosquito *Aedes aegypti* é vetor da doença no Brasil. A dengue é o mais grave problema de saúde pública mundial. O controle do inseto é realizado por utilização de inseticidas sintéticos e/ou biológicos. Entretanto, esta forma de controle pressiona a população dos insetos e induzem resistência, tornando os produtos ineficazes para o controle do inseto. Os metalo-inseticidas possuem sua bioatividade nos íons Cu(II) e Fe(III), estes podem ser veiculados na forma de complexos para controle das formas imaturas (ovos e larvas) do *A. aegypti*. Apesar de serem essenciais para os organismos, os íons metálicos possuem estreito intervalo de toxicidade "in vivo". A indução de reação redox "in situ" (estresse oxidativo) utilizando o metabolismo do inseto e mediada por íons e/ou complexos metálicos induz a formação de radicais livres e espécies oxidantes (EROs) para exercício da toxicidade/inviabilização das formas imaturas do *A. aegypti*. Os compostos de coordenação de Cu(II) e Fe(III) com ácido L-Glutâmico e ácido L-Aspártico foram sintetizados, isolados, caracterizados e sua atividade biológica (atividade larvicida e bactericida) avaliadas. Os resultados mostraram que o L-Glutamato-Cu(II), L-Glutamato-Fe(III), L-Aspartato-Cu(II) e L-Asparto-Fe(III) possuem atividade biológica diferenciada para larvas (forma imatura) do *A. aegypti*, com as seguintes CL's respectivamente, CL10 (6,75 ppm, 392,00 ppm, 31,42 ppm, 1.199,61 ppm), CL50 (53,40 ppm, 1.247,42 ppm, 100,25 ppm, 3.415,48ppm) e CL90 (423,50 ppm, 3.780,06 ppm, 319,82 ppm, 9.724,42 ppm). Os estudos mostraram a atividade bactericida do L-Glutamato-Cu(II), L-Glutamato-Fe(III), L-Aspartato-Cu(II) e L-Asparto-Fe(III) para bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*) com o MIC respectivamente (2000 ppm, não inibe, 2000 ppm, não inibe) Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) com os MIC's respectivamente (500 ppm, não inibe, 1000 ppm, não inibe) . Os complexos metálicos (metalo-inseticidas) podem ser utilizados para o manejo do *A. aegypti* sobre tudo os complexos de Cu(II) visto que estes podem afetar as formas imaturas dos insetos e microrganismos presentes nos criadouros, que participam da cadeia alimentar do inseto.

Palavras chaves: radicais livres, metalo-inseticidas, Cu, Fe, microrganismos, manejo.

ABSTRACT

Dengue is a viral disease transmitted by the bite of female *Aedes aegypti*. DENV 1-4 have mosquitoes as vectors and the *Aedes aegypti* mosquito is a vector of the disease in Brazil. Dengue is the most serious public health problem worldwide. The insect control is accomplished by use of synthetic insecticides and / or biological. However, this form of control pushes the population of insects and induce resistance, making them ineffective products for insect control. The metallo-insecticides possess its bioactivity in the Cu (II) and Fe (III), these can be conveyed in the form of complexes for control of immature (eggs and larvae) *A. aegypti*. Although they are essential for the organisms, the metal ions have narrow range of toxicity "in vivo". The induction of redox reaction "in situ" (oxidative stress) using the insect and metabolism mediated by ions and / or metal complexes induces the formation of free radicals and oxidant species (ROS) to exercise toxicity / non-viability of the immature forms of *A. aegypti*. The compounds of coordination of Cu (II) and Fe (III) L-Glutamic acid and L-aspartic acid were synthesized, isolated, characterized, and their biological activity (larvicidal activity and bactericidal) evaluated. The results showed that L-Glutamate-Cu (II), L-Glutamate-Fe (III), L-Aspartate-Cu (II) and L-Asparto-Fe (III) have different biological activity to larvae (immature) *A. aegypti* with the following CL's respectively CL10 (6.75 ppm, 392.00 ppm, 31.42 ppm 1199.61 ppm) LC50 (53.40 ppm 1247.42 ppm, 100.25 ppm, 3415, 48ppm) and LC90 (ppm 423.50, 3780.06 ppm 319.82 ppm 9724.42 ppm). Studies have shown bactericidal activity of L-glutamate-Cu (II), L-Glutamate-Fe (III), L-Aspartate-Cu (II) and L-Asparto-Fe (III) to Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*) respectively with the MIC (2000 ppm does not inhibit 2000 ppm does not inhibit) Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) respectively with the MIC's (500 ppm does not inhibit, 1000 ppm does not inhibit). Metal complexes (metallo-insecticide) can be used for the management of *A. aegypti* on all the complexes of Cu (II) as these can affect the immature forms of insects and microorganisms present in the breeding, participating in the food chain of the insect.

Keywords: free radicals, metal-insecticides, Cu, Fe, microorganisms, management.

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	04
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	04
3. REVISÃO DA LITERATURA	05
3.1. Dengue.....	05
3.1.1 Vírus.....	05
3.1.2 Insetos vetores.....	05
3.1.3 <i>Aedes aegypti</i>	06
3.1.3.1 Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	07
3.2 Estresse Oxidativo.....	08
3.2.1 Estresse Oxidativo.....	08
3.2.2 <i>Espécies radicais e oxidantes - EROS</i>	08
3.3 Cobre.....	09
3.3.1 Cobre.....	09
3.3.2 Toxicidade do Cobre.....	10
3.3.3 Dano oxidativo causado pelo cobre.....	10
3.4 Ferro.....	10
3.4.1 Ferro.....	10
3.4.2 Importância do Ferro.....	10
3.4.3 Dano oxidativo causado pelo Ferro no <i>Aedes aegypti</i>	11
3.5 Aminoácidos.....	12
3.5.1 A Importância dos aminoácidos, AA.....	12
3.5.2 Ácido Glutâmico.....	12
3.5.3 Ácido Aspártico.....	13
4. MATERIA e MÉTODOS	14
4.1 Síntese dos complexos de L-Glutamato-Cu(II) e L-Aspartato-Cu(II)	14
4.2 Síntese dos complexos de L-Glutamato-Fe(III) e L-Aspartato-Fe(III)	14
4.3 Ovos de <i>Aedes aegypti</i> linhagem Rockefeller.....	14
4.4 Teste de susceptibilidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> linhagem Rockefeller.....	15
4.4.1 Teste de susceptibilidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> linhagem Rockefeller para o complexo L-Glutamato-Cu(II)	15

4.4.2 Teste de susceptibilidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> linhagem Rockfeller para o L-Glutamato-Fe(III)	16
4.4.3 Teste de susceptibilidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> linhagem Rockfeller para o complexo L-Aspartato-Cu(II)	17
4.4.4 Teste de susceptibilidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> linhagem Rockfeller para o complexo L-Aspartato-Fe(III)	17
4.5 Concentração inibitória mínima (CIM) para as bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC-25923 Gram-positiva, <i>Escherichia coli</i> ATCC-25922 Gram-negativa.....	18
4.6 Cristais.....	18
4.7 Análise de espectro infravermelho.....	18
4.8 Titulação potenciométrica.....	18
4.9 Medidas espectrofotométricas.....	19
4.10 Análise Termogravimétrica.....	19
4.11 Análise Elementar C, H, N.....	19
4.12 Difração de Raios-X.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1 Caracterização dos complexos.....	20
5.1.1 Fotos dos cristais.....	20
5.1.2 Espectros infravermelho para os complexos e seus respectivos ligantes.....	21
5.1.3 Titulação potenciométrica.....	22
5.1.4 Medidas Espectrofotométricas.....	25
5.1.5 Análise Termogravimétrica.....	32
5.1.6 Difração de Raio-X.....	32
5.1.7 Análise Elementar C, H, N.....	37
5.1.7.1 Complexo L-Glutamato-Cu(II)	37
5.1.7.2 Complexo L-Aspartato-Cu(II)	39
5.1.7.3 Complexo L-Glutamato-Fe(III)	40
5.1.7.4 Complexo L-Aspartato-Fe(III)	41
5.2 Susceptibilidade de larvas de terceiro (3º) estágio de <i>Aedes aegypti</i> (linhagem Rockfeller; linhagem susceptível/não resistente)	42
5.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) para bactérias Gram-positiva e Gram-negativa.....	44
6. CONCLUSÃO	46
7. REFERÊNCIAS	47
8. ANEXOS	46

1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença infecciosa viral transmitida pela picada das fêmeas de *Aedes aegypti* durante a hematofagia para viabilização dos ovos e continuidade do processo reprodutivo. O vírus é um arbovírus, isto significa que ele é transmitido apenas por artrópodes, gênero *Flavivirus*, sendo atualmente conhecidos quatro sorotipos, antigenicamente distintos: DENV 1 a 4.

Os vírus DENV 1 a 4 possuem como principal inseto vetor os culicídeos, mosquitos pertencentes a família Culicidae[1]. Dentre eles, o mosquito da dengue (*Aedes aegypti*) que é o principal vetor de transmissão da dengue no Brasil. O inseto está disseminado por todas as regiões tropicais. O *Aedes aegypti* foi primeiramente descrito no Egito. Ele tem uma ampla distribuição que vai da latitude 45° norte até 35° sul. A disseminação, plasticidade, adaptação e persistência da espécie no ambiente constituem um sério problema de saúde pública, e tem estimulado pesquisas para as novas propostas, estratégias e inseticidas para o seu controle populacional [2]. O mosquito é encontrado, geralmente, em altitudes inferiores a 1.000 metros de altitude, contudo sua presença já foi relatada em altitudes até 1800 metros [3].

O *Aedes aegypti* adaptou-se de maneira peculiar ao ambiente urbano. No Brasil, não estando restrito somente às áreas rurais, vilas e cidades, mas, presentes nos domicílios e peridomicílios. Entretanto, tem sido raramente encontrado em ambientes semi-silvestres visto que não há uma densidade demográfica relativamente alta para seu estabelecimento. Pode-se dizer que o mosquito antropofilizou, estando presente e convivendo com o homem nos espaços públicos e domicílios. O mosquito no processo de reprodução, principalmente, durante a oviposição e fase larval utiliza recipientes artificiais, como: pneus, latas, vidros, cacos de garrafa, pratos de xaxins, entre outros, inclusive, pouco frequentes, desde que os recipientes possam conter água limpa, pobre em matéria orgânica em decomposição e/ou sais, além de locais sombreados com fundos sombreados ou escuros.

O inseto vetor está presente em uma ampla faixa do globo nas áreas tropicais e subtropicais. A dengue tornou-se um grave problema de saúde pública mundial, estima-se que até 3,5 bilhões de pessoas estejam em constante risco de contrair a infecção [4], e que de 80 a 100 milhões de pessoas são infectadas por ano, com até 25 mil óbitos anuais decorrentes da infecção e/ou complicações decorrentes da doença [5]. No Brasil há registros de aproximadamente 204 mil casos de dengue registrados nos três primeiros meses de 2013 [6], no estado de Mato Grosso do Sul foram notificados cerca de 87 mil casos [7].

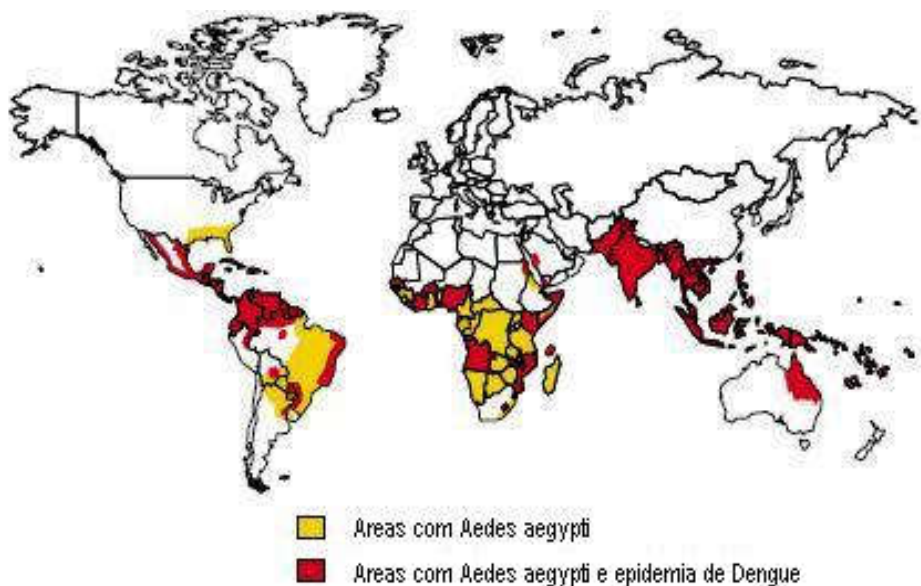


Figura 1: Distribuição do *Aedes aegypti* e dengue no mundo (Fonte: WHO, 2006)

O controle do inseto adulto e no estágio de larvas é, normalmente, realizado com inseticidas sintéticos (organofosforados, piretróides, carbamatos, neonicotinóides e outros disponíveis). A maior parte dos inseticidas tem como alvo o sistema nervoso central e/ou periférico e/ou inibição enzimática alterando o metabolismo do inseto[8],[9],[10]. Os inseticidas biológicos, baseados em toxinas de microorganismos (bactérias e fungos) que possuem atividade, principalmente, para o sistema digestório (SD), além do sistema nervoso do inseto; adulticidas e outros ativos são utilizados para o controle do inseto, principalmente, na forma imatura e/ou atraso no processo de reprodução do inseto e/ou biossíntese de quitina [8],[11],[12]. Há também proposta de novas estratégias para controle populacional do inseto, a partir da esterização de machos para o a inviabilização do processo reprodutivo e controle da densidade populacional do inseto em determinada área e minimização da incidência da doença [13].

Os trabalhos mais recentes sugerem o uso de íons metálicos de transição, Cu(II) e Fe(III) veiculados na forma de complexos para controle de formas imaturas (ovos e larvas) de *A. aegypti* [2],[14]. O Cu(II) e Fe(III) são íons de transição e também micronutrientes para os organismos vivos, entretanto, apesar de serem essenciais ao metabolismo, possuem estreito intervalo de toxicidade “*in vivo*”. O mecanismo de toxicidade é baseado na utilização de reação redox (estresse oxidativo) mediada por íons metálicos para formação de radicais livres e espécies oxidantes (EROs) para o controle de formas imaturas do *A. aegypti* e até de outros insetos de ciclo reprodutivo similares. A toxicidade dos complexos metálicos de Cu(II) e Fe(III) esta relacionada à indução de estresse oxidativo (reação Haber-Weiss (Cu(II) ou Fenton e/ou Foto-Fenton (Fe(II)/Fe(III))), com a produção de radicais livres e espécies oxidantes “*in situ*”

utilizando o próprio metabolismo do inseto para desencadear e manter a produção de radicais livres e espécies oxidantes “*in loco*”. As reações ocorrem nas células do sistema digestório (SD) do inseto (principalmente no intestino médio no intervalo de pH 7,5 a 10 (mesêntero)), após destruição da matriz peritrófica (MP) (primeira linha de defesa dos insetos), os radicais livres espécies oxidantes atacam as células com extensos danos teciduais [2]. Os complexos metálicos com Cu(II) apresentam maior atividade biológica em relação aos ligantes livres com ou sem atividade biológica. Neste contexto, a síntese, caracterização e estudo da atividade inseticida/larvicida e bioatividade (atividade bactericida) dos complexos L-Glutamato-Cu(II), L-Aspartato-Cu(II) são propostas para análise da atividade inseticida/biológica com viabilidade/abrangência para o controle das formas imaturas de *A. aegypti* e redução da incidência da doença, principalmente, nas residências.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade inseticida e biológica de complexos de Cu(II) baseados em aminoácidos (ligantes do metal e considerados neurotransmissores dos insetos) como moléculas inseticidas para o controle e manejo do *A. aegypti* e redução da incidência de dengue.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar os complexos de aminoácidos de Cu(II) com os ligantes o ácido L-Glutâmico e ácido L-Aspártico por análise dos espectros de Infravermelho (IV), Ultravioleta e Visível (UV/Vis.), Difração de Raio-X, Análise Elementar de CHN, Análise Térmica e outras propriedades físicas.

