

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UMA  
COLEÇÃO DE AMIDAS**

Thaís Corrêa Castral\*

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
MESTRE EM QUÍMICA (área  
QUÍMICA ORGÂNICA).

Orientadora: Profa. Dra. Arlene G. Corrêa

\*Bolsista CAPES

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C355sa

Castral, Thaís Corrêa.

Síntese e avaliação biológica de uma coleção de amidas /  
Victor Ribeiro Neves. -- São Carlos : UFSCar, 2008  
136 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2006.

1. Síntese orgânica. 2. Spodoptera frugiperda. 3. Química  
combinatória. 4. Piperamidas. I. Título.

CDD: 547.2 (20<sup>a</sup>)

**ESTA DISSERTAÇÃO  
É UMA HOMENÁGEM A MEUS PAIS**

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Arlene Gonçalves Corrêa pela orientação, incentivo, amizade, carinho e exemplo para todo químico de caráter e ética profissional.

Aos meus pais, pela oportunidade de estudar, de ter uma profissão, pelo amor recebido, pelo carinho, enfim, muito obrigada por tudo que vocês fizeram e fazem por mim... amo vocês!

À Andréia e a Luciane, pela ajuda com os bioensaios, sempre prestativas e animadas, mesmo em sábados, domingos, feriados....Muito Obrigada!

À Fernanda, pela imensa ajuda, sempre me ensinando e colaborando de todas as formas....não só na química como na vida. Menina, obrigada pela amizade!

Aos meus amigos do laboratório, Nádia, Paty, Joel, e especialmente a Bruna, que me ajudou com os espectros e muitas outras informações de última hora, à distância. Foi muito bom conviver com vocês esses anos todos.

A todos os alunos do Laboratório de Síntese de Produtos Naturais.

Ao corpo técnico do DQ-UFSCar, em especial ao Valdir Vaz, por todas as ajudas no laboratório durante esses anos todos e também pela amizade.

A todos os professores do departamento, pelos conhecimentos transmitidos, especialmente a Profa. Maria de Fátima G. F. da Silva pelo incentivo na hora mais difícil e ao Prof. Edson Rodrigues Filho, pela ajuda com os espectros de massas.

À Viviane, uma amiga companheira, sempre incentivando e dando força. À Patrícia Braga, pela amizade conquistada nesses últimos tempos e pelos sábios conselhos. Aos meus amigos da T&E, em especial a Thais Regina.

Ao Centro de Estudo de Insetos Sociais da Unesp – Rio Claro pela colaboração nos bioensaios com formiga cortadeira.

À Entomologia da ESALQ – Piracicaba por ceder as lagartas de *S. frugiperda*.

À T&E Analítica, pela disponibilização do CG/EM.

À minha Vó, minha irmã, Thaíla, e ao Beto. Em especial ao Bruno como um incentivo para sua vida. Ao Othon, que me incentiva, ajuda, compreende, apóia, enfim, a minha felicidade em forma de gente.

À CAPES, pela bolsa concedida.

A todos que estiveram comigo nesses anos... obrigada!

# **Lista de Abreviaturas**

abund.	abundância
CG	cromatografia gasosa
E.M.	espectrometria de massas
I.V.	infravermelho
J	constante de acoplamento
<i>m/z</i>	relação massa carga
RMN <sup>1</sup> H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	ressonância magnética nuclear de carbono
δ	deslocamento químico
DL	dose letal
S	sobrevivência
MDF	metilendioxifenil
p.f.	ponto de fusão

## **Lista de Tabelas**

---

<b>Tabela 1:</b> Aminas utilizadas na síntese das amidas <b>7-12</b>	<b>13</b>
<b>Tabela 2:</b> Resultados de DL <sub>50</sub>	<b>14</b>
<b>Tabela 3:</b> Aminas utilizadas na síntese das amidas modificadas na porção A	<b>17</b>
<b>Tabela 4:</b> Resultados de DL <sub>50</sub> para as amidas sintetizadas <b>24-35</b>	<b>18</b>
<b>Tabela 5:</b> Resultados obtidos para o fungo <i>C. sphaerospermum</i>	<b>20</b>
<b>Tabela 6:</b> Resultados obtidos para o fungo <i>C. cladosporioides</i>	<b>21</b>
<b>Tabela 7:</b> Aminas utilizadas na síntese das amidas <b>51 a-p</b>	<b>23</b>
<b>Tabela 8:</b> Comparação de tempo e custo entre síntese clássica e combinatória	<b>25</b>
<b>Tabela 9:</b> Amidas sintetizadas via síntese clássica	<b>36</b>
<b>Tabela 10:</b> Resultados obtidos para o teste de toxicidade por contato das amidas (70 µg/mg larva) frente a larvas recém eclodidas de <i>S. frugiperda</i>	<b>38</b>
<b>Tabela 11:</b> Valores de DL <sub>50</sub> frente a <i>S. frugiperda</i> (larvas de segundo ínstar) obtidos para as amidas no ensaio tópico	<b>39</b>
<b>Tabela 12:</b> Resultado de bioensaio com fungo simbiote	<b>44</b>
<b>Tabela 13:</b> Resultado do bioensaio frente às formigas cortadeiras	<b>45</b>
<b>Tabela 14:</b> Cloretos de ácidos utilizados na síntese da coleção combinatória	<b>49</b>
<b>Tabela 15:</b> Aminas utilizadas na síntese da coleção combinatória	<b>50</b>
<b>Tabela 16:</b> Estratégia de análise de uma coleção combinatória indexada em bioensaio	<b>51</b>
<b>Tabela 17:</b> Amidas identificadas na coleção A <sup>3</sup> B <sup>1-10</sup>	<b>58</b>
<b>Tabela 18:</b> Amidas identificadas A <sup>4</sup> B <sup>1-10</sup>	<b>62</b>
<b>Tabela 19:</b> Amidas identificadas A <sup>5</sup> B <sup>1-10</sup>	<b>64</b>
<b>Tabela 20:</b> Amidas identificadas A <sup>6</sup> B <sup>1-10</sup>	<b>66</b>
<b>Tabela 21:</b> Amidas identificadas na coleção A <sup>7</sup> B <sup>1-10</sup>	<b>68</b>
<b>Tabela 22:</b> Amidas identificadas na coleção A <sup>8</sup> B <sup>1-10</sup>	<b>70</b>



<b>Tabela 23:</b> Amidas identificadas na coleção $A^9B^{1-10}$	<b>73</b>
<b>Tabela 24:</b> Amidas identificadas na coleção $A^{10}B^{1-10}$	<b>76</b>
<b>Tabela 25:</b> Amidas formadas na coleção $B^1A^{1-10}$	<b>78</b>
<b>Tabela 26:</b> Amidas formadas na coleção $B^2A^{1-10}$	<b>80</b>
<b>Tabela 27:</b> Amidas formadas na coleção $B^3A^{1-10}$	<b>82</b>
<b>Tabela 28:</b> Amidas formadas na coleção $B^4A^{1-10}$	<b>84</b>
<b>Tabela 29:</b> Amidas formadas na coleção $B^5A^{1-10}$	<b>86</b>
<b>Tabela 30:</b> Amidas formadas na coleção $B^6A^{1-10}$	<b>88</b>
<b>Tabela 31:</b> Amidas formadas na coleção $B^7A^{1-10}$	<b>90</b>
<b>Tabela 32:</b> Amidas formadas na coleção $B^8A^{1-10}$	<b>92</b>
<b>Tabela 33:</b> Amidas formadas na coleção $B^9A^{1-10}$	<b>93</b>
<b>Tabela 34:</b> Amidas formadas na coleção $B^{10}A^{1-10}$	<b>95</b>
<b>Tabela 35:</b> Análise esquemática dos resultados de bioensaio para as coleções	<b>98</b>
<b>Tabela 36:</b> Resultado obtido no bioensaio realizado com a coleção de amidas frente a larvas de segundo ínstar de <i>S. frugiperda</i>	<b>99</b>
<b>Tabela 37:</b> Valor do $DL_{50}$ obtido para a amida $A^8B^1$ frente a <i>S. frugiperda</i>	<b>101</b>
<b>Tabela 38:</b> Mortalidade causada pela amida $A^8B^1$ em diversas concentrações, frente a lagartas de segundo instar de <i>S. frugiperda</i>	<b>101</b>
<b>Tabela 39:</b> Quantidades dos reagentes utilizados na síntese das amidas 65-75	<b>109</b>
<b>Tabela 40:</b> Quantidades dos reagentes utilizados na preparação dos ácidos	<b>117</b>
<b>Tabela 41:</b> Quantidades utilizadas nas reações de formação de cloreto de ácido	<b>118</b>
<b>Tabela 42:</b> Volume de aminas utilizadas na preparação das coleções combinatórias derivadas dos ácidos $A^{1-10}$	<b>119</b>
<b>Tabela 43:</b> Massa dos cloretos de ácido utilizados na preparação das coleções combinatórias derivadas das aminas $B^{1-10}$	<b>123</b>