Realizar experimentos de biotoxicidade para determinação das concentrações letais (CLs) utilizando larvas de terceiro estágio (3°) de *A. aegypti* análise de efeito residual e propor a continuidade dos estudos propondo formas de liberação lenta para controle prolongado dos imaturos por ciclos de reprodução;

Analisar a atividade biológica por antibiogramas com bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 (Gram-positiva) e *Escherichia coli* ATCC-25922 (Gram-negativa) para análise da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em acordo com os métodos WHO [15] e NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) [16], respectivamente.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Dengue

3.1.1 Vírus

Os vírus responsáveis pela dengue DENV 1 a 4 pertencem à família dos *Flavivirus* e são classificados como arbovírus. O genoma consiste de uma fita simples de RNA, revestida por uma cápsula protéica (núcleocapsídeo) no formato icosaédrico [17]. Os quatro sorotipos conhecidos DENV 1 a 4, podem causar a infecção sem sintomas aparentes, com sinais claros da infecção e até com quadros graves e severos da doença, podendo levar a óbito o doente que é seu reservatório.

A transmissão do agente etiológico ocorre quando o inseto vetor faz o repasto sanguíneo (hematofagia) em uma pessoa infectada. Após esta etapa de contaminação do inseto o vírus irá se multiplicar em seu intestino médio (mesêntero), e ao longo do tempo, o vírus se espalhará por todo o organismo do inseto, até atingir suas glândulas salivares, onde por sua vez ao fazer novo repasto sanguíneo fará a transmissão do vírus da pessoa doente para uma pessoa sadia [18].

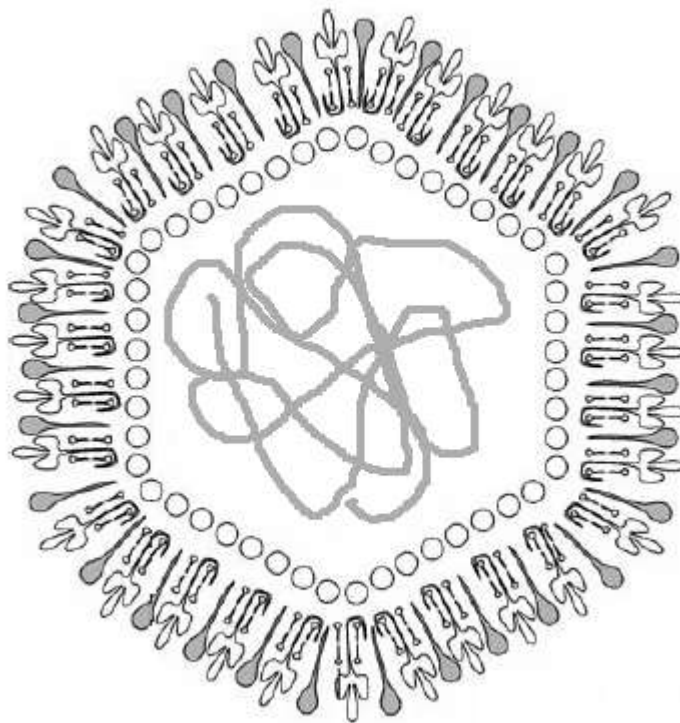


Figura 2: Modelo de uma partícula do vírus da dengue (fonte: Ministério da Saúde, 2010)

3.1.2 Insetos vetores

Os vetores da dengue fazem parte do gênero *Aedes*, sendo que entre as várias espécies vetoradas do subgênero *Stegomyia* encontra-se o *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Aedes polynesiensis*, e também outras espécies. Todas estas espécies mostram apresentam susceptibilidade ao vírus e podem ser potenciais vetores da doença [19].

No Brasil o vetor da dengue é o *Aedes aegypti*, cuja origem é a África, mas foi originalmente descrito no Egito, mas devido ao fato das permanentes migrações do homem o inseto disseminou pelo mundo [20]. A espécie está distribuída ao redor do mundo entre as latitudes 35° norte e 45° sul e até mesmo fora desses limites, onde há isotermas de temperatura de 20°C [21].

3.1.3 *Aedes aegypti*

Pertence ao Reino *Animalia*, Filo *Arthropoda*, Classe *Insecta*, Ordem *Diptera*, Subordem *Nematocera*, Família *Culicidae*, Subfamília *Culicinae*, Gênero *Aedes*, Subgênero *Stegomyia*, e Espécie *Aedes aegypti*.

O *A. aegypti* é um mosquito bem adaptado ao ambiente urbano (antropofilizado), espalhou-se pelo mundo através das migrações humanas. Os insetos utilizam recipientes contendo água, normalmente água limpa, tais como; caixas de d'água, latas, garrafas, vasos de plantas, pneus, tambores e outros recipientes que possam acumular água [22]. Estudos mais recentes mostram que a fêmea do mosquito tem preferência por locais para a oviposição em recipientes onde a água apresenta uma relativa variedade de bactérias as quais, possivelmente, indicam pela emissão de substâncias voláteis se o local de oviposição é adequado para a postura e posterior eclosão dos ovos para a continuidade do ciclo reprodutivo [23].



Figura 3: Imagem *Aedes aegypti* adulto (inseto alado) realizando hematofagia em humano (Fonte: Ministério da Saúde, 2006)

3.1.3.1 Ciclo de vida do *Aedes aegypti*

O *A. aegypti* possui o ciclo de vida dividido em quatro estágios; ovo, larva, pupa e inseto adulto/vetor (inseto alado).

Os ovos são depositados pela fêmea externo ao contato do meio líquido, mas próximo à superfície d' água. A umidade e o contato dos ovos com a água é o indicador para a eclosão dos ovos. Após a eclosão que pode ocorrer em dois a três dias, a depender da temperatura e condições do criadouro. Os ovos atingirão o desenvolvimento embrionário e estarão prontos para eclodir, entretanto, para tal desenvolvimento é exigido condições elevadas de umidade e uma temperatura entre 26°C a 36°C, na natureza os ovos desidratados podem resistir até 450 dias [24]. Na fase larval há quatro estádios de desenvolvimento, este estágio é totalmente dependente da água (meio aquático). As larvas se alimentam de detritos orgânicos, fungos, protozoários, bactérias e até outros microorganismos presentes e que compõe sua cadeia alimentar. A larva possui tórax com espinhos laterais, apresentam oito segmentos no meso e metatorax sendo que no 8º possui o pécten por onde respira [24] na superfície do líquido.

A pupa possui formato de vírgula, não requer alimento, possui movimentos rápidos e característicos, passa a maior parte do tempo respirando na superfície d'água e seu período de desenvolvimento dura de um a três dias. Tem preferência por local com pouca iluminação e ausência de vento para que o inseto possa emergir e não entrar em contato com a água [24].

O inseto alado ou adulto fica em repouso horizontal por até 15 minutos e após cerca de uma hora estará pronto para voar, após este processo o mosquito irá alimentar-se em fontes que possuam carboidratos; todavia, somente a fêmea irá se alimentar de sangue para a maturação do seus ovos para amadurecimento e continuidade do ciclo reprodutivo. O ciclo se completa em ambiente escuro e protegido de predadores naturais e dura de dois a três dias em seguida ela fará a oviposição entre 300 a 400 ovos, depositando-os em vários criadouros [24].

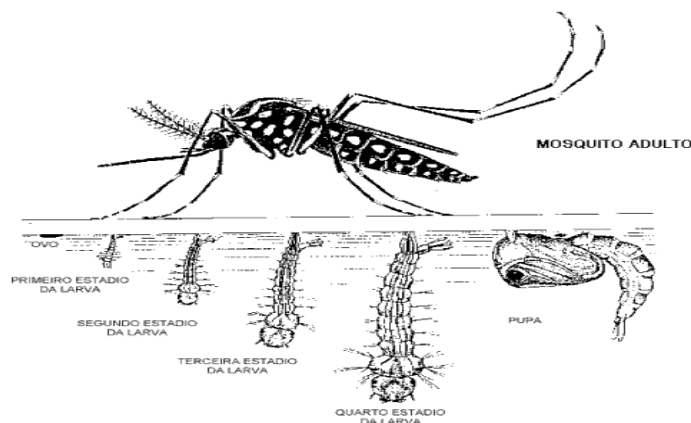


Figura 4: Estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti* (Fonte: Ministério da Saúde, 2006)

3.2 Estresse Oxidativo

3.2.1 Estresse Oxidativo

Define-se estresse oxidativo como processo metabólico induzido por íons metálicos e quebra da homeostase que produz espécies radicais e oxidantes fazendo com que o sistema de desintoxicação do organismo em questão não consiga eliminar estas espécies reativas (radicais livres e espécies oxidantes), com o acúmulo e o excesso de radicais livres, estes provocam oxidações não específicas nas células causando oxidações e destruição celular, tecidos e intensas alterações no sistema metabólico [25]. A reação de estresse oxidativo pode ser aplicada a modelo de toxicidade que utiliza o próprio metabolismo para a continuidade da espécie tóxica; pode se também exemplificar a partir do metabolismo de larvas de *A. aegypti* que em contato com metais produzem estas espécies tóxicas. As reações redox ocorrem “*in situ*” com a destruição inicial da matriz peritrófica e com extensos danos ao sistema digestório do inseto a partir das alterações celulares, teciduais e em último caso a destruição do sistema digestório, ocasionando a morte do inseto [14]. Na Figura 5 mostra-se os danos metabólicos no sistema digestório (mesêntero) de larvas de terceiro (3º) estágio de *A. aegypti* induzidos por complexo de EDTA-Cu(II) a 500 ppm em pH 7,5-8,0 no período de 24 horas de exposição [2].

A

B

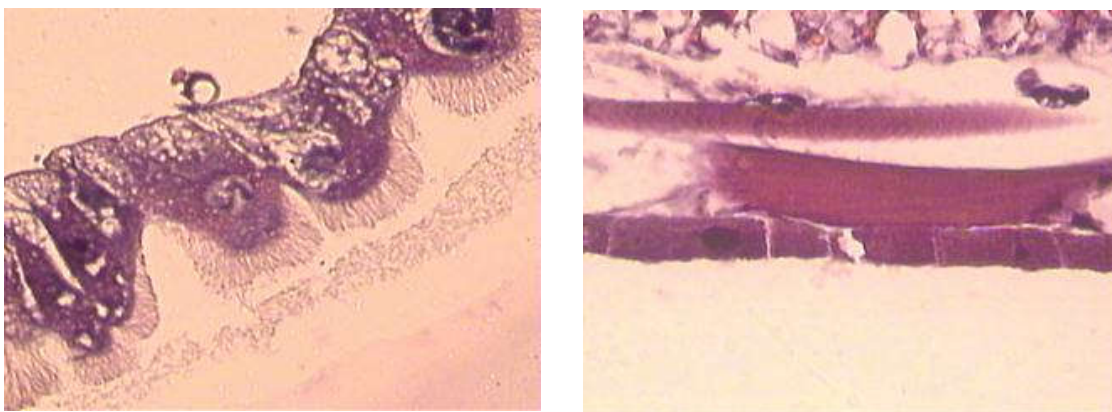


Figura 5: Células do sistema digestório de larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*. A) células normais com microvilosidades, e B) células deformadas e destruídas. Ampliação 500x (Fonte: Gaban, 2009)

3.2.2 Espécies radicais e oxidantes – EROS

As espécies oxidantes ou também chamadas de espécies reativas têm como principais representantes, as espécies reativas de oxigênio EROs, de nitrogênio ERN, de enxofre ERS, de cloro ERCl, do carbono ERC e espécies reativas de metais de transição ERM^{n+} [2]. As principais espécies radicalares e oxidantes de importância biológica dos grupos supracitados estão descritas/mostradas na Tabela 1.

Tabela 1: Principais espécies radicalares e oxidantes (EROs) de importância biológica.

Espécies reativas	Espécies radicalares
ERRO	O_2^* , H_2O_2 , *OH , RO_2^* , RO^* , $^1O_2^*$, O_3
ERN	NO^* , NO_2^* , $ONOO^-$
ERCl	HOCl, Cloraminas
ERS	RS^*
ERC	R^*
ERM^{n+}	Fe, Cu, Mn, etc.

Espécies radicalares de maior importância [26].

3.3 Cobre

3.3.1 Cobre

O cobre possui configuração eletrônica $3d^{10}4s^1$, possui duas formas iônicas Cu(I) com configuração $3d^{10}$ e Cu(II) com configuração $3d^9$, sendo que o cobre bivalente, Cu(II), é o que possui o estado de oxidação mais estável. É componente importante para o desempenho biológico, visto que é parte de um grande número de proteínas e enzimas, além de possuir um elevado potencial redox tornando-se essencial nas reações de fotossíntese, respiração, formação de tecido conjuntivo, metabolismo do ferro, erradicação de radicais livres e na função neurológica [27].

3.3.2 Toxicidade do Cobre

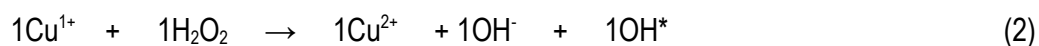
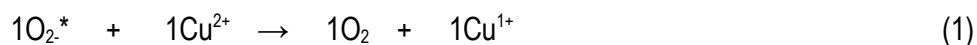
A toxicidade do cobre no homem, afeta diretamente o fígado, visto que é o primeiro local de armazenamento do metal. Os danos manifestam-se através de cirrose hepática aguda, além de apresentar hemólise, danos aos túbulos renais, danos cerebrais, podendo haver evolução para estados de coma, necrose hepática colapso vascular e morte, sendo que a dose letal em um indivíduo adulto é cerca de até 10 gramas [28].

Em relação às doenças relacionadas ao cobre temos a Síndrome de Menkes e a doença de Wilson. A síndrome de Menkes é hereditária e afeta os níveis de concentração de cobre no organismo, é mais comum em homens e tem seu surgimento na infância, causa deterioração do sistema nervoso, fraqueza muscular e atraso mental [29]. A doença de Wilson é de origem

hereditária autossômica recessiva, há o acúmulo excessivo de cobre nos tecidos e, principalmente, no fígado e cérebro, um dos sintomas é o aparecimento do anel de Kayser-Fleisher [30].

3.3.3 Dano oxidativo causado pelo íon cobre

Vários estudos foram propostos para explicar a presença de cobre nas células, sendo tais teorias fundamentadas na capacidade deste metal na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Tanto o íon cúprico, Cu(II), como o íon cuproso, Cu(I), podem atuar em reações de redox, na presença de superóxido $\cdot\text{O}_2^-$ ou de agentes redutores como o ácido ascórbico e o GSH (glutaciona) o íon cúprico pode ser reduzido ao íon cuproso o qual é capaz de catalisar a formação de radicais hidroxila (OH^*) a partir do peróxido de hidrogênio via a reação de Haber-Weiss nas equações 1 e 2 [31].



O radical hidroxila é o mais potente oxidante biológico, é capaz de reagir com todas as moléculas biológicas. Ele age fazendo a abstração do hidrogênio de um aminoácido ou de um ácido graxo insaturado [32], fazendo com que estes apresentem um radical carboxílico R^* . Outros estudos confirmaram a capacidade do Cu(II) de induzir a quebra do DNA e a oxidação de bases através de radicais livres de oxigênio (EROs).

3.4 Ferro

3.4.1 Ferro

O Ferro é o elemento 26º da Tabela Periódica, ele é o quarto elemento mais abundante na Terra. Possui distribuição eletrônica $3d^6 4s^2$, tem duas formas iônicas predominantes e de sua importância para organismos vivos [33], Fe(II) $3d^6$ e o Fe(III) $3d^5$.

Devido a sua configuração eletrônica, o ferro tem capacidade para reações redox as quais irão culminar na produção de radicais livres e espécies oxidantes. Nos sistemas biológicos o ferro é geralmente encontrado em dois estados de oxidação: Fe(II), Fe (III) [34]. Enquanto o Fe(III) forma polímeros de oxihidróxidos o que conseqüentemente gera precipitados, o Fe(II) em pH fisiológico é solúvel. Todavia o Fe(II) em meios aquosos é instável e tende a reagir com o oxigênio molecular para formar Fe(III) e superóxido [35].

3.4.2 Importância do íon Ferro

O ferro é um elemento essencial, necessário para o crescimento e sobrevivência de quase todos os organismos. O ser humano normal contém aproximadamente 4 a 5 gramas de ferro no organismo [36]. Nos seres humanos, o ferro tem importância crucial no transporte do oxigênio, ele faz parte de uma metaloproteína conhecida como hemoglobina [37]. No processo da cadeia respiratória o íon Cu(II) tem função vital para a funcionalidade do íon Fe(III), isto pode ser vislumbrado no conhecimento bioquímico de um quadro de privação de ferro pelo organismo, i.e anemia ferro privativa.

A deficiência de ferro pode ocasionar anemia e retardo mental em crianças em crescimento [38]. Sendo que o excesso de ferro é menos freqüente e envolve defeitos de absorção de ferro e transporte. A toxicidade do ferro pode ser associada à hemocromatose primária. A hemocromatose é causada por um defeito nos genes que controlam a quantidade de ferro absorvida dos alimentos, a ingestão elevada de ferro dietético e transfusões de sangue freqüentes [39].

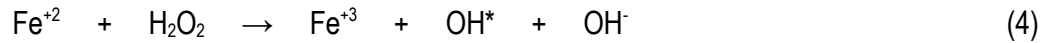
Elevadas concentrações de ferro tem sido associadas a várias condições patológicas, incluindo alterações no fígado e doenças do coração, câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes, anormalidades hormonais, e anormalidades no sistema imunológico [40].

3.4.3 Dano oxidativo causado pelo íon Ferro no *Aedes aegypti*

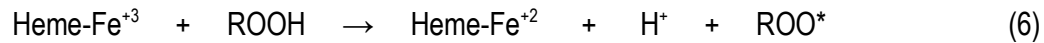
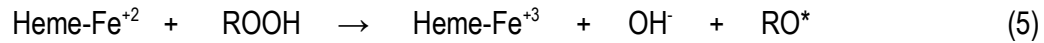
A hemoglobina é a proteína mais abundante no sangue dos mamíferos chegando em alguns casos até 60% do total de proteínas [41]. Sendo assim, a fêmea do *A. aegypti* ao fazer a ingestão de sangue (hematofagia) estará ingerindo uma grande quantidade de hemoglobina, a hemoglobina provém da quebra das hemácias. No intestino do *A. aegypti* a hemoglobina é digerida e grandes quantidades de grupos heme (complexo de ferro) são liberadas [42], onde ele irá ser degradado formando a biliverdina biglutaminada, além da produção de íons ferroso, Fe(II) [43]. Devido ao fato do grupo heme transitar entre dois estados de oxidação (heme-Fe(II) e heme-Fe(III)), ele se torna um potencial catalisador para reações redox [41]. O grupo heme pode ser utilizado como referência para explicação e entendimento dos mecanismos envolvidos a partir de complexos metálicos de Cu(II) e Fe(III) na toxicidade para larvas de *A. aegypti* [13].

Sendo assim através de vários experimentos “*in vitro*” confirmam a formação de radicais hidroxila OH*, como é mostrado nas equações das reações redox 3 e 4 [44];





A molécula de heme sofre as reações redox como mostrado nas equações 5 e 6 [45];



Pode-se ter uma idéia melhor do dano causado pela heme através da Figura 6 que esquematiza um modelo como a degradação da heme e a produção de espécies reativas, como radicais livres e espécies oxidantes.

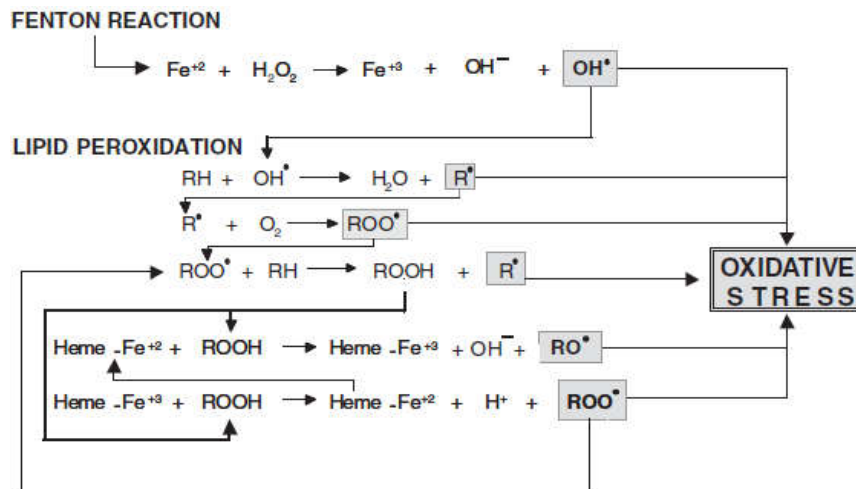


Figura 6: Modelo geral de formação de radicais livres induzidas por heme e ferro (Fonte: Graça-Souza A.V., 2006)

3.5 Aminoácidos

3.5.1 A Importância dos aminoácidos, AA

Os aminoácidos (AA) são moléculas carbônicas formadas pela junção de um grupo amina e um grupo carboxílico, do ponto nutricional, temos os aminoácidos essenciais que são aqueles os quais o corpo não produz os aminoácidos não-essenciais que o corpo sintetiza. Eles são essenciais na composição do corpo humano, visto que através destes são formadas as proteínas e as enzimas, através de ligações peptídicas que são as unidades básicas de constituição e funcionamento metabólico dos organismos vivos [46].

3.5.2 Ácido Glutâmico

O ácido glutâmico é um aminoácido polar de natureza ácida, pois possui mais de um grupo carboxila, tem massa molecular 147,13 g/mol, possui atividade óptica. Sendo que o ácido L-glutâmico é um dos 20 aminoácidos encontrados em nossa alimentação diária [47].

No corpo humano a parte onde há a maior concentração de glutamato é o cérebro, ele é formado a partir do ciclo de Krebs, onde é armazenado nas vesículas sinápticas.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC), sendo que dele se originam inúmeros receptores. O receptor AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionic) faz a transmissão sináptica excitatória no sistema nervoso central rápido e através de receptores NMDA (ácido (2R)-2-(metilamino) butanóico), faz a resposta excitatória lenta [48].

Nos insetos, mais especificamente na junção neuro-muscular há dois principais neurotransmissores o L-glutamato (excitador) e o γ -aminobutírico (inibidor), essa junção é chamada de glutaminérgica, através dela é feito o controle dos íons cloro. A alteração desta junção pode prejudicar a permeabilidade dos íons cloro (Cl^-), a qual pode originar dois problemas, o primeiro é o aumento da permeabilidade dos íons Cl^- fazendo com que haja um bloqueio no estímulo nervoso; o segundo é a diminuição desta permeabilidade que irá levar ao aumento do estímulo nervoso, isto é, uma hiperexcitação [49]. Esta hiperexcitação poderá contribuir para intensificar o quadro de estresse oxidativo no metabolismo do inseto, e potencializar a atividade inseticida/toxicidade que está baseada em reação de estresse oxidativo induzida por íons metálicos via reação redox.

3.5.3 Ácido Aspártico

O ácido aspártico é um aminoácido polar de natureza ácida, pois possui mais de um grupo carboxila, tem massa molecular 133,1 g/mol, possui atividade óptica. Sendo que o ácido L-aspártico é um dos 20 aminoácidos também encontrados em nossa alimentação diária [50].

Juntamente com o ácido glutâmico desempenha papel importante para síntese dos demais aminoácidos, dentre estes quatro são essenciais como o metionina, treonina, isoleucina e lisina. Funciona como um estimulador dos receptores NMDA, entretanto, seu estímulo não é mais intenso que o glutamato [51].

4. MATERIAL e MÉTODOS

4.1 Síntese dos complexos de L-Glutamato-Cu(II) e L-Aspartato-Cu(II)

A síntese do complexo de L-Glutamato-Cu(II) foi feita através da mistura das soluções aquosas do ácido L-glutâmico 19,7mmol e nitrato de cobre(II) 19,7mmol a uma temperatura de $\pm 80^{\circ}\text{C}$, sob agitação moderada durante uma hora, em seguida a solução foi deixada em repouso por 24 horas e posteriormente, foi adicionado etanol absoluto até que houvesse precipitação dos complexos; o precipitado foi filtrado e lavado com etanol absoluto e posto para secar em um dessecador à vácuo para as caracterizações e bioensaios de toxicidade. O mesmo procedimento foi utilizado para síntese do L-Aspartato-Cu(II), 10,2mmol de ácido L-aspartico e 10,2mmol de nitrato de cobre(II). Os rendimentos das reações foram; de 70,2% para L-Glutamato-Cu(II) e 80,5% para o L-Aspartato-Cu(II).

4.2 Síntese dos complexos de L-Glutamato-Fe(III) e L-Aspartato-Fe(III)

A síntese do complexo de L-Glutamato-Fe(III), foi realizada com a mistura de uma solução aquosa de ácido L-glutâmico 9,8mmol, no qual foram adicionadas quatro gotas de trietilamina para a desprotonação do ácido glutâmico, adicionou-se após a completa dissolução do ácido à solução aquosa de nitrato de ferro(III) 9,8mmol. A mistura foi mantida sob agitação moderada a uma temperatura de $\pm 80^{\circ}\text{C}$, durante uma hora e em seguida deixada em repouso durante 24 horas; o precipitado foi filtrado e lavado com uma solução de água/etanol 1:1 e guardado em um dessecador à vácuo para caracterizações e bioensaios de toxicidade. O mesmo procedimento foi utilizado para síntese do L-Aspartato-Fe(III), 10,6mmol de ácido L-aspartico e 10,6mmol de nitrato de ferro(III). Os rendimentos das reações foram; 65,2% para o L-Glutamato-Fe(III) e 75,8% para o L-Aspartato-Fe(III).

4.3 Ovos de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller

Para estabelecimento da colônia do *A. aegypti* linhagem Rockefeller no insetário do Laboratório de Pesquisa (Laboratório de Insetos Vetores (LIV) da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Biológicas (FCBA)/UFGD utilizou-se ovos de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller, fornecidos pelo Departamento de Biologia Animal – UNICAMP, Campinas, SP. O insetário é climatizado (temperatura $\pm 27^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa $\pm 60\%$ e com controle de fotoperíodo (10 horas de escuro e 14 horas de luz).

Os ovos foram colocados para eclosão das larvas em uma bandeja plástica na qual se adicionou água destilada e ração para peixe na proporção de 1 grama por litro devidamente macerada com o auxílio de almofariz e pistilo. A temperatura interna do insetário de 27°C e

umidade relativa de 60%. As larvas foram transferidas individualmente com auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico com a ponta cortada para não haver lesão das mesmas, para outra bandeja de plástico, contendo água destilada e ração para peixe macerada (como alimento; marca Alcon). O procedimento foi repetido diariamente até que o desenvolvimento larval atingisse o terceiro (3º) estágio para realização dos bioensaios. Na Figura 7 mostra as larvas de *A. aegypti* linhagem Rockfeller (susceptível; não resistentes).



Figura 7: Larvas de *Aedes aegypti* utilizadas para os bioensaios de toxicidade

4.4 Teste de susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockfeller

4.4.1 Teste de susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockfeller para o complexo L-Glutamato-Cu(II)

O teste de susceptibilidade foi realizado com larvas de terceiro (3º) estágio de *A. aegypti* linhagem Rockfeller (não resistentes).

O complexo L-Glutamato-Cu(II) foi diluído em água destilada e avolumado em um balão de 100 mL, com concentração de 6.000 ppm (solução estoque). Foram feitas a partir desta solução estoque, três concentrações de diluição, 50 ppm, 200 ppm e 600 ppm. Para cada uma das concentrações foram realizadas repetições em octuplicata (8x). Em cada concentração foram usadas 20 larvas em copos descartáveis de 50 mL contendo 20 mL de solução do complexo e após vinte quatro horas foi contado o número de larvas mortas por copo.

Os dados de mortalidade das larvas foram submetidos á análise de Probit através do programa Polo-PC (LeOra Software 1987), para obtenção das concentrações letais (CLs), CL10,

CL50 e CL90. Na Figura 8 mostram-se os copos descartáveis com a solução do complexo metálico e larvas de *A. aegypti* (Bioensaio de toxicidade ou Susceptibilidade).



Figura 8: Teste de susceptibilidade de larvas *Aedes aegypti* com L-Glutamato-Cu(II).

4.4.2 Teste de susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockfeller para o complexo L-Glutamato-Fe(III)

O teste de susceptibilidade foi realizado com larvas de terceiro (3^o) estágio de *A. aegypti* linhagem Rockfeller.

O complexo L-Glutamato-Fe(III) foi diluído em água destilada e avolumado em um balão de 100 mL, com concentração de 10.000 ppm (Solução Estoque). Foram feitas a partir desta três concentrações, 5.000 ppm, 1.750 ppm e 500 ppm. Para cada uma das concentrações foram realizadas repetições em octuplicata (8x). Em cada concentração foram usadas 20 larvas em copos descartáveis de 50 mL contendo 20 mL do complexo metálico e após 24 horas de exposição foi contado o número de larvas mortas por copo.

Os dados de mortalidade das larvas foram submetidos á análise de Probit através do programa Polo-PC (LeOra Software, 1987), para obtenção das concentrações letais (CLs), CL10, CL50 e CL90. Na Figura 9 mostram-se os copos descartáveis com a solução do complexo metálico e larvas de *A. aegypti* (Bioensaio de toxicidade ou Susceptibilidade).



Figura 9: Teste de susceptibilidade de larvas *Aedes aegypti* com L-Glutamato-Fe(III)

4.4.3 Teste de susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockfeller para o complexo L-Aspartato-Cu(II)

O teste de susceptibilidade foi realizado com larvas de terceiro (3º) estágio de *A. aegypti* linhagem Rockfeller.

O complexo L-Aspartato-Cu(II) foi diluído em água destilada e avolumado em um balão de 100 mL, com concentração de 2.000 ppm (estoque). Foram feitas a partir da solução estoque, três concentrações diluídas, 1.000 ppm, 500 ppm e 200 ppm. Para cada uma das concentrações foram realizadas repetições em octuplicata (8x). Em cada concentração foram usadas 20 larvas em copos descartáveis de 50 mL contendo 20 mL do complexo e após 24 horas de exposição foi contado o número de larvas mortas por copo.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit através do programa Polo-PC (LeOra Software 1987), para obtenção das concentrações letais (CL), CL10, CL50 e CL90.

4.4.4 Teste de susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockfeller para o complexo L-Aspartato-Fe(III)

O teste de susceptibilidade foi realizado com larvas de terceiro (3º) estágio de *A. aegypti* linhagem Rockfeller.

O complexo L-Aspartato-Fe(III) foi diluído em água destilada e avolumado em um balão de 100 mL, com concentração de 6.000 ppm (estoque). Foram feitas a partir da solução estoque, três concentrações diluídas, 2.100 ppm, 900 ppm e 450 ppm. Para cada uma das concentrações foram realizadas repetições em octuplicata (8x). Em cada concentração foram usadas 20 larvas

em copos descartáveis de 50 mL contendo 20 mL do complexo e após 24 horas foi contado o número de larvas mortas por copo.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit através do programa Polo-PC (LeOra Software 1987), para obtenção das concentrações letais (CLs), CL10, CL50 e CL90.

4.5 Concentração inibitória mínima (CIM) para as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 Gram-positiva, *Escherichia coli* ATCC-25922 Gram-negativa

A concentração inibitória mínima foi determinada utilizando-se o método de macro diluição em caldo, conforme recomendado pelo NCCLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards) [15]. Foi utilizado o caldo Mueller-Hinton suplementado com cátions divalentes cálcio (100 mg/mL) e magnésio (50 mg/mL). Foram feitas diluições seriadas de base dois, obtendo concentrações seriadas de antimicrobianos nos poços. Os isolados testados serão repicados em Agar Nutriente e incubados a 37°C por 24 horas. A densidade da suspensão bacteriana será ajustada para aproximadamente 10^8 UFC/mL comparando com a escala 0,5 de MacFarland. Esta suspensão será diluída 1:100 em solução salina estéril 0,85% e, posteriormente, uma alíquota de 20 µL será inoculada em cada poço (10^4 UFC/poço). A leitura será realizada após o período de incubação de 24 horas a 37°C. O valor da concentração inibitória mínima foi a menor concentração de composto capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano.