# **Lista de Figuras**

<b>Figura 1:</b> Formiga cortadeira <i>Atta sexdens</i> e seu fungo simbiote	4
<b>Figura 2:</b> Lagarta-do-cartucho-do-milho, <i>Spodoptera frugiperda</i> . a) Cultura atacada (folhas). b) Milho atacado. c) Mariposas. d) Lagarta adulta. e) Postura de ovos. f) Lagartas recém eclodidas.	6
<b>Figura 3:</b> Piperina	9
<b>Figura 4:</b> Pipsaeedina (2) e pipbinina (3)	12
<b>Figura 5:</b> Butóxido de Piperonila	14
<b>Figura 6:</b> Estrutura da piperida (13)	15
<b>Figura 7:</b> Pellitorina (16)	16
<b>Figura 8:</b> Comparação entre a estrutura dos compostos 14 e 16	16
<b>Figura 9:</b> Amidas sintetizadas com alterações na porção C da molécula	18
<b>Figura 10:</b> Compostos isolados de <i>P. arboreum</i> e <i>P. tuberculatum</i>	20
<b>Figura 11:</b> Síntese clássica em comparação com a síntese combinatória	25
<b>Figura 12:</b> Duração Média (dias) da fase larval, pupal e do ciclo total de <i>S. frugiperda</i> após ingestão da amida 55 via dieta artificial.	40
<b>Figura 13:</b> Peso médio das pupas após ingestão da amida 55 via dieta artificial.	41
<b>Figura 14:</b> Mortalidade (%) na fase larval, pupal e no ciclo completo.	41
<b>Figura 15:</b> Experimento para avaliar a atividade inibitória das amidas no fungo <i>L. gongylophorus</i>	43
<b>Figura 16:</b> Diversidade dos cloretos de ácidos utilizados.	48
<b>Figura 17:</b> Cromatograma referente à mistura $A^1B^{1-10}$	54
<b>Figura 18:</b> Espectro de massas da amida $A^1B^8$ , tempo de retenção aproximado de 7,9 min.	54
<b>Figura 19:</b> Espectro de massas da amida $A^2B^8$	55

<b>Figura 20:</b> Espectro de massas da amida $A^2B^{1-10}$	<b>56</b>
<b>Figura 21:</b> Cromatograma da mistura $A^3B^{1-10}$	<b>57</b>
<b>Figura 22:</b> Espectro de massas da amida $A^3B^3$	<b>59</b>
<b>Figura 23:</b> Amidas $A^3B^9$ e $A^3B^6$	<b>60</b>
<b>Figura 24:</b> Cromatograma referente à mistura $A^4B^{1-10}$ .	<b>62</b>
<b>Figura 25:</b> Espectro de massas da amida $A^4B^1$ .	<b>63</b>
<b>Figura 26:</b> Cromatograma da mistura $A^5B^{1-10}$	<b>64</b>
<b>Figura 27:</b> Espectro de massas da amida $A^5B^{10}$	<b>65</b>
<b>Figura 28:</b> Cromatograma característico da mistura $A^6B^{1-10}$	<b>66</b>
<b>Figura 29:</b> Espectro de Massas referente a amida $A^6B^8$	<b>67</b>
<b>Figura 30:</b> Cromatograma da mistura $A^7B^{1-10}$	<b>68</b>
<b>Figura 31:</b> Espectro de massas da amida $A^7B^7$	<b>69</b>
<b>Figura 32:</b> Cromatograma referente à mistura $A^8B^{1-10}$	<b>70</b>
<b>Figura 33:</b> Espectro de Massas da amida $A^8B^3$	<b>71</b>
<b>Figura 34:</b> Espectro de Massas da amida $A^8B^{10}$	<b>72</b>
<b>Figura 35:</b> Cromatograma referente à coleção $A^9B^{1-10}$	<b>73</b>
<b>Figura 36:</b> Espectro de massas referente à amida $A^9B^6$	<b>74</b>
<b>Figura 37:</b> Cromatograma da mistura $A^{10}B^{1-10}$	<b>75</b>
<b>Figura 38:</b> Espectro de massas da amida $A^{10}B^7$	<b>77</b>
<b>Figura 39:</b> Cromatograma referente à coleção $B^1A^{1-10}$	<b>78</b>
<b>Figura 40:</b> Espectro de massas da amida $B^1A^8$	<b>79</b>
<b>Figura 41:</b> Cromatograma referente à mistura $B^2A^{1-10}$	<b>80</b>
<b>Figura 42:</b> Espectro de Massas referente à amida $B^2A^5$ .	<b>81</b>
<b>Figura 43:</b> Cromatograma referente à mistura $B^3A^{1-10}$	<b>82</b>
<b>Figura 44:</b> Espectro de Massas referente à mistura $B^3A^3$	<b>83</b>
<b>Figura 45:</b> Cromatograma referente à amida $B^4A^{1-10}$	<b>85</b>

<b>Figura 46:</b> Espectro de massas da amida B <sup>4</sup> A <sup>3</sup>	<b>85</b>
<b>Figura 47:</b> Cromatograma referente à amida B <sup>5</sup> A <sup>1-10</sup>	<b>87</b>
<b>Figura 48:</b> Espectro de massas referente à amida B <sup>5</sup> A <sup>5</sup>	<b>87</b>
<b>Figura 49:</b> Cromatograma referente à mistura B <sup>6</sup> A <sup>1-10</sup>	<b>88</b>
<b>Figura 50:</b> Espectro de massas referente à amida B <sup>6</sup> A <sup>5</sup>	<b>89</b>
<b>Figura 51:</b> Cromatograma referente à coleção B <sup>7</sup> A <sup>1-10</sup>	<b>90</b>
<b>Figura 52:</b> Espectro de massas referente à amida B <sup>7</sup> A <sup>5</sup>	<b>91</b>
<b>Figura 53:</b> Cromatograma referente à mistura B <sup>8</sup> A <sup>1-10</sup>	<b>92</b>
<b>Figura 54:</b> Espectro de massas referente à mistura B <sup>8</sup> A <sup>7</sup>	<b>93</b>
<b>Figura 55:</b> Cromatograma referente à coleção B <sup>9</sup> A <sup>1-10</sup>	<b>94</b>
<b>Figura 56:</b> Espectro de massas referente à amida B <sup>9</sup> A <sup>5</sup>	<b>95</b>
<b>Figura 57:</b> Cromatograma referente à coleção B <sup>10</sup> A <sup>1-10</sup>	<b>96</b>
<b>Figura 58:</b> Espectro de massas referente à amida B <sup>10</sup> A <sup>9</sup>	<b>97</b>

# **Resumo**

## Resumo

Este trabalho teve como objetivo a síntese de amidas derivadas do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico e avaliação das suas atividades biológicas frente à lagarta do cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda*, e a formiga cortadeira, *Atta sexdens rubropilosa*, e seu fungo simbiote, *Leucoagaricus gongylophorus*. A amida mais ativa frente a *S. frugiperda* foi a N,N-(piperidina)-3-(3',4'-metilenodioxifenil)-2-(E)-propenamida (**65**), com  $DL_{50}=1.07 \mu\text{g}/\text{mg}$  larva. Já em relação ao fungo simbiote, os compostos mais ativos foram as amidas **65** e N,N-(dietil)-3-(3',4'-metilenodioxifenil)-2-(E)-propenamida (**66**). Quanto às formigas, os compostos mais ativos foram N,N-(pirrolidina)-3-(3',4'-metilenodioxifenil)-2-(E)-propenamida (**67**) e N,N-(benzil)-3-(3',4'-metilenodioxifenil)-2-(E)-propenamida (**72**). Em virtude da atividade promissora observada para esses compostos, propôs-se a continuação do estudo a fim de se obter informações a respeito da relação estrutura-atividade para esses compostos frente a *S. frugiperda*.