4.6 Cristais

As fotos dos cristais formados foram obtidas com auxílio de um microscópio Nikon modelo ECLIPSE E200, com uma câmera acoplada da marca Motic modelo MoticCam 2300.

4.7 Análise de espectro Infravermelho

A análise de espectro infravermelho foi realizada no espectrofotômetro Jasco modelo FT/IR 4100, usando pastilha de KBr, com intervalo de varredura 400cm^{-1} a 4000cm^{-1} .

4.8 Titulação potenciométrica

A titulação potenciométrica foi realizada com o auxílio do pHmetro da marca INSTRUTHERME modelo PH2000 e os dados coletados foram plotados no programa Microcal Origin 6.0.

Foi utilizado como titulante a solução de hidróxido de sódio 0,3 mol/L (NaOH padronizada). As soluções tituladas foram, ácido L-aspártico 0,05 mol/L (Dinâmica 99%), ácido L-glutâmico 0,05 mol/L (VETEC 99%), L-Aspartato-Cu(II) 0,05 mol/L e L-Glutamato-Cu(II) 0,05 mol/L.

4.9 Medidas espectrofotométricas

Os espectros foram realizados no espectrofotômetro Varian Cary 50 Conc, em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 10 mm, com intervalo de varredura 900nm a 350nm.

As amostras utilizadas foram preparadas com auxílio de uma micro pipeta de 1000µL, as medidas foram realizadas em pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9 e pH 10, para elevação do pH utilizou-se uma solução de hidróxido de sódio 0,3 mol/L, para cada pH foi utilizada sete soluções diferentes conforme tabela 2.

Tabela 2: Soluções utilizadas para medidas espectrofotométricas com diferentes razões entre o ácido L-glutâmico (VETEC/SIGMA-ALDRICH 99%) e nitrato de cobre II tri-hidratado $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Dinâmica 99%), sendo que para cada pH houve a adição de hidróxido de sódio 0,3 mol/L, com o intuito de elevar o pH.

Solução	Volume Acido L-glutâmico	Volume de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Volume total
1	2000 µL	8000 µL	10000 µL
2	3000 µL	7000 µL	10000 µL
3	4000 µL	6000 µL	10000 µL
4	5000 µL	5000 µL	10000 µL
5	6000 µL	4000 µL	10000 µL
6	7000 µL	3000 µL	10000 µL
7	8000 µL	2000 µL	10000 µL

Preparo das soluções para medidas espectrofotométricas.

4.10 Análises Termogravimétricas

Esta caracterização foi realizada na Universidade Federal do Mato Grosso do sul pelo Prof. Dr. Lincoln Carlos Silva de Oliveira, as amostra foram colocadas em recipientes de alumínio e aqueceu-se 25-900°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C/minuto. Atmosfera inerte de nitrogênio, com um fluxo de 100 mL/minuto. A calibração foi realizada com índio e zinco. As curvas termogravimétricas obtidos foram processados com o software TasyS.

4.11 Análise Elementar C, H, N

A análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas no Analisador Elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio da marca Perkin Elmer modelo 2400 do IQ/UNICAMP, para os complexos L-Glutamato-Cu(II), L-Aspartato-Cu(II), L-Glutamato-Fe(III) e L-Aspartato-Fe(III).

4.12 Difração de Raios-X

Esta caracterização foi realizada com a colaboração e parceria do Prof. Dr. Ernani D. Vieira da Universidade Federal de Goiás (UFG) e o refinamento dos dados coletados foram realizados com a colaboração do Prof. Dr. Gleison Antonio Casagrande da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Para realizar coletar as medidas foi utilizado um difratômetro de raios-x Bruker com detector APEX II CCD. A estrutura cristalina do cluster foi resolvida por método direto utilizando o pacote SHELXS.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos complexos

5.1.1 Cristais

Fotos dos cristais obtidos da síntese do L-Glutamato-Cu(II), figura 10, os cristais foram obtidos da solução já devidamente purificado do L-Glutamato-Cu(II), esta solução ficou em repouso em temperatura ambiente devidamente protegida para evaporação do solvente (água).

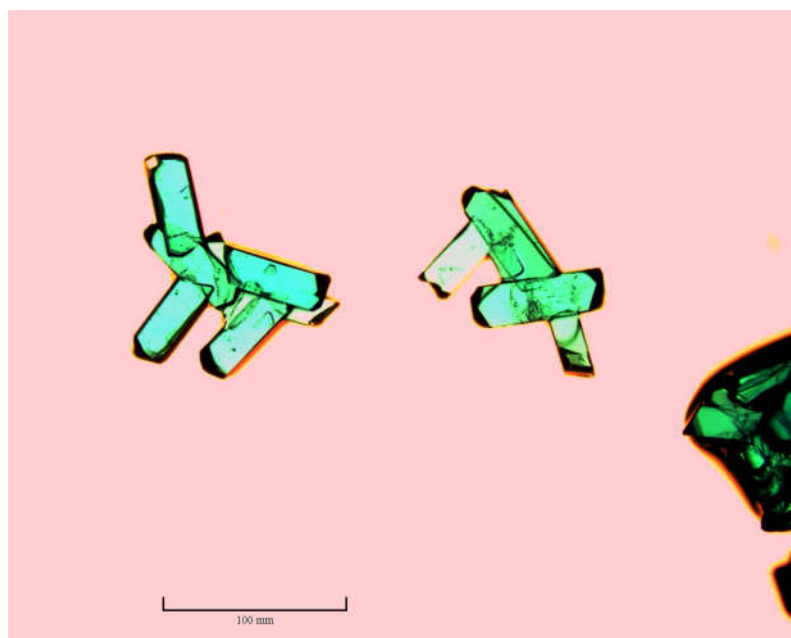


Figura 10: Fotos dos cristais de L-Glutamato-Cu(II) feitas com objetiva de 4X. Foto: Thiago A.D. Rodrigues, 2013

5.1.2 Espectros Infravermelho para os complexos e seus respectivos ligantes

Para os espectros de infravermelho foi utilizado pastilha de KBr previamente seca em estufa, a faixa de varredura utilizada foi 400cm^{-1} a 4000cm^{-1} , foi feita a correção de linha de base, bem como a retirada de bandas de dióxido de carbono e água. A figura 11 esta o espectro de infravermelho do ácido L-aspártico(1), L-Aspartato-Fe(III)(2) e L-Aspartato-Cu(II).

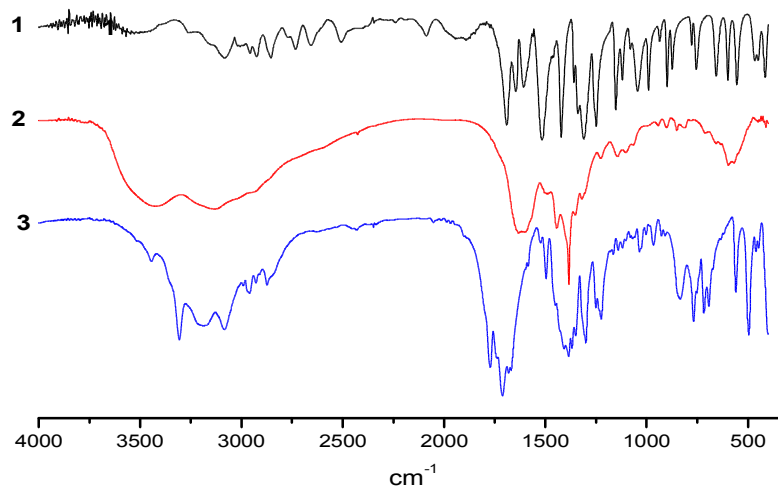


Figura 11: Espectros de infravermelho; 1 ácido L-aspártico, 2 L-Aspartato-Fe(III), 3 L-Aspartato-Cu(II).

Espectro de infravermelho do ácido L-glutâmico(1), L-Glutamato-Fe(III)(2) e L-Glutamato-Cu(II)(3), figura 12.

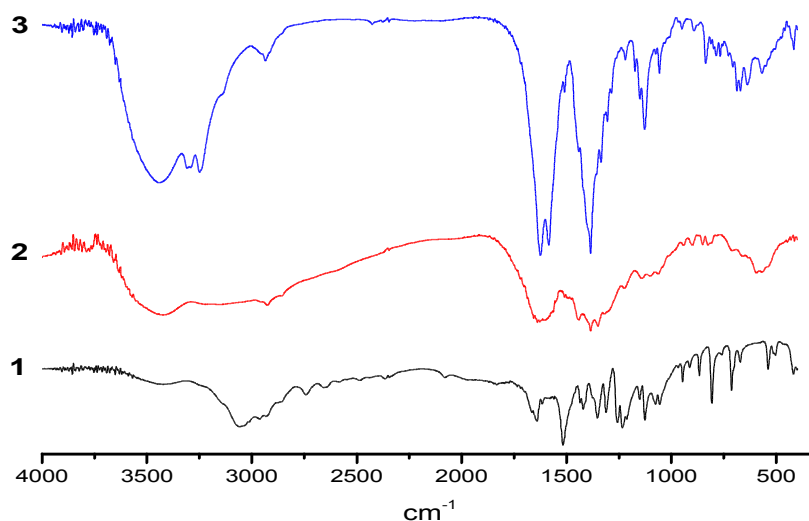


Figura 12: Espectros de infravermelho; 1 ácido L-glutâmico, 2 L-Glutamato-Fe(III), 3 L-Glutamato-Cu(II).

As bandas de maior importância a serem analisadas nesses espectros das figuras 11 e 12, são a (COO^-) do grupo carboxilato. De acordo com os espectros a banda (COO^-) mostra deslocamento significativo nos espectros, quando se compara separadamente o espectro do

ligante e do complexo, isso indica que este grupo funcional participou efetivamente na ligação química do metal – ligante [52], conforme mostrado na tabela 3.

Tabela 3: Mostra os deslocamentos de banda da carboxila encontrados para os ácidos L-glutâmico, L-aspartico e os complexos L-Glutamato-Cu(II), L-Glutamato-Fe(III) e L-Aspartato-Cu(II), L-Aspartato-Fe(III), os deslocamentos foram comparados conforme descrito por Baran [52].

Amostra	$V_{as}(COO^-)$	$V_s(COO^-)$
Ácido L-aspartico	1607, 1560	1421
Ácido L-glutâmico	1665, 1639	1436, 1419
L-Aspartato-Cu(II)	1667, 1585	1407
L-Aspartato-Fe(III)	1632, 1600	1384
L-Glutamato-Cu(II)	1588	1400, 1384
L-Glutamato-Fe(III)	1638, 1560	1385

Comparação das bandas típicas carboxilato de alongamento do aminoácido livre e os respectivos complexos com Cu (II) e Fe(III) (complexos de dados de infravermelhos, os valores cm^{-1}).

5.1.3 Titulação potenciométrica

A titulação potenciométrica foi realizada com o intuito de verificar a desprotonação dos ligantes e dos complexos a fim de obter suas constantes. Sendo que a partir de tais dados podemos saber melhor o comportamento do complexo no trato digestivo do inseto, visto que em determinados pH's teremos uma coordenação entre ligante e metal diferenciada fazendo com que o mesmo tenha carga elétrica também diferenciada de acordo com o pH [53].

Gráfico da titulação potenciométrica do ácido L-aspartico 0,05 mol/L (1) juntamente com o complexo L-Aspartato-Cu(II) 0,05 mol/L (2). Os pK_{as} foram obtidos através da primeira derivada, para o ácido L-aspartico foram 4,18, 4,95 e 10,47, para o L-Aspartato-Cu(II) 3,49, 3,83 e 8,31, figura 13.

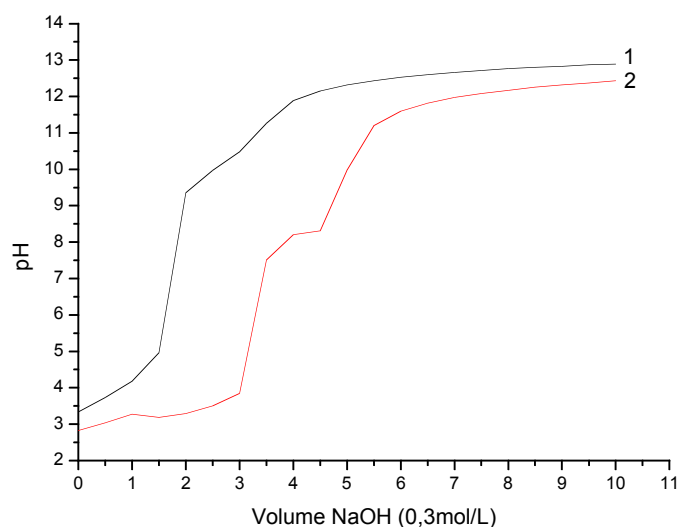


Figura 13: Titulação potenciométrica do ácido L-aspartico 0,05 mol/L (1), complexo L-Aspartato-Cu(II) 0,05 mol/L (2).

Os valores de pK_a encontrados foram diferentes para ligante e complexo, mostrando que a desprotonação é diferenciada quando o aminoácido está coordenado ao cobre, a figura 14 mostra como ocorre as desprotonações envolvidas no ligante.

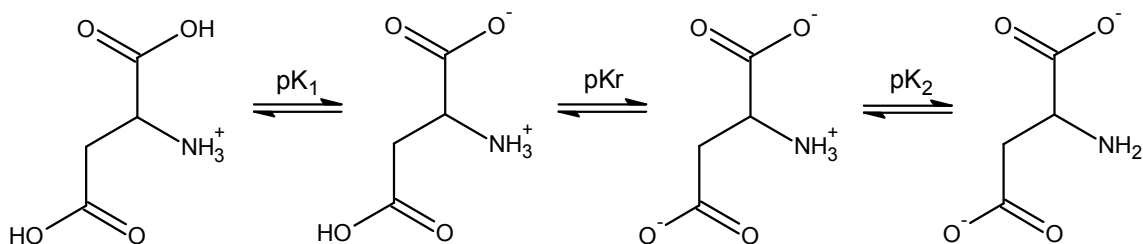


Figura 14: Ácido L-aspartico e suas desprotonações em meio aquoso.

Com os dados obtidos pela titulação potenciométrica pode-se ter uma idéia de como o complexo de L-Aspartato-Cu(II) comporta-se em diferentes pH's, figura 15.

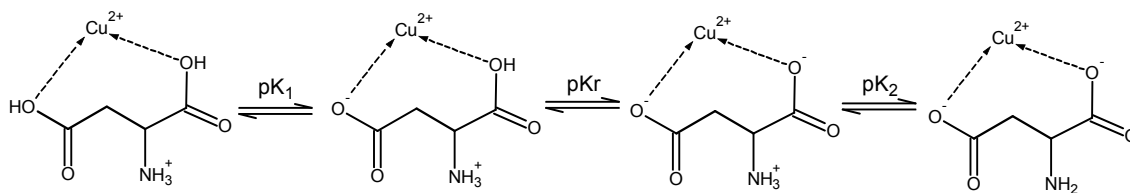


Figura 15: Formas estruturais para o L-Aspartato-Cu(II).

Sendo assim as prováveis estruturas do bio-ativo no intestino da larva são as envolvidas no pK_2 , visto que o pH ao longo do intestino varia de 7 a 10 [54].

Titulação potenciométrica do ácido L-glutâmico 0,05 mol/L (1) juntamente com o complexo L-Glutamato-Cu(II) 0,05 mol/L (2). Os $pK_{a's}$ foram obtidos através da primeira derivada, para o ácido L-glutâmico foram 4,53, 5,42 e 10,42, para o L-Glutamato-Cu(II) 5,30, 6,37 e 9,76, figura 16.

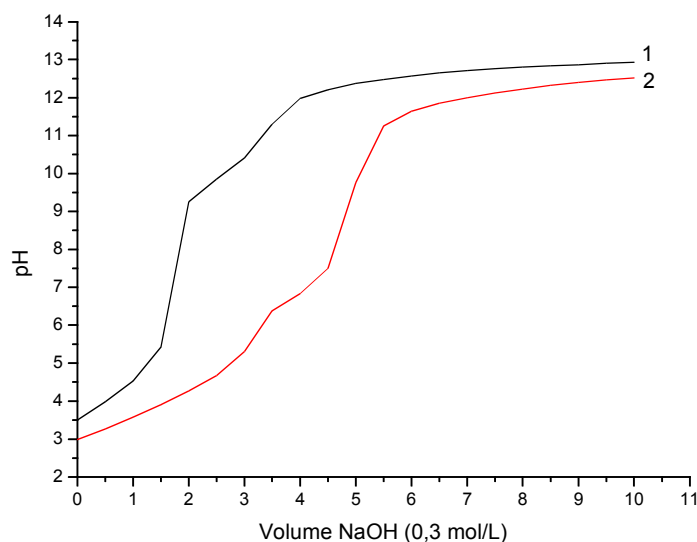


Figura 16: Gráfico da titulação potenciométrica do ácido L-glutâmico 0,05 mol/L (1), complexo L-Glutamato-Cu(II) 0,05 mol/L (2).

Desprotonações envolvidas no ligante, com o intuito de melhor entender como se dá a coordenação entre metal e ligante, figura 17.

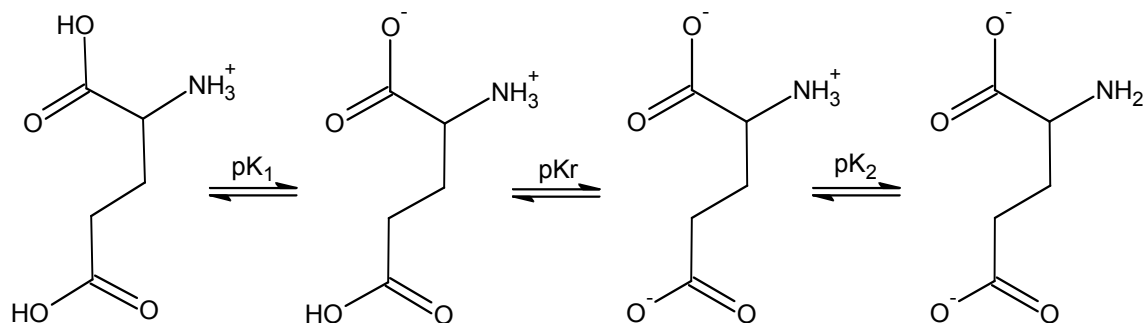


Figura 17: Ácido L-glutâmico e suas desprotonações em meio aquoso.

Com base na titulação potenciométrica e no comportamento do ligante pode-se ter as possíveis estruturas do complexo em diferentes pH's, observando assim suas desprotonações, figura 18.

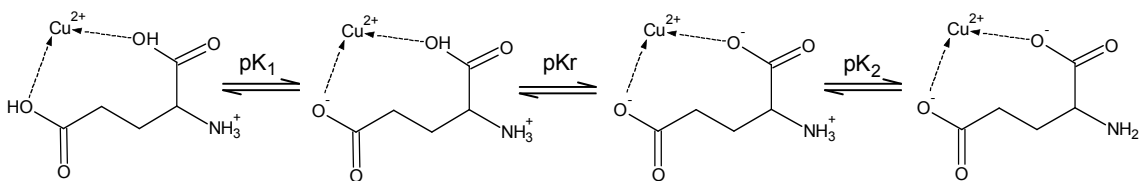


Figura 18: Formas estruturais para o L-Glutamato-Cu(II) em diferentes pH's.

5.1.4 Medidas espectrofotométricas

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em pH 7, pH 8, pH 9 e pH 10 com o intuito de verificar o comportamento dos complexos no trato digestivo do *Aedes aegypti* visto que tal variação de pH ocorre no intervalo de 7 a 10 [54]. O espectro visível para o $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ e ácido L-glutâmico em meio aquoso, figura 19.

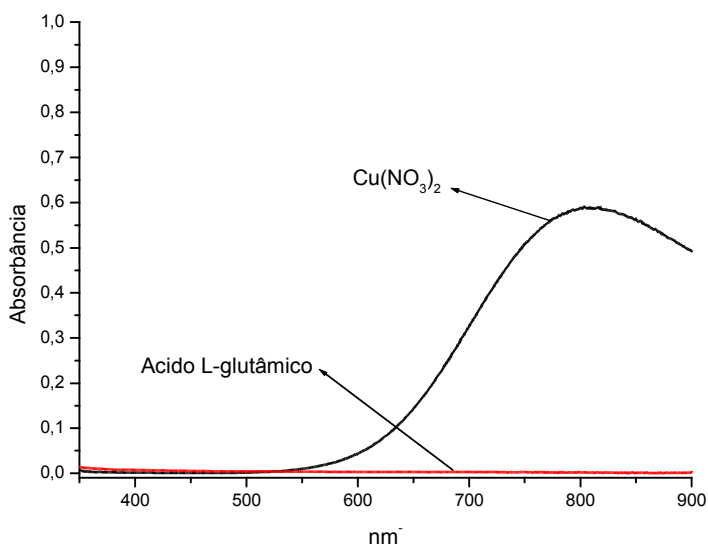


Figura 19: Espectro de soluções de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0,05 mol/L e ácido L-glutâmico 0,05 mol/L, gráfico obtido através do programa Microcal Origin 6.0.

A obtenção dos dados da figura 19 é de suma importância para que se selecionar o comprimento λ de máxima absorvância para o $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ e para o ligante e assim realizar comparações com os comprimentos λ 's de máxima absorção para as soluções avaliadas, mostrando desta forma a formação do complexo metálico, a tabela 4 mostra os comprimentos λ 's de máxima absorção bem como o valor de suas absorvâncias.

Tabela 4: Medidas espectrofotométricas de absorvância e comprimentos λ de máxima absorvância em nanômetros para o $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0,05 mol/L e ácido L-glutâmico 0,05 mol/L.

Solução	Absorvância, Abs	λ (nm) de Máxima Abs.
Acido L-glutâmico	0,0000	000 nm
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	0,5871	805 nm

Espectros obtidos no espectrofotômetro Varian Cary 50 Conc, em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 10 mm, intervalo de varredura 900nm a 350nm. As soluções de ácido L-glutâmico e de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, estão em uma concentração de 0,05 mol/L.

O espectro formado pelas soluções anteriormente descritas. O pH no qual foi realizado a leitura foi pH 6, figura 20, visto que neste pH o excesso de cobre não foi precipitado o que ocorrerá em pH em torno de 7 a 8 [55].

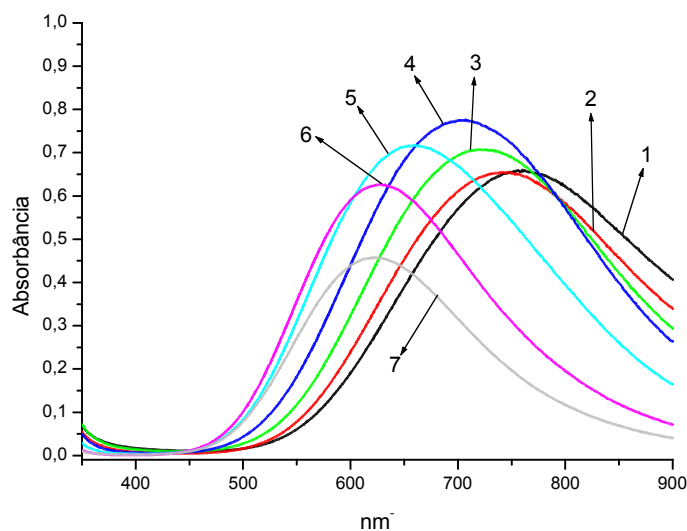


Figura 20: Espectro de soluções em pH 6, gráfico obtido através do programa Microcal Origin 6.0.

Com base no espectro visível, obtido em pH 6, pode-se encontrar o comprimento λ de máxima absorvância e o valor da absorvância para as soluções contendo a mistura entre o ligante e nitrato de cobre(II), conforme tabela 5.

Tabela 5: Medidas espectrofotométricas de absorvância e λ de máxima absorvância em nanômetros para soluções de L-Glutamato-Cu(II).

Solução	Absorbância, Abs	λ (nm) de Máxima Abs.
1	0,6605	760 nm
2	0,6541	745 nm
3	0,7070	724 nm
4	0,7749	705 nm
5	0,7164	661 nm
6	0,6251	630 nm
7	0,4574	624 nm

Espectros obtidos no espectrofotômetro Varian Cary 50 Conc, em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 10 mm, intervalo de varredura 900nm a 350nm.

Espectro formado pelas soluções anteriormente descritas. O pH no qual foi realizado as leituras foi pH 7, ver figura 21.

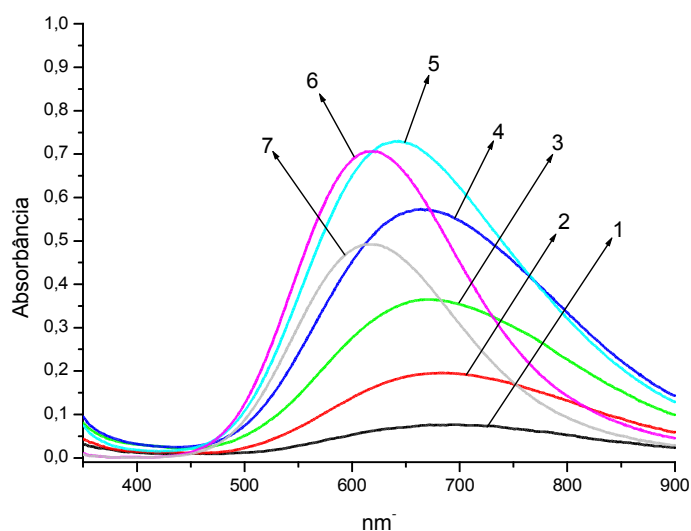


Figura 21: Espectro de soluções em pH 7, gráfico obtido através do programa Microcal Origin 6.0.

Com base no espectro visível, obtido em pH, pode-se encontrar o comprimento λ de máxima absorvância e a absorvância para as soluções contendo a mistura entre o ligante e nitrato de cobre(II). Pode-se também observar que entre o pH 6 para o pH 7 houve um deslocamento hipsocrômico dos comprimentos λ 's de máxima absorvância bem como diminuição da absorvância das soluções 1, 2, 3 e 4, como mostrado na tabela 6.

Tabela 6: Medidas espectrofotométricas de absorvância e λ de máxima absorvância em nanômetros para soluções de L-Glutamato-Cu(II).

Solução	Absorbância, Abs	λ (nm) de Máxima Abs.
1	0,0780	689 nm
2	0,1965	681 nm

3	0,3679	668 nm
4	0,5730	664 nm
5	0,7316	641 nm
6	0,7065	618 nm
7	0,4911	618 nm

Espectros obtidos no espectrofotômetro Varian Cary 50 Conc, em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 10 mm, intervalo de varredura 900nm a 350nm.

Espectro formado pelas soluções anteriormente descritas com a variação de pH's. O pH no qual foi feito as leituras foi pH 8, figura 22.

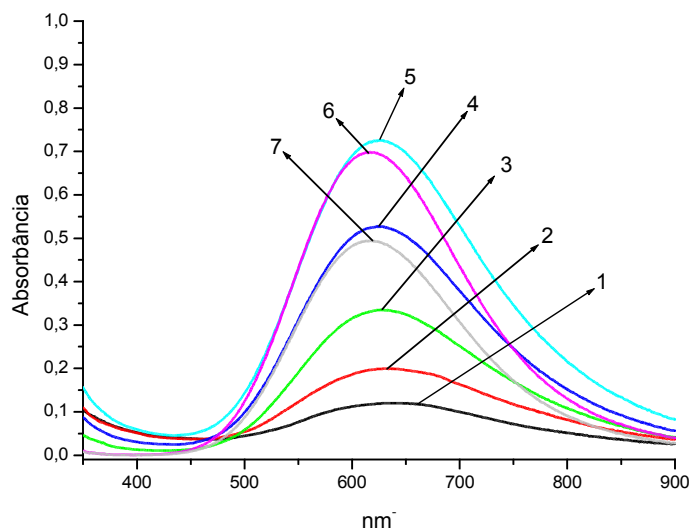


Figura 22: Espectro de soluções em pH 8, gráfico obtido através do programa Microcal Origin 6.0.

Com base no espectro visível, obtido em pH 8, pode-se encontrar o comprimento λ de máxima absorvância e a absorvância para as soluções contendo a mistura entre o ligante e nitrato de cobre(II). Pode-se observar que entre o pH 7 para o pH 8 houve um deslocamento hipsocrômico dos comprimentos λ 's de máxima absorvância, contudo as soluções 6 e 7 não houve mudança indicando que não há mais uma efetiva contribuição do nitrato de cobre(II), no que se refere absorvância das soluções não há uma mudança drástica, conforme mostra a tabela 7.

Tabela 7: Medidas espectrofotométricas de absorvância e λ de máxima absorvância em nanômetros para soluções de L-Glutamato-Cu(II).

Solução	Absorvância, Abs	λ (nm) de Máxima Abs.
1	0,1194	635 nm

2	0,1989	631 nm ⁻¹
3	0,3345	626 nm ⁻¹
4	0,5266	624 nm ⁻¹
5	0,7243	624 nm ⁻¹
6	0,6977	618 nm ⁻¹
7	0,4932	618 nm ⁻¹

Espectros obtidos no espectrofotômetro Varian Cary 50 Conc, em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 10 mm, intervalo de varredura 900nm a 350nm.

Espectro formado pelas soluções anteriormente descritas. O pH no qual foi feito as leituras foi pH 9, figura 23.

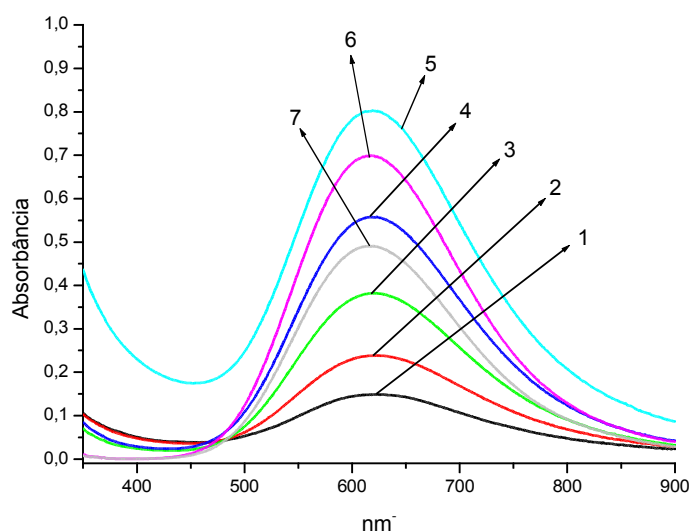


Figura 23: Espectro de soluções em pH 9, gráfico obtido através do programa Microcal Origin 6.0.

Com base no espectro visível, obtido em pH, pode-se encontrar o comprimento λ de máxima absorvância e a absorvância para as soluções contendo a mistura entre o ligante e nitrato de cobre(II), observa-se que entre o pH 8 para o pH 9 houve um deslocamento hipsocrômico dos comprimentos λ 's de máxima absorvância para 618 nm indicando que não há mais a contribuição do nitrato de cobre(II) na absorvância, indica-se assim que somente o complexo está absorvendo, conforme é mostrado na tabela 8.

Tabela 8: Medidas espectrofotométricas de absorvância e λ de máxima absorvância em nanômetros para soluções de L-Glutamato-Cu(II).

Solução	Absorvância, Abs	λ (nm) de Máxima Abs.
1	0,1477	618 nm ⁻¹

2	0,2367	618 nm
3	0,3809	618 nm
4	0,5543	618 nm
5	0,8011	618 nm
6	0,6980	618 nm
7	0,4876	618 nm

Espectros obtidos no espectrofotômetro Varian Cary 50 Conc, em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 10 mm, intervalo de varredura 900nm a 350nm.

Espectro formado pelas soluções anteriormente descritas. O pH no qual foi feito as leituras foi pH 10, figura 24.