A estratégia utilizada para dinamizar o processo sintético foi a química combinatória. Realizou-se a síntese em solução de uma coleção combinatória indexada de piperamidas, a qual foi caracterizada por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) e avaliada frente a *S. frugiperda*. Dentre os compostos sintetizados em mistura, a 1-[(4-(trifluormetoxi)benzoil]piperidina, **A<sup>8</sup>B<sup>1</sup>**, foi a que apresentou maior atividade, porém com um  $DL_{50}$  de  $8,15 \mu\text{g}/\text{mg}$  de larva, ou seja, menos ativa que a amida **65** frente a *S. frugiperda*.

# **Abstract**



### Abstract

The present study describes the preparation of amides containing the methylenedioxyphenyl group and also their activity against the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa*, its symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* and the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, larvae.

From the bioassays it was observed that N-piperidine-3-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2-(E)-propenamide (**65**) was the most promising as insecticide agent among the compounds studied against *S. frugiperda* with an  $LD_{50}=1.07 \mu\text{g}/\text{mg}$  larvae. Amide **65** and N,N-diethyl-3-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2-(E)-propenamide (**66**) were the most active against the symbiotic fungus; and N-pyrrolidine-3-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2-(E)-propenamide (**67**) and N-benzyl-3-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2-(E)-propenamide (**72**) against the leaf-cutting ant.

Additional studies were necessary to establish the structure – activity relationship for piperamides. Thus, Combinatorial Chemistry technologies were employed and a solution-phase synthesis of indexed collection of amides was carried out, identified by Gas Chromatography coupled with Mass Spectroscopy (GC/MS), and screened against *S. frugiperda*.

From this library, the most active compound identified was 1-[4-(trifluoromethoxy)benzoyl]piperidine, **A<sup>8</sup>B<sup>1</sup>**, which was then individually synthesized and evaluated. It has shown a  $LD_{50} = 8,15 \mu\text{g}/\text{mg}$  larvae, thus less active than amide **65** against *S. frugiperda*.

---

1 - Introdução .....	2
1.1 - Insetos-pragas .....	2
1.1.2 - Formigas Cortadeiras <i>Atta sexdens</i> .....	2
1.1.3 - Lagarta-do-cartucho-do-milho, <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	4
1.2 - Produtos naturais como fonte de substâncias inseticidas .....	7
1.2.1 - Família das Piperaceae.....	8
1.2.2 - Piperamidas.....	9
1.3 - Química Combinatória: Ferramenta para a diversidade estrutural .....	24
1.3.1 - Síntese em Fase Sólida.....	26
1.3.3 - Síntese em Solução .....	27
1.3.4 - Síntese Paralela ou Síntese em Mistura.....	28
2 - Objetivos.....	33
3 - Resultados e Discussões.....	35
3.1 - Síntese de amidas derivadas do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico.....	35
3.2 - Avaliação das atividades biológicas das amidas 65-75 .....	37
3.2.1 - Atividade frente à <i>S. frugiperda</i> .....	37
3.2.2 - Atividade frente à <i>A. sexdens</i> e seu fungo simbiote.....	43
3.3 - Preparação de uma coleção indexada de piperamidas.....	48
3.4 - Análise da coleção de piperamidas por CG/EM.....	52
3.5 - Avaliação da atividade biológica da coleção de piperamidas .....	97
4 - Conclusões e Perspectivas .....	104
5 - Procedimento Experimental.....	107
5.1 - Aspectos Gerais .....	107

5.2 - Procedimento Experimental referente à síntese das amidas via a metodologia da Síntese Orgânica Clássica.....	108
5.2.1 - Obtenção do Ácido 3,4-metilenodioxicinâmico (63) .... <b>Erro! Indicador não definido.</b>	108
5.2.2 - Obtenção das amidas (55-65) derivadas do ácido 63 e da amida A <sup>8</sup> B <sup>1</sup> , derivada do ácido A <sup>8</sup> .....	109
5.2.3 - Dados Espectroscópicos das Amidas 65-75 .....	110
5.3 - Procedimento experimental referente à síntese das amidas via a metodologia da Síntese Orgânica Combinatória .....	116
5.3.1 - Preparação do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico..... <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
5.3.2 - Preparação dos cloretos dos ácidos .....	117
5.3.3 - Preparação das coleções combinatórias derivadas dos ácidos A <sup>1-10</sup> ..... <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
5.3.4 - Preparação das coleções combinatórias derivadas das aminas B <sup>1-10</sup> ..... <b>Erro! Indicador não definido.</b>	122
5.3.5 - Obtenção da 1-[(4-(trifluormetoxi)benzoil]piperidina (A <sup>8</sup> B <sup>1</sup> ).....	123
5.4 - Procedimento experimental para os bioensaios das amidas 55-65 e A <sup>8</sup> B <sup>1</sup> ...	124
5.4.1 - Bioensaio tópico (contato dorsal) frente a <i>S. frugiperda</i> <b>Erro! Indicador não definido.</b>	124
5.4.2 – Bioensaio da amida 65 por ingestão frente a <i>S. frugiperda</i> . <b>Erro! Indicador não definido.</b>	125
5.4.3 - Bioensaio realizado com o fungo simbionte das formigas cortadeiras.....	126
5.4.4 - Bioensaio realizado frente às formigas cortadeiras ..... <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
6 - Referências Bibliográficas .....	129



# **Introdução**

## **1 - Introdução**

### **1.1 - Insetos-pragas**

Na agricultura brasileira existem inúmeros insetos-pragas que causam enorme prejuízo para as plantações. Sendo assim, estudos buscando novos inseticidas que apresentem características desejáveis, como por exemplo, especificidade e baixa toxicidade são muito importantes.

Atualmente, o interesse está no controle da praga e não no extermínio do inseto no campo, evitando, assim o desequilíbrio biológico. A nova tendência é o da harmonia entre o número de pragas presentes no campo *versus* a produtividade da cultura.

Duas importantes pragas da agricultura brasileira são as formigas cortadeiras, *Atta sexdens*, e a lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda*.

#### **1.1.2 - Formigas Cortadeiras *Atta sexdens***

O gênero *Atta*, que engloba todas as espécies de saúvas, ocorre somente nas Américas, desde o sul dos EUA até o centro da Argentina, causando sérios problemas para uma variedade de plantas e é uma séria praga para as plantações dessas localidades.<sup>1</sup>

Uma colônia de formigas é formada de indivíduos adultos e em desenvolvimento ou cria, constituída de ovos, larvas e pupas. Os adultos, com raras exceções, são fêmeas que estão divididas em pelo menos duas castas: as fêmeas férteis ou rainhas, cuja função primordial é a postura de ovos e as fêmeas estéreis ou operárias que realizam todas as demais atividades da colônia, tais como: coleta de

água e alimento, alimentação da cria e da rainha, construção e defesa do ninho. As operárias, por sua vez, podem apresentar formas diferentes, que se denomina de polimorfismo, o qual está relacionado com a realização de diferentes tarefas, por partes das operárias.