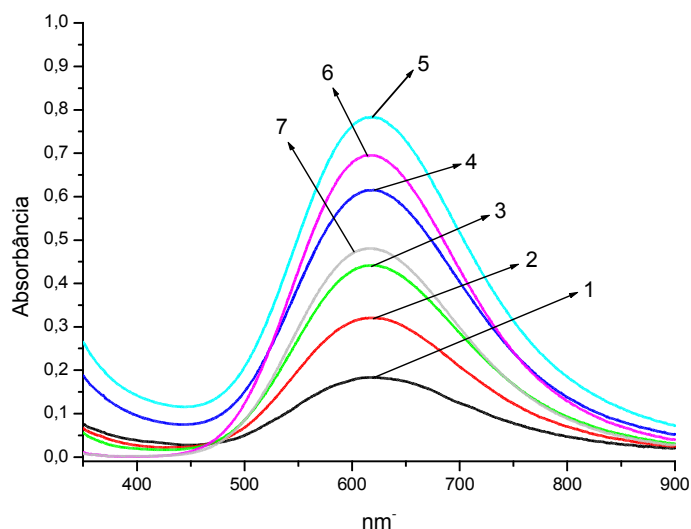


Figura 24: Espectro de soluções em pH 10, gráfico obtido através do programa Microcal Origin 6.0.

Com base no espectro visível, obtido em pH, pode-se encontrar o comprimento λ de máxima absorvância e a absorvância para as soluções contendo a mistura entre o ligante e nitrato de cobre(II). Pode-se observar neste pH que o complexo não altera sua conformação de formação, nem sua fórmula estrutural, isto pode ser observado pelos comprimentos λ 's de máxima absorvância bem como pelo valor da absorvância, conforme mostrado na tabela 9.

Tabela 9: Medidas espectrofotométricas de absorvância e comprimento λ de máxima absorvância em nanômetros para soluções de L-glutamato-Cu(II).

Solução	Absorvância, Abs	λ (nm) de Máxima Abs.
1	0,1832	618 nm
2	0,3197	618 nm
3	0,4415	618 nm

4	0,6143	618 nm ⁻¹
5	0,7831	618 nm ⁻¹
6	0,6941	618 nm ⁻¹
7	0,4802	618 nm ⁻¹

Espectros obtidos no espectrofotômetro Varian Cary 50 Conc, em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 10 mm, intervalo de varredura 900nm a 350nm.

O entendimento do comportamento do metalo-inseticida (complexo bioativo) no meio biológico (metabolismo do inseto; pH 5 a 10/11) em que este será aplicado é de suma importância para entendimento do mecanismo de toxicidade, visto que este meio é aquoso, sendo que em ambientes naturais a água tem um pH entorno de 6,5; mas o inseto possui um gradiente que varia de pH 5 a 10/11. Além do fato de como este complexo bioativo irá comporta-se no trato digestório do inseto onde o pH varia de 5/7 a 10/11 [54], desta maneira pode-se deduzir o local onde o composto irá ter maior permeabilidade no intestino do inseto.

Com o dados obtidos através das medidas espectrofotométricas do complexo em varias razões entre metal e ligante e o aumento do pH, pode notar-se primeiramente que o excesso de cobre foi precipitado fazendo com que o mesmo diminuísse sua influencia na banda de máxima absorbância, além de diminuir significativamente a absorbância nas soluções 1, 2 e 3. Outro efeito foi o deslocamento hipsocrômico de todas as soluções, bem como um aumento de absorbância nas soluções as quais não havia excesso de metal, tal aumento pode ser justificado devido à coordenação do grupo amina ao cobre [56].

5.1.5 Analise termogravimétrica

A analise termogravimétrica foi realizada com o intuito de identificar como o composto se porta com a temperatura, sua degradação térmica, etapas de degradação bem como sua estequiometria a partir dos resíduos óxidos. Gráfico da termoanálise do L-Glutamato-Cu(II), figura 25.

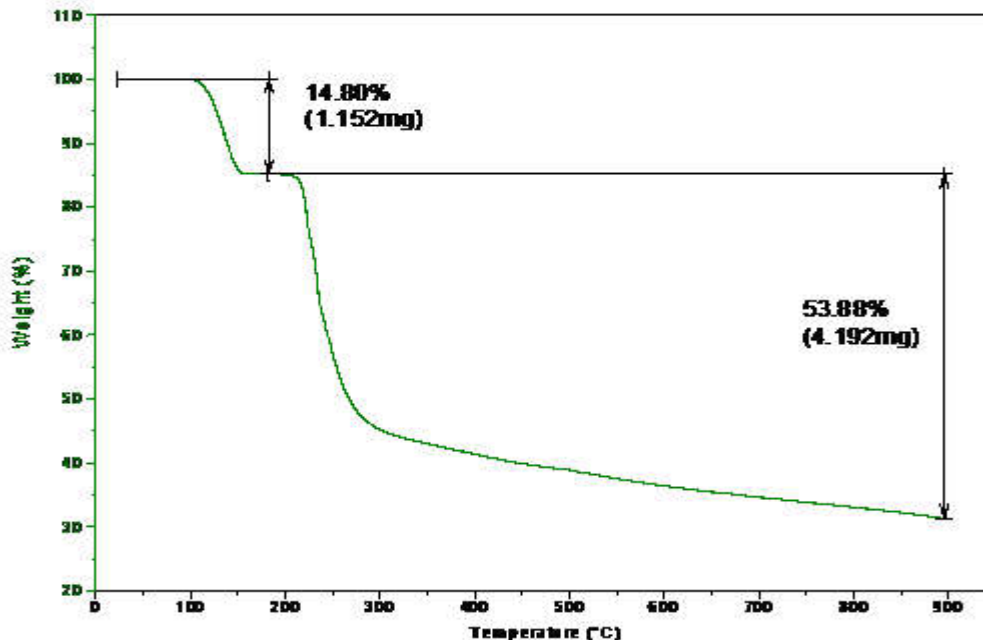


Figura 25: Gráfico da termo análise do L-Glutamato-Cu(II).

A massa utilizada foi de 7,810 mg, pode notar-se primeiramente uma perda de 1,152 mg (14,80%) referente a massa total entre as temperaturas 154°C e 204°C indicando uma provável perda de água, a segunda perda refere-se a degradação do ligante (ácido L-glutâmico) perda de 4,192 mg (53,88%), o resíduo é o metal na forma de óxido de cobre 2,437mg (31,32%). Sendo assim pode-se realizar a estequiometria entre metal e ligante, em uma razão de 1:1, além de obter-se um dado valioso quanto à estabilidade térmica do complexo bioativo que é entorno de 204°C, sendo assim pode-se dizer que a temperatura ambiente no qual o complexo é aplicado não irá degradar o mesmo; e que este poderá ser incluído em polímeros ou argilas com tratamento térmico até 200°C com vistas a um dispositivo de liberação lenta.

5.1.6 Difração de Raios-X

Um monocristal prismático de cor azul-esverdeado foi selecionado para as medidas de difração de raios X. A coleta de dados foi realizada utilizando o difratômetro Kappa Apex II Duo operando com radiação Mo-K α a temperatura ambiente (293 K), 3479 reflexões foram medidas das quais 1612 são independentes por simetria ($R_{int} = 0.014$). O complexo cristaliza no grupo espacial ortorrômbico $P2_12_12_1$, com 4 moléculas por célula unitária. A estrutura foi resolvida com Direct Methods implementado no programa SHELXS e o refinamento do modelo foi feito com o método dos mínimos quadrados de matriz completa utilizando os valores F^2 , implementado no programa SHELXL. Os fatores residuais de ajuste foram $R1 = 0.016$, $wR2 = 0.041$ for as reflexões observadas com $I > 2\sigma(I)$, e $R1 = 0.016$, com todos os dados. A completude dos dados e a redundância das medidas permitiram a definição quantitativa da quiralidade, com o parâmetro de

Flack obtido 0.03(1). O empacotamento cristalino é mediado pela formação ligações de hidrogênio intermoleculares da molécula de água coordenada e uma segunda molécula de água presente no interstício. Um cadeia polimérica tridimensional é formada com a coordenação dos grupos amina e dos ácidos carboxílicos, nas três direções: [100], [010] e [001], a tabela 10 vislumbra os dados de refinamento para o complexo.

Tabela 10: Dados de refinamento obtidos por cristalografia.

Formula empírica	C ₅ H ₁₁ Cu N O ₆	
Massa molecular	244.69	
Temperatura	293K	
Comprimento de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Orthorhombic	
Grupo espacial	P2(1)2(1)2(1)	
Dimensão das celas unitarias	a = 7.2326(2) Å	α = 90°.
	b = 10.3120(3) Å	β = 90°.
	c = 11.0631(3) Å	γ = 90°.
Volume	825.11(4) Å ³	
Z	4	
Densidade (calculada)	1.970 Mg/m ³	
Coefficiente de absorção	2.646 mm ⁻¹	
F(000)	500	
Tamanho do cristal	0.73 x 0.20 x 0.19 mm ³	
Gama theta para coleta de dados	2.70 to 26.46°.	
Índice de variação	-9<=h<=8, -12<=k<=8, -13<=l<=10	
Reflexões coletadas	3479	
Reflexões independentes	1612 [R(int) = 0.0137]	
Integralidade de theta = 26.46°	99.0 %	
Max. E min. transmissão	0.6333 and 0.2482	
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²	
Dados / Restrições / Parametros	1612 / 4 / 135	
Adequação do ajuste em F²	1.073	
Índices finais R [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0156, wR2 = 0.0409	
Índices R	R1 = 0.0161, wR2 = 0.0411	

Parametro estrutural absoluto	0.026(12)
Coeficiente de extinção	0.0015(9)
Pico de maior diferença	0.234 and -0.182 e.Å ⁻³

A geometria da molécula é listada a seguir, nas tabelas 11 a 13, e as geometrias das ligações de hidrogênio intermoleculares estão listadas na tabela 14.

Tabela 11: Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros de deslocamento isotrópico equivalente ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para o L-Glutamato-Cu(II).

Átomos	x	y	z	U(eq)
Cu(1)	-1004(1)	5667(1)	4709(1)	18(1)
O(1S)	4844(2)	3461(2)	5943(1)	27(1)
O(1)	186(2)	7378(2)	4828(1)	24(1)
O(1W)	-1867(2)	3843(2)	4812(2)	32(1)
N(1)	-1908(2)	6085(2)	6369(2)	21(1)
C(1)	288(2)	7843(2)	5900(2)	19(1)
C(2)	-798(3)	7158(2)	6890(2)	18(1)
O(2)	1245(2)	8793(1)	6190(1)	26(1)
C(3)	515(2)	6679(2)	7878(2)	21(1)
C(4)	2077(3)	5818(2)	7436(2)	24(1)
C(5)	3261(3)	5324(2)	8455(2)	21(1)
O(3)	2847(2)	5507(2)	9534(1)	32(1)
O(4)	4751(2)	4712(2)	8160(1)	24(1)

U(eq) é definido como um terço do traço do tensor U^i ortogonalizadas.

Tabela 12: Comprimentos de ligação entre os átomos (Å).

Cu(1)-O(1)	1.9670(15)
Cu(1)-O(4)#1	1.9781(14)
Cu(1)-O(1W)	1.9854(16)
Cu(1)-N(1)	1.9963(16)
Cu(1)-O(2)#2	2.2932(13)
O(1S)-H(1S)	0.9180(5)
O(1S)-H(2S)	0.9150(5)
O(1)-C(1)	1.2810(2)

O(1W)-H(1W)	0.9110(5)
O(1W)-H(2W)	0.9140(5)
N(1)-C(2)	1.4840(3)
N(1)-H(1A)	0.9000
N(1)-H(1B)	0.9000
C(1)-O(2)	1.2410(2)
C(1)-C(2)	1.5220(3)
C(2)-C(3)	1.5300(3)
C(2)-H(2)	0.9800
O(2)-Cu(1)#3	2.2932(13)
C(3)-C(4)	1.5170(3)
C(3)-H(3A)	0.9700
C(3)-H(3B)	0.9700
C(4)-C(5)	1.5040(3)
C(4)-H(4A)	0.9700
C(4)-H(4B)	0.9700
C(5)-O(3)	1.2450(2)
C(5)-O(4)	1.2900(2)
O(4)-Cu(1)#4	1.9781(14)

Transformações de simetria para átomos equivalentes: #1 $-x+1/2, -y+1, z-1/2$, #2 $x-1/2, -y+3/2, -z+1$, #3 $x+1/2, -y+3/2, -z+1$, #4 $-x+1/2, -y+1, z+1/2$

Tabela 13: Angulos de torção para o L-Glutamato-Cu(II).

Relação entre átomos	Angulo
O(4)#1-Cu(1)-O(1)-C(1)	-157.21(14)
O(1W)-Cu(1)-O(1)-C(1)	-54.2(4)
N(1)-Cu(1)-O(1)-C(1)	15.91(14)
O(2)#2-Cu(1)-O(1)-C(1)	108.31(14)
O(1)-Cu(1)-N(1)-C(2)	-16.95(12)
O(4)#1-Cu(1)-N(1)-C(2)	40.7(5)
O(1W)-Cu(1)-N(1)-C(2)	153.22(13)
O(2)#2-Cu(1)-N(1)-C(2)	-117.66(12)
Cu(1)-O(1)-C(1)-O(2)	167.55(15)
Cu(1)-O(1)-C(1)-C(2)	-10.7(2)

Cu(1)-N(1)-C(2)-C(1)	15.69(18)
Cu(1)-N(1)-C(2)-C(3)	-107.12(15)
O(2)-C(1)-C(2)-N(1)	177.85(16)
O(1)-C(1)-C(2)-N(1)	-3.8(2)
O(2)-C(1)-C(2)-C(3)	-58.3(2)
O(1)-C(1)-C(2)-C(3)	120.06(19)
O(1)-C(1)-O(2)-Cu(1)#3	-31.7(3)
C(2)-C(1)-O(2)-Cu(1)#3	146.67.9(2)
N(1)-C(2)-C(3)-C(4)	54(14)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-55.0(2)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-177.05(17)
C(3)-C(4)-C(5)-O(3)	7.1(3)
C(3)-C(4)-C(5)-O(4)	-171.94(18)
O(3)-C(5)-O(4)-Cu(1)#4	-3.0(2)
C(4)-C(5)-O(4)-Cu(1)#4	176.09(16)

Transformações de simetria para átomos equivalentes: #1 $-x+1/2, -y+1, z-1/2$, #2 $x-1/2, -y+3/2, -z+1$, #3 $x+1/2, -y+3/2, -z+1$, #4 $-x+1/2, -y+1, z+1/2$

Tabela14: Bandas de hidrogênio

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(1S)-H(2S)...O(4)	0.915(5)	1.863(6)	2.772(2)	172(2)
O(1S)-H(1S)...O(3)#1	0.918(5)	1.812(9)	2.711(2)	166(3)
O(1W)-H(1W)...O(1S)#5	0.911(5)	1.868(12)	2.716(2)	154(2)
O(1W)-H(2W)...O(1S)#6	0.914(5)	1.932(11)	2.807(2)	159(2)
N(1)-H(1A)...O(1)#2	0.90	2.24	2.947(2)	135.7

Transformações de simetria para átomos equivalentes: #1 $-x+1/2, -y+1, z-1/2$, #2 $x-1/2, -y+3/2, -z+1$, #3 $x+1/2, -y+3/2, -z+1$, #4 $-x+1/2, -y+1, z+1/2$, #5 $x-1, y, z$, #6 $x-1/2, -y+1/2, -z+1$

As ligações longas e interações intermoleculares estão representadas com linhas pontilhadas. O íon cobre está em coordenação piramidal quadrada, com o átomo de oxigênio O2 na posição apical da pirâmide.