Todas as operárias não apresentam asas e as formas aladas correspondem às rainhas e aos machos. Estes, geralmente, surgem apenas uma vez por ano na época de acasalamento, que se dá através da realização do vôo nupcial. Conseqüentemente, uma colônia de formigas é constituída exclusivamente de fêmeas ápteras.

É importante salientar que no máximo 30% da população adulta de uma colônia pode exercer atividades externas ao ninho ao mesmo tempo. Geralmente, este valor não ultrapassa 5 a 10%.

As colônias, nas várias espécies, podem ter uma única rainha, fenômeno denominado de monoginia, ou várias rainhas funcionais, denominado poliginia. Em geral, as rainhas de uma espécie poligínica vivem menos do que aquelas das espécies monogínicas. Em compensação, a capacidade da colônia em produzir novas rainhas é maior, e ocorre várias vezes por ano.<sup>2</sup>

As formigas cortadeiras são insetos de grande importância para a agricultura brasileira, pois os danos causados por essas pragas são de grande impacto. Segundo Troppmair e col., somente no estado de São Paulo existem 100 milhões de saueiros, os quais são responsáveis pelo corte anual de 180 milhões de toneladas de matéria-vegetal e pela movimentação de 200 milhões de metros cúbicos de terra.<sup>3</sup>

As formigas cortadeiras, *A. sexdens rubropilosa*, vivem em simbiose com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, existindo uma total dependência entre os dois (Figura 1). As formigas “cortam” e carregam para o ninho vegetais frescos para o desenvolvimento do fungo e para a própria alimentação.<sup>4,5</sup> Já o fungo é utilizado

como única fonte de alimentação para as larvas além de fornecer cerca de 9% da energia necessária para as operárias de formiga cortadeira.<sup>6,7,8</sup>

Os métodos de controle para essas formigas são diversos. Entre os mais usuais está a termonebulização e iscas granuladas.<sup>9,10,11</sup> No entanto, devido à preocupação com o meio ambiente, muitos inseticidas maléficos, que não são específicos e são tóxicos, foram proibidos, dentre eles as iscas a base de dodecacloro.

Sendo assim, a busca por compostos derivados de produtos naturais ou análogos sintéticos, sempre na intenção de encontrar novos compostos com maior especificidade (dirigidos ao inseto-alvo), seja por ação fungicida ou formicida, têm sido bastante desejada.



**Figura 1: Formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbiote**

### **1.1.3 - Lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda***

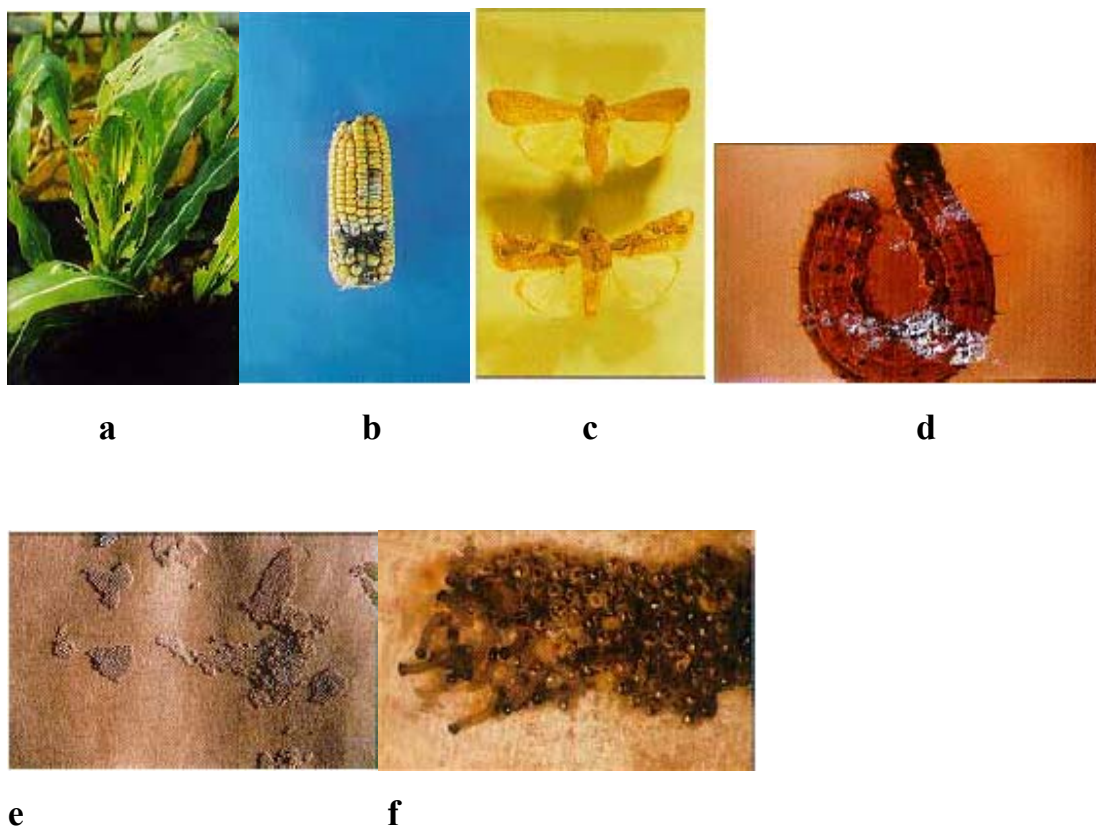
A lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), está presente por todo o continente Americano com ocorrências do México à América do Sul.<sup>12,13</sup> Ela é considerada uma das principais pragas do milho, podendo ocorrer durante todo o ciclo de crescimento da cultura, causando



reduções na produtividade superiores a 34%, sendo o período crítico 40 dias após a plantação.<sup>14</sup>

O inseto adulto é uma mariposa com cerca de 35 mm de envergadura, de coloração pardo-escura nas asas anteriores e branco-acinzentada nas posteriores (Figura 2c). As posturas são feitas em massa, com uma média de 150 ovos por postura (Figura 2e). O período de incubação dos ovos é de aproximadamente três dias. As lagartas recém-eclodidas (Figura 2f) alimentam-se da própria casca do ovo. Após essa primeira alimentação, permanecem em repouso por um período variável de duas a dez horas. Quando encontram hospedeiro adequado, começam a alimentar-se dos tecidos verdes, geralmente começando pelas áreas mais suculentas, deixando apenas a epiderme membranosa, provocando o sintoma conhecido como "folhas raspadas". À medida que as lagartas crescem, começam a fazer orifícios nas folhas, podendo causar severos danos às plantas (Figura 2a). É comum também o ataque na base da espiga ou mesmo diretamente, nos grãos leitosos (Figura 2b).<sup>15</sup> A lagarta completamente desenvolvida (Figura 2d) mede cerca de 40 mm, com coloração variável de pardo-escura, verde ou até preta e com um Y invertido na parte frontal da cabeça. O período larval depende das condições de temperatura, sendo que, nas condições brasileiras, dura em torno de 15 dias. Terminado esse período, a lagarta geralmente vai para o solo, onde se empupa. O período pupal varia de 10 a 12 dias nas épocas mais quentes do ano.

Lagartas de primeiro instar geralmente consomem o tecido verde de um lado da folha, deixando intacta a epiderme membranosa do outro lado. A presença da lagarta no interior do cartucho pode ser indicada pela quantidade de excrementos ainda frescos existentes na planta, ou constatada abrindo-se as folhas e observando-se lagartas com cabeça escura e com o característico Y invertido na parte frontal da cabeça.



**Figura 2:** Lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda*. a) Cultura atacada (folhas). b) Milho atacado. c) Mariposas. d) Lagarta adulta. e) Postura de ovos. f) Lagartas recém eclodidas.

A planta do milho é mais sensível ao seu ataque quando a infestação inicia-se entre 40 e 45 dias de idade. Nessa ocasião é que geralmente deve ser feito o controle curativo. Para tetos de produtividade em torno de 3.000 Kg/ha, a praga deve ser controlada quando aproximadamente 20% das plantas apresentarem o sintoma de "folhas raspadas". Em áreas onde é comum a ocorrência de inimigos naturais, é aconselhável a utilização de produtos químicos somente quando a larva estiver com cerca de 10 a 12 mm. Quanto maior for a produtividade esperada, considerando que o custo do tratamento não irá variar muito com o nível de tecnologia usado, mais rapidamente devem ser iniciadas as medidas de controle.<sup>15</sup>

O ataque à plantação pode ocorrer de várias maneiras: as lagartas pequenas raspam o limbo foliar das folhas jovens, danificando, em seguida, as folhas centrais da região do cartucho. Em ataques tardios, as lagartas podem ser encontradas destruindo palha e grãos.

O controle da praga vem sendo realizado basicamente por meio da utilização de inseticidas ou com a obtenção de plantas que sejam resistentes à praga. No entanto o custo sócio-econômico dos inseticidas e pela dificuldade de se obter plantas que sejam resistentes, seguras e produtivas, há a necessidade de se encontrar alternativas eficientes, economicamente viáveis e ecologicamente corretas.

## **1.2 - Produtos naturais como fonte de substâncias inseticidas**

Desde os tempos da antiga Roma até a metade do século XX, algumas plantas eram usadas como repelentes de insetos. O DDT (diclorodifeniltricloroetano) foi o primeiro pesticida moderno desenvolvido após a segunda guerra mundial para o combate dos mosquitos causadores da malária e da tifo. O DDT é insolúvel em água, mas solúvel em compostos orgânicos como a gordura e o óleo e tem um odor suave. O químico suíço Paul Hermann Müller, da Geigy Pharmaceutical recebeu o prêmio Nobel de medicina, em 1948 por descobrir a eficiência do DDT para a erradicação de vários tipos de artrópodes. Apesar de sua eficiência, a bióloga norte-americana Rachel Carson denunciou em seu livro "Primavera Silenciosa" que o DDT era agente causador de câncer e interferia na vida animal causando, por exemplo, o aumento da mortalidade dos pássaros. Sendo assim, o DDT foi proibido na década de 1970 em vários países. Isso causou uma busca desenfreada por outros compostos sintéticos considerados "seguros", o que culminou na descoberta de novos inseticidas organoclorados, tais como, Aldrin, Dieldrin, Clordano,

Heptacloro, entre outros. Esses compostos acabaram, também, por serem desastrosos para o meio ambiente, pois são altamente tóxicos, causaram resistência nos insetos devido ao uso indiscriminado e acabaram por ser restringidos ou banidos pela *Environmental Protection Agency* (EPA) dos EUA.<sup>16</sup>

Na busca por alternativas mais seguras para o controle dos insetos, voltou-se novamente a atenção para os produtos naturais. Dentre algumas famílias de plantas mais promissoras como fonte de compostos inseticidas, estão a Meliaceae, Rutaceae, Piperaceae, entre outras.<sup>17</sup>

### **1.2.1 - Família das Piperaceae**

Algumas plantas do gênero *Piper* (Piperaceae) agregam valores comerciais, econômicos e têm importância medicinal. Por exemplo, na Jamaica, *P. anduncum* e *P. hispidum* são conhecidos como remédios para o estômago e também como repelentes de insetos. A planta *P. amalago*, encontrada na região do México até o Brasil, é utilizada como agente antiinflamatório. Outros exemplos são as raízes e frutos de *P. chaba*, que possuem diversas utilidades, como por exemplo, no tratamento da asma, bronquite, febre, e ainda, como estimulante e anti-hemorroidal.<sup>18</sup>

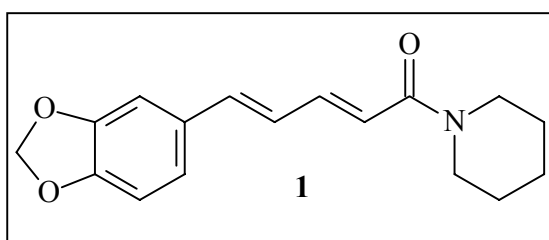
O extrato benzênico das folhas de *P. futokadsura* apresentou atividade antialimentar frente à larva da *Spodoptera litura*. Os frutos da pimenta-preta sul-africana (*P. guineense*) são usados como tempero, já o extrato das flores, raízes e sementes, é usado no tratamento de doenças venéreas, reumatismo e doenças gastro-intestinais.

Nas plantas do gênero *Piper* são encontradas diversas classes de compostos tais como: alcalóides, amidas, propilfenol, lignanas, neolignanas, terpenos, esteróides,

kavapironas, piperolidas, chalconas e diidrochalconas, flavonas, flavononas e outros compostos que possuem diversos grupos funcionais em sua estrutura. Os alcalóides e amidas são as classes de compostos mais abundantes existentes nas plantas deste gênero.<sup>18</sup>

### 1.2.2 - Piperamidas

Dentre os vários compostos advindos das plantas do gênero *Piper*, a primeira amida identificada foi a piperina (**1**) (Figura 3).<sup>18</sup> Essa amida é a responsável pelo sabor picante da pimenta-do-reino.



**Figura 3:** Piperina

Em 1984, Lee e col.<sup>19</sup> estudaram a farmacologia da piperina e constataram um amplo espectro de atividades biológicas, tais como: diminuição da pressão do sistema nervoso central, antipirética, analgésica e antiinflamatória.

A importância das piperamidas se estende até os dias de hoje, e a cada ano esses compostos tem sido mais estudados. Sendo assim, novas atividades foram descobertas e novos análogos, mais potentes, estão sendo sintetizados.

O grupo de Kiuchi e col. relataram a ação de 79 piperamidas sintéticas em larvas de segundo instar de *Toxocara canis*. A atividade foi relacionada com o tamanho da cadeia carbônica e natureza da porção amina da molécula. No entanto, a atividade

foi extremamente afetada pela ausência ou não de dupla ligação na estrutura dos compostos. As piperamidas que apresentaram maior atividade foram as que continham 11 carbonos na cadeia alquílica para amidas derivadas da pirrolidina e 13 carbonos na cadeia alquílica para amidas derivadas da metilpiperazina. Os compostos contendo o grupo metilenodioxifenil ligado ao anel benzênico apresentaram excelentes atividades.<sup>20</sup>

Ewete e col. estudaram a atividade da piperina, isolada de uma Piperaceae, e de um limonóide, gedunina, isolado de uma Melicaceae, bem como extratos brutos contendo esses compostos frente à larva de *Ostrinia nubilalis* Hubner. A piperina não causou redução do peso das larvas, porém causou a mortalidade das mesmas. Os extratos brutos de *P. guineense* Schum e Thonn reduziram o peso das larvas e causaram o prolongamento da fase larval e do período no qual os adultos emergem, desestruturando, assim, o ciclo do inseto.<sup>21</sup>

O grupo de Scott estudou o efeito de piperamidas frente a larvas e adultos do besouro da batata do Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*. As espécies estudadas foram *P. nigrum* e *P. tuberculatum*. Os resultados obtidos sugeriram que os extratos testados podem ser utilizados efetivamente no controle botânico de insetos por efeito de contato, na concentração abaixo de 0,1 %, mostrando ser mais uma alternativa para se obter resultados via o manejo integrado de controle de pragas.<sup>22</sup>

Miranda e col. estudaram a ação da pellitorina, uma amida isolada da planta *P. tuberculatum*, frente a larvas e adultos recém-emergidos da abelha *Apis mellifera*. A concentração da amida variou de 40-25000 ng de ativo/inseto e as larvas se apresentaram altamente suscetíveis à amida peliitorine, sendo que o DL<sub>10</sub> para a concentração de 40 ng/inseto foi de 39,14 ng/inseto.<sup>23</sup>