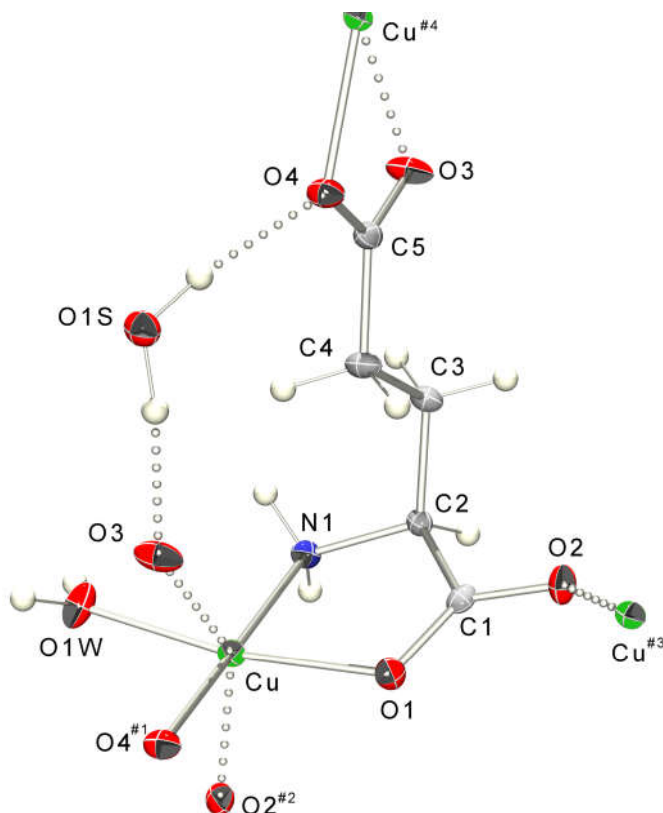


Figura 26: Representação Ortep do complexo com elipsóides de deslocamento atômico representando 30% de probabilidade.

5.1.7 Análise elementar C, H, N

5.1.7.1 Complexo L-Glutamato-Cu(II)

A análise elementar para C (carbono), H (hidrogênio) e N (nitrogênio) foi realizada em duplicata, sendo que para a primeira análise utilizou-se 2,903mg e a segunda 1,714mg os resultados e cálculos para a fórmula mínima são mostrados nas tabelas 10 e 11, respectivamente.

Tabela 15: Análise elementar de C, H e N para o composto L-Glutamato-Cu(II), os resultados estão em porcentagem e a massa utilizada foi 2,903mg.

Elemento	% de massa total	Nº
C	26,87 %	4,76
H	3,55 %	7,47
N	6,65 %	1,00
O(*)	30,40 %	4,00
Cu ⁺² (**)	32,53 %	1,00

Valores de % de massa total obtidos para o complexo de L-Glutamato-Cu(II) e Nº de átomos encontrados. (*) valor obtido teoricamente para oxigênio a partir dos cálculos das % de massa de C, H e N. (**) valor obtido teoricamente para o Cu⁺² a partir dos cálculos de % massa de C, H, N e O.

Tabela 16: Análise elementar de C, H e N para o composto L-Glutamato-Cu(II), os resultados estão em porcentagem e a massa utilizada foi 1,714mg.

Elemento	% de massa total	Nº
C	26,97 %	4,85
H	3,34 %	7,14
N	6,56 %	1,00
O(*)	29,98 %	4,00
Cu ⁺² (**)	33,15 %	1,00

Valores de % de massa total obtidos para o complexo de L-Glutamato-Cu(II) e Nº de átomos encontrados. (*) valor obtido teoricamente para oxigênio a partir dos cálculos das % de massa de C, H e N. (**) valor obtido teoricamente para o Cu⁺² a partir dos cálculos de % massa de C, H, N e O.

A análise elementar para o complexo L-Glutamato-Cu(II) foi satisfatória, sendo que os valores de porcentagem obtidos para o oxigênio e para, o cobre foram obtidos de maneira indireta utilizando-se os valores reais de carbono, hidrogênio e nitrogênio. Assim os valores encontrados para estes dois átomos não levou em consideração possíveis impurezas.

Contudo pode-se chegar a valores aproximados para cada átomo na molécula em questão os quais foram; cinco átomos de carbono, sete átomos de hidrogênio, um átomo de nitrogênio, quatro átomos de oxigênio e um átomo de cobre. Ilustração simplificada da possível configuração para o complexo metálico, figura 26 .

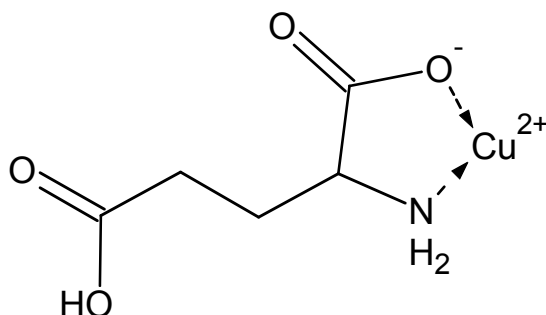


Figura 27: Possível estrutura para o complexo L-Glutamato-Cu(II).

5.1.7.2 Complexo L-Aspartato-Cu(II)

A análise elementar para C (carbono), H (hidrogênio) e N (nitrogênio) foi feita em duplicata, sendo que para a primeira análise utilizou-se 1,367mg e a segunda 1,362mg, tabelas 12 e 13, respectivamente.

Tabela 17: Análise elementar de C, H e N para o composto L-Aspartato-Cu(II), os resultados estão em porcentagem e a massa utilizada foi 1,367mg.

Elemento	% de massa total	Nº
C	22,20 %	3,41
H	3,63 %	7,35
N	6,91 %	1,00
O(*)	31,59 %	4,00
Cu⁺²(**)	35,67 %	1,14

Tabela 18: Análise elementar de C, H e N para o composto L-Aspartato-Cu(II), os resultados estão em porcentagem e a massa utilizada foi 1,362mg.

Elemento	% de massa total	Nº
C	20,09 %	3,38
H	3,57 %	7,11
N	7,02 %	1,00
O(*)	32,09 %	4,00
Cu ⁺² (**)	37,23 %	1,17

Valores de % de massa total obtidos para o complexo de L-Aspartato-Cu(II) e Nº de átomos encontrados. (*) valor obtido teoricamente para oxigênio a partir dos cálculos das % de massa de C, H e N. (**) valor obtido teoricamente para o Cu⁺² a partir dos cálculos de % massa de C, H, N e O.

A análise elementar para o complexo L-Aspartato-Cu(II) não foi de todo satisfatória visto que o valor encontrado para o nº de átomos de carbono é diferente do esperado. Contudo os outros valores para H, N, estão dentro do esperado além dos valores encontrados indiretamente para O, Cu. Sendo assim para tal complexo a determinação estrutural pode ser obtida, visto que o fato de impurezas e que o ligante o ácido L-aspartico tem facilidade para formar polímeros [57]. Desta maneira pode-se sugerir de maneira arbitrária o complexo para o L-Aspartato-Cu(II) conforme a figura 27.

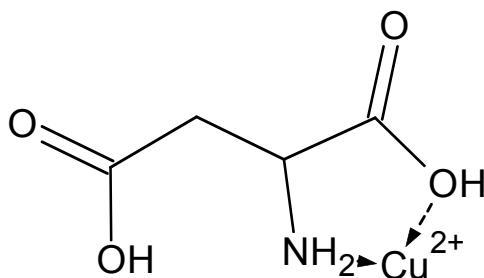


Figura 28: Arranjo molecular sugerido para o L-Aspartato-Cu(II)

5.1.7.3 Complexo L-Glutamato-Fe(III)

A análise elementar para C (carbono), H (hidrogênio) e N (nitrogênio) foi feita em duplicata, sendo que para a primeira análise utilizou-se 1,925mg e a segunda 1,536mg, tabelas 14 e 15, respectivamente.

Tabela 19: Análise elementar de C, H e N para o composto L-Glutamato-Fe(III), os resultados estão em porcentagem e a massa utilizada foi 1,925mg.

Elemento	% de massa total	Nº
C	18,94 %	2,71
H	3,86 %	6,42
N	8,41 %	1,00

O(*)	38,44 %	4,00
Fe ⁺³ (**)	30,35 %	0,90

Valores de % de massa total obtidos para o complexo de L-Glutamato-Fe(III) e N° de átomos encontrados. (*) valor obtido teoricamente para oxigênio a partir dos cálculos das % de massa de C, H e N. (**) valor obtido teoricamente para o Fe⁺³ a partir dos cálculos de % massa de C, H, N e O.

Tabela 20: Análise elementar de C, H e N para o composto L-Glutamato-Fe(III), os resultados estão em porcentagem e a massa utilizada foi 1,536mg.

Elemento	% de massa total	N°
C	18,83 %	2,75
H	3,66 %	6,18
N	8,28 %	1,00
O(*)	37,85 %	4,00
Fe ⁺³ (**)	31,38 %	0,95

Valores de % de massa total obtidos para o complexo de L-Glutamato-Fe(III) e N° de átomos encontrados. (*) valor obtido teoricamente para oxigênio a partir dos cálculos das % de massa de C, H e N. (**) valor obtido teoricamente para o Fe⁺³ a partir dos cálculos de % massa de C, H, N e O.

Para o complexo de L-Glutamato-Fe(III) não é possível encontra-se uma possível formação satisfatória, visto que os valores encontrados para o n° de átomos não condiz com o esperado. A possível explicação deve-se ao fato da presença de impurezas e/ou até mesmo a não formação do complexo esperado, sendo assim não é possível termos um arranjo satisfatório para esta amostra.

5.1.7.4 Complexo L-Aspartato-Fe(III)

A análise elementar para C (carbono), H (hidrogênio) e N (nitrogênio) foi feita em duplicata, sendo que para a primeira análise utilizou-se 2,192mg e a segunda 2,247mg, tabelas 16 e 17, respectivamente.

Tabela 21: Análise elementar de C, H e N para o composto L-Aspartato-Fe(III), os resultados estão em porcentagem e a massa utilizada foi 2,192mg.

Elemento	% de massa total	N°
C	22,14 %	2,93
H	4,05 %	6,42
N	8,81 %	1,00
O(*)	40,27 %	4,00
Fe ⁺³ (**)	24,73 %	0,70

Valores de % de massa total obtidos para o complexo de L-Aspartato-Fe(III) e N° de átomos encontrados. (*) valor obtido teoricamente para oxigênio a partir dos cálculos das % de massa de C, H e N. (**) valor obtido teoricamente para o Fe⁺³ a partir dos cálculos de % massa de C, H, N e O.

Tabela 22: Análise elementar de C, H e N para o composto L-Aspartato-Fe(III), os resultados estão em porcentagem e a massa utilizada foi 2,247mg.

Elemento	% de massa total	Nº
C	22,14 %	2,93
H	4,03 %	6,41
N	8,78 %	1,00
O(*)	40,13 %	4,00
Fe ⁺³ (**)	24,92 %	0,71

Valores de % de massa total obtidos para o complexo de L-Aspartato-Fe(III) e Nº de átomos encontrados. (*) valor obtido teoricamente para oxigênio a partir dos cálculos das % de massa de C, H e N. (**) valor obtido teoricamente para o Fe⁺³ a partir dos cálculos de % massa de C, H, N e O.

Para o complexo de L-Aspartato-Fe(III) não é possível encontra-se uma possível formação satisfatória, visto que os valores encontrados para o nº de átomos não condiz com o resultado esperado. A possível explicação deve-se ao fato da presença de impurezas e/ou até mesmo a não formação do complexo esperado, além da possível formação de polímeros [57], sendo assim não é possível termos um arranjo satisfatório para esta amostra.

5.2 Susceptibilidade de larvas de terceiro (3º) estágio de *Aedes aegypti* (linhagem Rockfeller; linhagem susceptível/não resistente)

Os resultados apresentados na Tabela 18 referem-se aos testes realizados em larvas de 3º estágio do *Aedes aegypti*, em uma linhagem susceptível, isto é, linhagem não resistente.

Tabela 23: Susceptibilidade de larvas de terceiro (3º) estágio de *Aedes aegypti* (linhagem Rockfeller) aos complexos de L-Glutamato-Cu(II), L-Glutamato-Fe(III) e L-Aspartato-Cu(II), L-Aspartato-Fe(III), concentrações estão em ppm (mg/L).

Complexos	CL10	CL50	CL90
L-Glutamato-Cu(II)	6,75 (±0,21)	53,40 (±0,21)	423,50 (±0,21)
L-Glutamato-Fe(III)	392,00 (±0,27)	1.247,42 (±0,27)	3.780,06 (±0,27)
L-Aspartato-Cu(II)	31,42 (±0,46)	100,25 (±0,46)	319,82 (±0,46)
L-Aspartato-Fe(III)	1.199,61 (±0,48)	3.415,48 (±0,48)	9.724,42 (±0,48)

Concentrações letais (CLs) obtidas através do programa Polo-PC (LeOra Software, 1987).

As concentrações letais, CL10, CL50 e CL90, foram obtidas através do programa POLO-PC, sendo que a CL50 é de suma importância visto que nesta concentração o desvio padrão é menor e é onde esta a maioria da população estudada.

Estes resultados mostraram que os compostos de Cu(II) são mais tóxicos que os compostos de Fe(III), e que o complexo de glutamato é mais tóxico para as larvas de terceiro estágio que o complexo de aspartato. A diferença entre os complexos testados deve-se, provavelmente, a alguns fatores, o primeiro é o que se refere ao metal, estrutura e toxicidade, visto que o cobre é mais tóxico em relação ao ferro. Sendo que, o *A. aegypti* o intestino possui uma matriz peritrofica, proteínas são da classe das peritrofinas. Estas proteínas recobrem toda superfície interna do epitélio intestinal funcionando como uma barreira a qual impede que o excesso de ferro seja absorvido, este excesso é liberado nas fezes [43] [58].

Outro fator está relacionado à lipossolubilidade da molécula que é a capacidade da molécula de dissolver-se em meio lipídico. No organismo esta característica tem importância vital, sendo que as células possuem uma camada chamada de membrana plasmática que é composta majoritariamente por uma camada lipídica [59], principalmente se o mecanismo de toxicidade envolver a permeação celular, preferencialmente, via canais de iônicos, Na^+ e K^+ .

Sendo assim, o L-glutamato possui maior lipossolubilidade em relação ao L-aspartato esta diferença de solubilidade poderia ser utilizada para a permeação mais eficiente da membrana celular e maior facilidade em transportar os metais complexados mais facilmente, permitindo que estes metais induzissem o estresse oxidativo. O meio extracelular possui caráter oxidante e o meio intracelular caráter redutor, que poderia facilitar a reação de estresse oxidativo.

Com base na titulação potenciométrica, do espectro visível e nos ensaios descrito por Gaban [2], pode-se sugerir onde há uma maior absorção do complexo L-Glutamato-Cu(II). Sabe-se que no intestino médio do inseto o pH está em torno de 8-10 [54] e que neste intervalo de pH o ligante está em uma forma estrutural onde todos os prótons possíveis foram liberados teremos uma carga neutra para tal complexo, isto significa que nesta região intestinal haverá uma maior permeação do composto pela membrana celular com base no que foi descrito anteriormente. Contudo não se pode afirmar que este seja o único local onde o complexo é absorvido ou o único mecanismo de absorção e/ou internalização. Para melhor entendimento a figura 26 mostra como é o provável arranjo molecular para o complexo em pH 10, para o L-Glutamato-Cu(II).

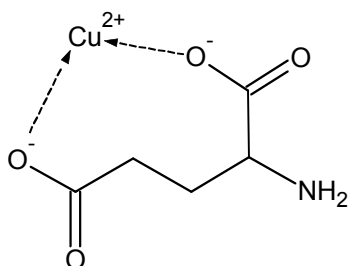


Figura 29: Complexo L-Glutamato-Cu(II) em pH10, carga elétrica neutra

5.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) para bactérias Gram-positiva(+) e Gram-negativa(-)

A diferença entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas esta ligada quanto a sua parede celular. A primeira possui uma única parede constituída por peptidoglicano, a segunda possui três paredes constituídas, por membrana externa composta de polissacarídeos, a segunda camada peptidoglicano e a terceira por fosfolipídios. Esta característica confere a bactéria Gram-negativa uma maior resistência a antibióticos e a permeação [60]. Os testes de concentração inibitória mínima visa determinar quanto a toxicidade dos complexos bioativos em relação as bactérias, *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 Gram-positiva, *Escherichia coli* ATCC-25922 Gram-negativa, tabela 19.