Scott e col. estudaram a eficiência de extratos das plantas *P. nigrum*, *P. guineense* e *P. tuberculatum* no controle de insetos-pragas domésticos e espécies presentes em jardins caseiros. Os extratos foram testados nos seguintes insetos: *Malacosoma*

*antericanum*, *Neodiprion sertifer*, *Yponomeuta cagnagella*, *Pyrrhalta viburni*, *Acalymma vittatum*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Popillia japonica*, *Blissus leucopterus hirtis*, sendo que a espécie mais suscetível foi a *Malacosoma antericanum*. Descobriu-se que as espécies de Piper testadas têm um poder repelente, evitando assim, a presença de herbívoros nas folhas, bem como a oviposição de insetos.<sup>24</sup>

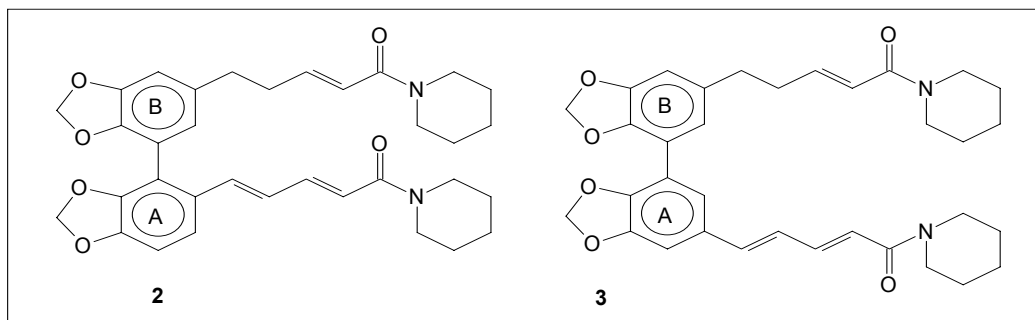
Gagnon e col. estudaram a atividade de extratos da planta *P. nigrum* no inseto *Rhizotrogus majalis*. O DL<sub>50</sub> obtido para larvas de terceiro ínstar foi de 2,5 %. Comparou-se também o tempo de meia-vida das piperamidas no solo com o do Diazinon, conhecido inseticida. Para as piperamidas, obteve-se um tempo de meia-vida de apenas 1,26 dias, confirmando a expectativa de que as piperamidas deixariam menos resíduos no solo, diminuindo a contaminação, diminuindo o risco associado ao uso de pesticidas.<sup>25</sup>

Recentemente, vários trabalhos foram publicados envolvendo piperamidas. Por exemplo, o grupo de Chaithong e col. estudou o efeito de extratos etanólicos derivados de três plantas do gênero Piper: *P. longum*, *P. ribesoides* e *P. sarmentosum*. A eficácia dos extratos foi avaliada frente a larvas de quarto ínstar de *Aedes aegypti* e os respectivos DL<sub>50</sub> obtidos foram 2,23, 4,06 e 8,13 ppm.<sup>26</sup>

Óleos essenciais das plantas *P. anducum* e *P. hispidinervum* foram testados frente ao inseto *Sitophilus zeamais*. O inseto foi mais suscetível ao ensaio de toxicidade por contato frente ao óleo *P. hispidinervum* do que em relação ao óleo de *P. anducum*, com valores de DL<sub>50</sub> de 0,51 e 2,87 mL cm<sup>-2</sup>, respectivamente. Neste estudo observou-se que o efeito dos óleos essenciais dessas plantas varia de acordo com a concentração e com o método de exposição do inseto ao óleo.<sup>27</sup>

Dentro do levantamento bibliográfico realizado alguns exemplos foram selecionados devido à proximidade com o presente trabalho e serão discutidos detalhadamente.

Siddiqui e col. isolaram da planta *P. nigrum* 14 compostos, sendo que 13 eram amidas, incluindo duas amidas isoméricas, a pipsaeedina (**2**) e a pipbinina (**3**) (Figura 4).<sup>28</sup>

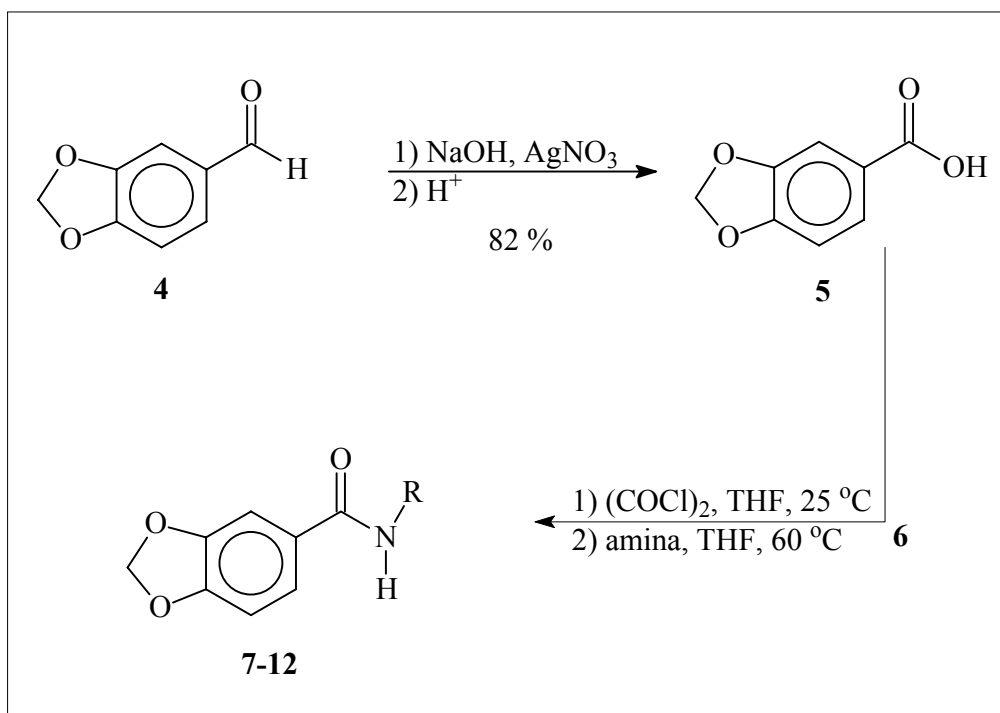


**Figura 4:** Pipsaeedina (**2**) e pipbinina (**3**)

Este foi o primeiro relato de diamidas do tipo dímeros encontradas em plantas do gênero *Piper*. O anel A consiste em uma molécula de piperina e o anel B, em uma molécula de piperanina. Ambos os compostos tiveram sua atividade biológica avaliada frente a larvas de quarto instar de *Aedes aegypti*. Os resultados foram promissores, sendo que o composto **2** apresentou toxicidade de 45,0 ppm e o composto **3** de 40,0 ppm. No entanto, o grupo de Park e col.<sup>29</sup> mostrou que a piperina (anel A), na sua forma simples, não dimérica, apresenta atividade biológica frente a larvas de *Aedes aegypti* mais promissora, na ordem de 5,10 ppm. Isso evidencia que a piperina é uma boa estrutura de partida para estudo de relação estrutura atividade para essas amidas.

Estrela e col.<sup>30</sup> sintetizaram amidas análogas à piperina (Esquema 1) e estudaram a toxicidade das mesmas em larvas de 3<sup>o</sup> instar de *Ascia monuste orseis* e *S. frugiperda*.





**Esquema 1:** Rota sintética utilizada na síntese das amidas 7-12

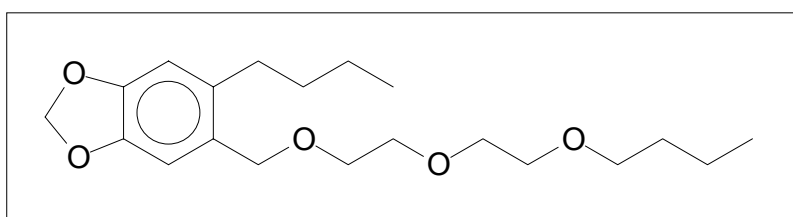
A partir do aldeído **4**, fez-se a oxidação utilizando-se nitrato de prata e hidróxido de sódio, obtendo-se o ácido **5**. O nitrato de prata é um oxidante fraco, e faz-se necessário nesse caso para evitar a hidrólise do grupo metilenodioxifenil. O ácido **5** foi tratado com cloreto de oxalila, obtendo-se o respectivo cloreto de ácido **6**, o qual reagiu com cada amina de interesse (Tabela 1) para se obter as respectivas amidas **7-12**.

**Tabela 1:** Aminas utilizadas na síntese das amidas 7-12

Amida	Amina (R)
7	Isopropil
8	Isopentil
9	Hexilamina

<b>10</b>	Butilamina
<b>11</b>	Etilamina
<b>12</b>	Pentilamina

Através do ensaio tópico com lagartas de 0,4 cm, tanto de *A. monuste* quanto de *S. frugiperda*, a fim de se obter a relação de dose-resposta para as amidas sintetizadas, selecionou-se as seguintes amidas para se realizar o bioensaio e se estimar o DL<sub>50</sub>: N-isopentil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida (**8**), N-isopropil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida (**7**) e N-hexil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida (**9**). O butóxido de piperonila (Figura 5), conhecido sinergista, foi utilizado como controle positivo (Tabela 2).



**Figura 5:** Butóxido de Piperonila

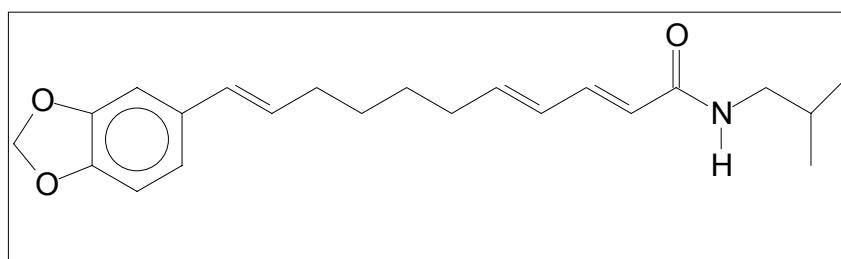
**Tabela 2:** Resultados de DL<sub>50</sub>

Composto	DL <sub>50</sub> µg i.a./mg de lagarta	
	<i>A. monusti</i>	<i>S. frugiperda</i>
<b>7</b>	0,004	0,61
<b>8</b>	0,68	1,24
<b>9</b>	0,278	1,35
Butóxido de Piperonila	0,28	2,63

Como se pode observar, o composto que mostrou atividade inseticida mais promissora foi a amida **7**, pois foi mais tóxica para as duas espécies de insetos estudadas.

Em relação à estrutura da piperina (**1**), o composto **7** não apresenta a cadeia carbônica insaturada ligando o anel benzênico ao carbono carbonílico. Isso evidencia que provavelmente a olefina pode não influenciar na atividade inseticida para esses dois insetos.

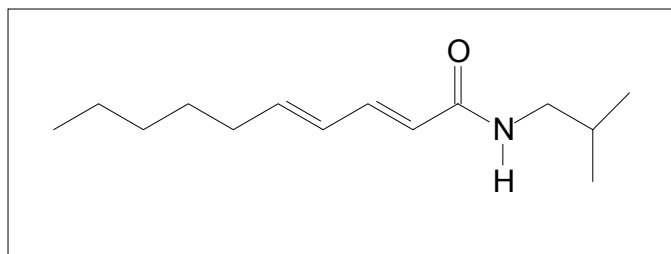
Em 1989, Miyakado e col.<sup>31</sup> estudaram inseticidas derivados das isobutilamidas. O extrato da planta *P. nigrum* apresentou atividades inseticidas frente a vários insetos. Desse extrato foi isolado a pipercida [N-isobutil-11-(3,4-metilenodioxifenil)-(2E,4E,10E)-2,4,10-undecatrienamida] (**13**) e outros dois compostos correlatos, diidropipercida (**14**) e guineensina (**15**). A atividade inseticida dos compostos **13**, **14** e **15** foi testada frente à praga do “feijão frade” (*Callosobruchus chinensis*). A mais tóxica das três amidas foi a diidropipercida (**14**), seguida, respectivamente, pela guineensina (**15**) e pipercida (**13**) (Figura 6).



**Figura 6:** Estrutura da pipercida (**13**)

A amida **13** e os dois compostos análogos **14** e **15** mostraram interessantes atividades inseticidas e características fisiológicas, como por exemplo: rápida paralisação e morte do inseto; alta toxicidade frente a insetos já resistentes a piretróides; sinergismo entre os três compostos e aumento da estabilidade

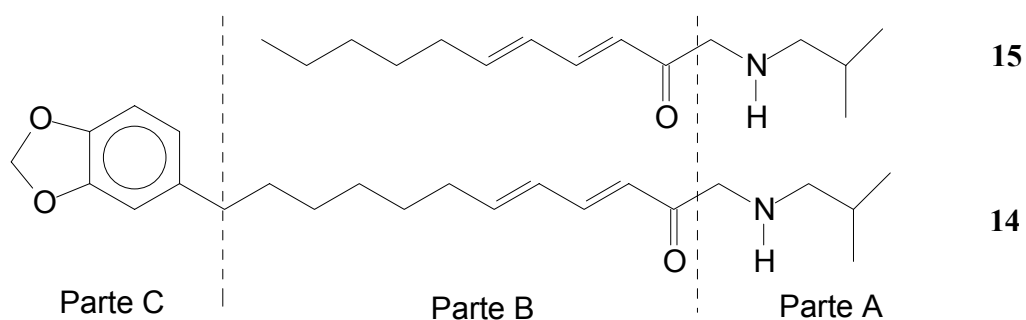
molecular em relação à pellitorina, isobutilamida que não apresenta em sua estrutura o anel benzênico substituído pelo grupo metilendioxifenil (**16**) (Figura 7).



**Figura 7:** Pellitorina (**16**)

Sendo assim, o grupo de Miyakado e col. realizou um trabalho de estrutura-atividade dessas moléculas, tendo a diidropiperida (**14**), o composto mais ativo frente a praga do “feijão frade”, como estrutura-base.

Comparando-se o composto **14** com a molécula da pellitorina (**16**), observa-se que existem dois sítios nas moléculas que são comuns (parte A e B: a porção amina e a porção olefínica da molécula, como mostra a Figura 8).



**Figura 8:** Comparação entre a estrutura dos compostos **14** e **15**

A primeira etapa do estudo foi conduzida focando-se na porção amina da molécula (parte A). As partes B e C da diidropiperida (**14**) foram mantidas e a porção amina da molécula foi modificada, utilizando-se as aminas listadas na Tabela 3.

Os análogos sintéticos **17-23** foram ensaiados em relação a *C. chinensis*, em comparação com a atividade já conhecida do composto **14** (Tabela 3). As modificações na porção A da molécula não se apresentaram efetivas, pois as atividades biológicas observadas para esses compostos foram de 3 a 4 vezes menores do que a observada para o composto **14**. Apenas o composto **17**, derivado da 1,2-dimetilpropilamina apresentou atividade similar a diidropiperidina (**14**), o que evidencia que pode haver uma limitação estérica em relação ao tamanho da amina, influenciando na atividade biológica.