Tabela 24: Concentração inibitória mínima para *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 Gram-positiva, *Escherichia coli* ATCC-25922 Gram-negativa. As concentrações em ppm (mg/L).

Complexos	<i>Staphylococcus aureus</i> (ppm)	<i>Escherichia coli</i> (ppm)
L-Glutamato-Cu(II)	500	2.000
L-Glutamato-Fe(III)	não houve inibição	não houve inibição
L-Aspartato-Cu(II)	1.000	2.000
L-Aspartato-Fe(III)	8.000	não houve inibição
Acido L-Glutâmico	4.000	8.000
Acido L-Aspártico	não houve inibição	8.000
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	31,25	não houve inibição
Cu(NO ₃) ₂ .3H ₂ O	1.000	2.000

A solução estoque (SE) usada foi de 8.000 ppm para complexos de Fe(III); para complexos de Cu(II) a solução estoque (SE) foi de 4.000 ppm

A importância dos experimentos é a análise da atividade biológica dos complexos metálicos baseados em aminoácidos-Cu(II) no que se refere à inibição das bactérias e/ou microrganismos em meio aquoso. Este fator pode ser utilizado de modo secundário para controle da microflora/microbiota bacteriana do criadouro, visto que as fêmeas do *Aedes aegypti* tem preferência por locais de oviposição onde há uma flora bacteriana presente [23], além da importância desta para cadeia alimentar das larvas e a sugerida atratividade aos criadouros por liberação de substâncias voláteis. O controle de microrganismos nos criadouros pode impor condições desfavoráveis a oviposição, eclosão dos ovos, desenvolvimento das larvas e emergência do inseto adulto. Este controle é essencial para o manejo do inseto visto que o local de oviposição deve oferecer condições favoráveis para o desenvolvimento larval, todavia se os

complexos testados interferirem significativamente neste local a fêmea irá procurar outros locais para ovipositar e assim poderá impor condições desfavoráveis, que poderá contribuir para o controle populacional do inseto ou ainda afastá-lo das residências. Assim, pode-se ver pelos resultados obtidos entre os dados de susceptibilidade e concentração inibitória mínima para bactérias que os complexos testados não iram interferir significativamente na oviposição das fêmeas, mas ainda poderão interferir no desenvolvimento do inseto na reprodução.

6. CONCLUSÕES

Os compostos de coordenação de Cu(II) e Fe(III) com ácido L-Glutâmico e ácido L-Aspártico foram sintetizados, isolados, caracterizados pela atividade inseticida/larvicida e bactericida. Os resultados mostraram que o L-Glutamato-Cu(II), L-Glutamato-Fe(III), L-Aspartato-Cu(II) e L-Asparto-Fe(III) possuem atividade biológica diferenciada para larvas (forma imatura) do *A. aegypti*. Os estudos revelaram que a atividade inseticida/larvicida e bactericida do L-Glutamato-Cu(II), L-Glutamato-Fe(III), L-Aspartato-Cu(II) e L-Asparto-Fe(III) são diferenciadas para larvas de terceiro (3º) estágio de *A. aegypti* e bactérias Gram-negativas e Gram-positivas testadas. Os complexos metálicos de Cu(II) podem ser propostos como ativos larvicidas que utilizam o metabolismo do inseto para geração de espécies tóxicas a partir da labilidade dos complexos metálicos no intervalo de pH do sistema digestório (SD) para desencadeamento “*in situ*” das reações de estresse oxidativo e indução danos celulares e morte do inseto. Os complexos metálicos (metalo-inseticidas) podem ser utilizados para o manejo do *A. aegypti* e controle de microorganismos presentes nos criadouros afetando a atratividade para oviposição, imposição de condições desfavoráveis à cadeia alimentar, eclosão dos ovos, e desenvolvimento larval do inseto, além da baixa toxicidade para humanos e ambiente devido a possibilidade de reciclagem e indisposição das espécies por vegetais, material orgânico do solo e microorganismos. Outros estudos devem ser realizados e propostos utilizando estes metalo-inseticidas para análise da viabilidade e interferência na eclosão dos ovos do inseto, pode-se também avaliar o manejo de outros insetos com ciclo reprodutivo semelhante, análise dos efeitos residuais sobre plantas, estudos de resistência ao metalo-inseticida por gerações, pesquisas no campo neurológico visto que o cobre, aspartato e glutamato podem causar doenças neurodegenerativas como Alzheimer, efeito bactericida para demais agentes patológicos visto que há um crescente aumento na resistência a antibióticos.

7. REFERÊNCIAS

- [1] VIDAL, J.; CARBAJAL, A.; SISNIEGAS, M.; BOBADILLA, M. Efecto tóxico de *Argemone subfusiformis* Ownb. Y *Tagetes patula* link sobre larvas del IV estadio y pupas de *Aedes aegypti* L. *Rev. Peru biol.* 2009, 15(2); 103-109.
- [2] GABAN, C.R.G. Avaliação das alterações do sistema digestório de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) causadas pelo íon Cu^{+2} complexado com EDTA. (2009). Dissertação (Mestrado em Programa de Mestrado em Biotecnologia - MBiotec) - MSMT - UCDB / Programa de Mestrado em Biotecnologia, FUNDECT. 63p. *Orientador*: Eduardo José de Arruda
- [3] Organización Panamericana de La Salud. Dengue y dengue hemorrágico em Las Américas: Guías para su prevención y control. *Washington, DC*. OPS; 1995
- [4] WHO. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. *World Health Organization*. WHO/HTM/NTD/DEN/2009.
- [5] GUBLER, D. The emergence of epidemic dengue fever and dengue hemorrhagic fever in the Americas: a case of failed public health policy. *Rev. Panam Salud Publica.* 2005, 17; 221-224.
- [6] WHO. Number of reported cases of dengue and severe dengue (SD) in the Americas, by country: figures for 2013. *World Health Organization*. 2013.
- [7] SES/MS. Boletim Epidemiológico nº 15 – Dengue – Semana 1 a 16 de 2013. *Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso do Sul*. 2013
- [8] BRAGA, I.A; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência / *Aedes aegypti*: insecticides, mechanisms of action and resistance. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 2007, 16(4); 279-293.
- [9] BLOOMQUIST, J.R. Ion channel as targets for insecticides. *An. Rev. Entomol.* 1996, 41; 163-190.
- [10] DOWSON, R. J. An introduction to the principles of neurophysiology. *Pestic. Sci.* 1977, 8; 651-660.

- [11] ETO, M. Biochemical mechanisms of insecticidal activities, pp. 67-68. In *Chemistry of Plant Protection*, vol. 6, Berlin, Spring-Verlag, 1990.
- [12] GUEDES, R. N. C. & VILELA, E. F. 1991. Produtos com ação na fisiologia dos insetos, pp. 37-90. In *Novos Produtos para o Manejo Integrado de Pragas*, E. F. Vilela et al. (ed.), Brasília, ABEAS. (Módulo 4.7).
- [13] WILKE A.B.B., GOMES A.C., NATAL D., MARELLI M.T. Controle de vetores utilizando mosquitos geneticamente modificados. *Rev. Saúde Pública*. 2009, 54(5); 869-874.
- [14] ARRUDA, E.J. *et al.* Evaluation of Toxic Effects with Transition Metal Ions, EDTA, SBTI and Acrylic Polymers on *Aedes aegypti*(L.,1762) (Culicidae) and *Artemia salina* (Artemidae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2011, 54(3); 506-509.
- [15] WHO – World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides: *WHO-VBC 81.807*. 1981; 1-6.
- [16] NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A3, 2nd ed. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Villanova, Pa. 1993.
- [17] BARTH, O.M. Ultra structural aspects of the dengue virus (flavivirus) particle morphogenesis. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*.1999, 31; 404-412.
- [18] COSTA, A.C.; SANTOS, I.G.C.; BARBOSA, M.G. Detecção e tipagem de vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*) na cidade de Manaus, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2009, 42(6); 677-681.
- [19] RODHAIN, F.; ROSEN, L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.) *Dengue and dengue haemorrhagic fever*. New York: CAB International, 1997, 45-60.
- [20] NELSON, M.J. *Aedes aegypti*: biologia y ecologia. Washington, DC, *Organización Panamericana de La Salud*. 1986.

- [21] CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, J.N.S. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. *Fiocruz*. 1994.
- [22] FORATINI, O.P.; BRITO, M. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. *Rev. Saúde Pública*. 2003, 37(5); 676-677.
- [23] PONNUSAMY, L.; XU, N.; NOJIMA, S.; WESSON, D.M.; SCHAL, C., APPERSON, C.S. Identification of bacteria and bacteria-associated chemical cues that mediate oviposition site preferences by *Aedes aegypti*. *PNAS*. 2008, 105(27); 9262-9267.
- [24] FUNASA. Dengue, instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. *Fundação Nacional da Saúde, Ministério da Saúde*. 2001, 3º ed.
- [25] COSTA, A.C.; SANTOS, I.G.C.; BARBOSA, M.G. Detecção e tipagem de vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*) na cidade de Manaus, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2009, 42(6); 677-681.
- [26] JONES, D.P. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006, 8(9-10); 1865-1879.
- [27] VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; BENFATO, M.S.; MANFREDINI, V.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova*. 2007, 30(5); 1323-1338.
- [28] WINGE, D.R.; MEHRA, R.K. Host defenses against copper toxicity. ***International Review of Experimental Pathology***. 1990, 31; 47-83.
- [29] BULL, P.C.; COX, D.W. Wilson Disease and Menkes Disease: New Handles on heavy metal transport. *Trends Genetics*. 1994, 10; 130-140.
- [30] MERCER, J.F.B. Menkes syndrome and animals models. ***American Journal of Clinical Nutrition***. 1998, 67; 1022S-1028S.

[31] SCHEINBERG, I.H.; STERNLIEB, I. Wilson disease and idiopathic copper toxicosis. [*American Journal of Clinical Nutrition*](#). 1996, 63; 842S-845S.

[32] TAMPO, Y., et al. Oxidative Stress–Induced Iron Signaling Is Responsible for Peroxide-Dependent Oxidation of Dichlorodihydrofluorescein in Endothelial Cells. *Circulation Research*. 2003, 10(24); 56-63.

[33] SADRZADEH, S.M.; SAFFARI, Y. Iron and brain disorders. [*American Journal of Clinical Pathology*](#). 2004, 121; 64-70.

[34] CHAN, C.S.; FAKARA, S.C.; EDWARDS, D.C.; EMERSON, D.; BANDFIELD, J.F. Iron oxyhydroxide mineralization on microbial extracellular polysaccharides. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2009, 73; 3807–3818.

[35] VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. 2005, 12; 1161-1208.

[36] CASANUEVA, E.; VITERI, F.E. Iron and oxidative stress in pregnancy. *The Journal of Nutrition*. 2003, 133; 1700S-1708S.

[37] WEED, R.I.; REED, C.F.; BERG, G. Is Hemoglobin an essential structural component of human erythrocyte membranes? *Journal of Clinical Investigation*. 1963, 42; 581-588.

[38] BEARD, J. Iron deficiency alters brain development and functioning. *The Journal of Nutrition*. 2003, 133; 1498S-1472S.

[39] LIN, H.; LI, L.; JIA, X.; WARD, D. M.; KAPLAN, J. Genetic and biochemical analysis of high iron toxicity in yeast: Iron toxicity is due to the accumulation of cytosolic iron and occurs under both aerobic and anaerobic conditions. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011, 286; 3851-3862.

[40] ANDREWS, N.C. Disorders of iron metabolism. *The New England Journal of Medicine*. 1999, 341; 1986-1995.

- [41] GRAÇA-SOUZA, A.V.; MAYA-MONTEIRO, C.; PAIVA-SILVA, G.O.; BRAZ, G.R.C.; PAES, M.C.; SORGINE M.H.F.; OLIVEIRA, M.F.; OLIVEIRA, P.L. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2006, 36; 322–335.
- [42] OLIVEIRA, J.H.M.; et 66L. Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. *PLoS Pathog*. 2011, 7; 1-14.
- [43] PEREIRA, L.O.; OLIVEIRA P.L.; ALMEIDA I.C.; PAIVA-SILVA, G.O. Biglutaminylbiliverdin IX alpha as a heme degradation product in the dengue fever insect-vector *Aedes aegypti*. *Biochemistry*. 2007, 46; 6822-6829.
- [44] VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C.J.; TELSER, J. **Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence**. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004, 266; 37-56.
- [45] GUTTERIDGE, J.M.C.; SMITH, A. Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid. Peroxidation. *Biochem. J*. 1988, 256; 861-865.
- [46] MOLINA, S.M.G., et al. Manipulação de cereais para acúmulo de lisina em sementes. *Sci. Agric*. 2001, 58(1); 205-211.
- [47] BREMNER, I. Manifestation of copper excess. [American Journal of Clinical Nutrition](#). 1998, 67; 1069s-1073S.
- [48] POWELL, S.R. The Antioxidant Properties of Zinc. *Journal Nutrition*. 2000, 130; 1447S-1454S.
- [49] COLE, L.M.; NICHOLSON, R.A.; CASIDA, J.E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pesticide of Biochemistry Physiology*. 1993, 46; 47–54.
- [50] HARDMAN, J.G.; LIMBIRD L.E.; GILMAN, A.G. Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th ed. New York: *MCGraw-Hill Medical Publishing Division*; 2001.

- [51] MACDONALD, J.F.; MORRIS, M.E. Lathyrus excitotoxin: mechanism of neuronal excitation by L-2-oxalylamino-3-amino- and L-3-oxalylamino-2-aminopropionic acid. *Exp. Brain Res.* 1985, 57; 158-166.
- [52] BARAN, E. J., W. C., TORRE M. H., KREMER E., KOGERLER, P. Vibrational Spectra of the Cu(II) complexes of aspartic and glutamic acids. *Acta Farm. Bonaerense.* 2000, 19(3); 231-4.
- [53] PREVIDELLO, B. A., et al. O pK_a de indicadores acido-base e os efeitos de sistemas colodais. *Quim. Nova.* 2006, 29(3); 600-606.
- [54] DADD, R. H., Alkaline within the midgut of mosquito larvae with alkaline-active digestive enzymes. *J. Insect Physiol.* 1975, 21; 1847-1853.
- [55] AFONSO, J. C., NORONHA, L. A., FELIPE, R. P., FREIDINGER, N. Gerenciamento de resíduos laboratoriais: recuperação de elementos e preparo para descarte final. *Quimica Nova*, 2003, 26(4); 602-611.
- [56] PRASETYO, E. Simple method of copper analysis using monosodium glutamate and its application in ore analysis. *Mineralogical Society of Poland.* 2012, 43(3-4); 3-12.
- [57] WHEELER, A.P., KOSKAN, L.P. "Large Scale Thermally Synthesized Polyaspartate as a Substitute in Polymer Applications", *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 1993, 292; 277-283.
- [58] DEVENPORT, M.; ALVARENGA, P.H.; SHAO, L.; FUJIOKA, H.; BIANCONI, M.L.; OLIVEIRA, P.L.; JACOBS-LORENA, M. Identification of the *Aedes aegypti* peritrophic matrix protein AelMUC1 as a heme-binding protein. *Biochemistry.* 2006, 45(31); 9540-9549.
- [59] ROBERTS, F.; TURNER, D.F. Pharmacokinetics and anaesthesia. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain.* 2007, 7(1); 25-29.
- [60] SALLE, A. J. B.S. Fundamental Principles of Bacteriology. New York: *McGraw-Hill Book Company*, 1961. 812p.

8. ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 8 de março de 2013

Senhor Pesquisador:

Thiago Americo Dinizz Rodrigues

O Projeto de sua responsabilidade – Protocolo nº. **029/2012 – CEUA/UGD** - intitulado **"Síntese e caracterização de novos inseticidas/bioativos para controle populacional de formas imaturas de *Aedes aegypti*"**, foi integralmente **APROVADO** e poderá ser conduzido.

Ressaltamos que é de responsabilidade do (a) pesquisador (a) envio de notificação à CEUA sobre o término do projeto.

Felipe de Almeida Borges
Secretário CEUA/UGD

Felipe de Almeida Borges
Assistente em Administração
SIAPE - 1069836