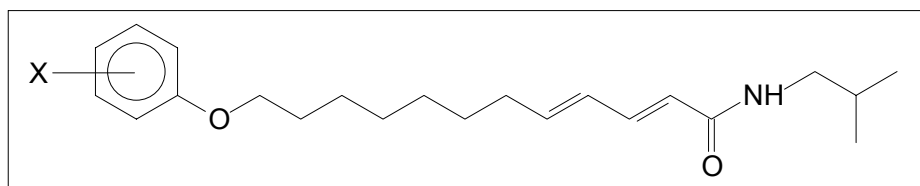
**Tabela 3:** Aminas utilizadas na síntese das amidas modificadas na porção A

<b>Composto</b>	<b>Amina (R)</b>	<b>DL<sub>50</sub> (µg/inseto)</b>
<b>14</b>	Isobutilamina	0,23
<b>17</b>	1,2-Dimetilpropilamina	0,32
<b>18</b>	1-Metilpropilamina	1,05
<b>19</b>	Propil-3-dimetilamina	0,81
<b>20</b>	Ciclohexilamina	1,0
<b>21</b>	Dimetoxietilamina	> 10,0
<b>22</b>	Anilina	> 10,0
<b>23</b>	Benzilamina	> 10,0

O próximo passo foi o estudo envolvendo a porção B da molécula. As mudanças foram feitas em relação à posição das duplas ligações na cadeia carbônica, bem como no tamanho da mesma. A introdução de um grupamento metil no carbono C-3 também foi realizada e o grupo 3,4-metilenodioxifenil foi modificado, utilizando-se um grupamento fenóxi ao invés do fenil. Em nenhuma das modificações estruturais realizadas obteve-se compostos com promissora atividade biológica frente ao inseto *C. chinensis*.

A última modificação realizada foi na parte C da molécula. A modificação foi efetuada nos análogos do tipo fenoxi, devido a maior facilidade sintética em relação ao grupo metilendioxifenil (Figura 9).

Na tabela 4 estão listados os grupos substituintes utilizados, bem como o DL<sub>50</sub> obtido para cada composto em ensaio biológico tópico realizado com o inseto *C. chinensis*.



**Figura 9:** Amidas sintetizadas com alterações na porção C da molécula

**Tabela 4:** Resultados de DL<sub>50</sub> para as amidas sintetizadas 24-35

Composto	X	DL <sub>50</sub> (µg/inseto)
24	3,4-metilenodioxifenil	2,0
25	4-CH <sub>3</sub>	> 10,0
26	4-NO <sub>2</sub>	8,0
27	4-OCH <sub>3</sub>	> 10,0
28	4-Cl	0,150
29	4-Br	0,250
30	3,4-(Cl) <sub>2</sub>	0,070
31	3-Cl	0,068
32	3-Br	0,038
33	3-CF <sub>3</sub>	0,043
34	Piretrina	0,100
35	Fenitroton	0,045

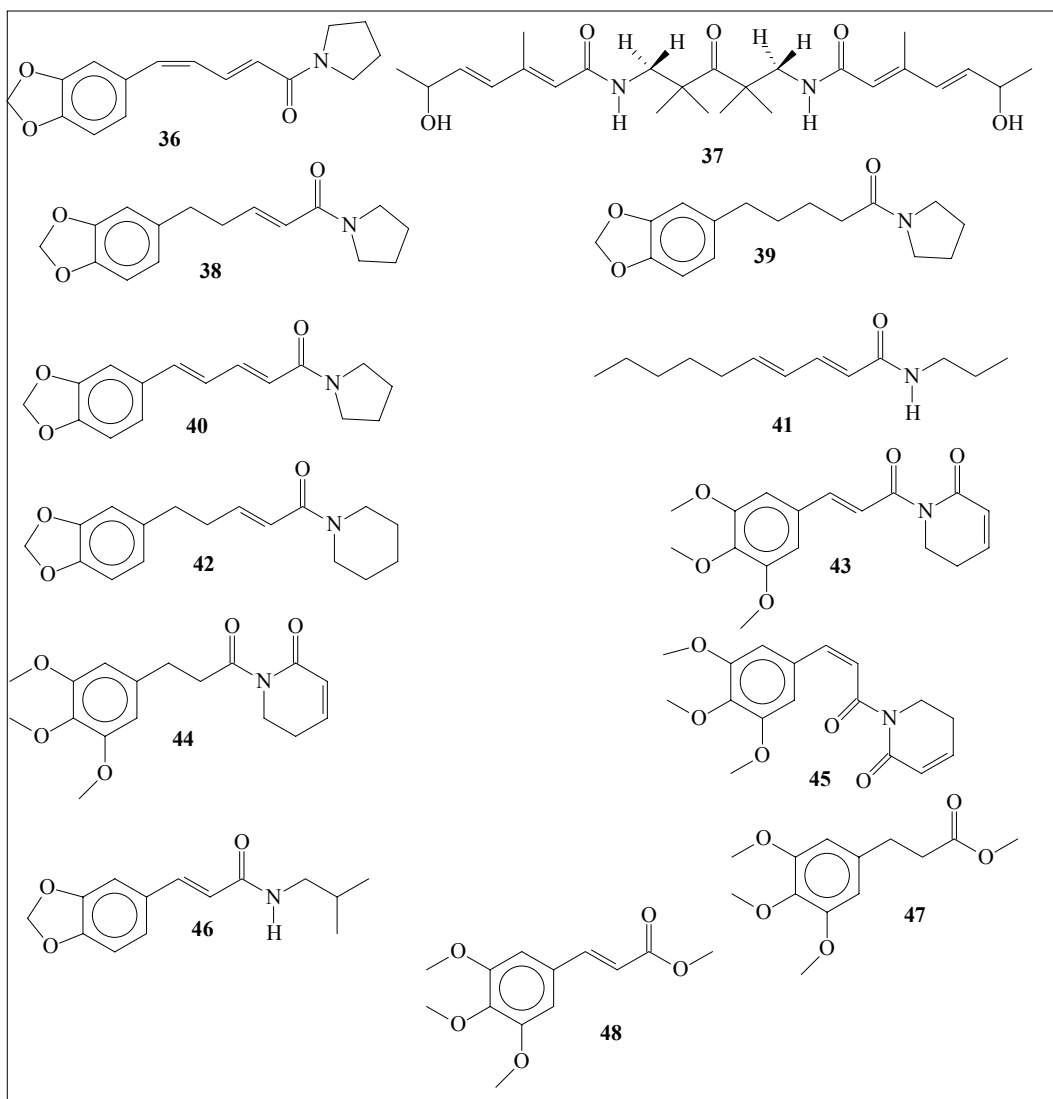
Como podemos observar o grupo metilenodioxifenil, um substituinte comum encontrado nas Piperamidas não foi essencial para a atividade biológica. Os compostos com halogênios substituintes na posição 4 apresentaram excelentes resultados, sendo os grupos mais proeminentes: 3-Br, 3-Cl e 3-CF<sub>3</sub>.

As piperamidas também são conhecidas devido à atividade fungicida. O grupo de da Silva<sup>32</sup> estudou amidas isoladas da planta *P. arboreum* e da planta *P. tuberculatum*. Foram isoladas da planta *P. arboreum* duas novas amidas, a N-[10-(13,14-metilenodioxifenil)-7(E),9(Z)-pentadienoil]-pirrolidina (**36**) e a arboreumina (**37**) e também as amidas já reportadas em literatura **38**, seu respectivo análogo **39** e a amida **40**. Da planta *P. tuberculatum* isolou-se **6** amidas (**41-46**) e 2 compostos derivados do cinnamoil (**47** e **48**) (Figura 10).

O ensaio realizado para testar a atividade antifúngica das amidas isoladas foi a técnica de TLC baseando-se no método de Homans e Funchs.<sup>33</sup>

Em relação ao fungo *Cladosporium sphaerospermum*, os compostos **38** e **39** (0,1 µg) apresentaram a atividade antifúngica mais proeminente, maior até que o miconazol (0,5 µg) e a nistatina (0,5 µg), utilizados como controle positivo. Os resultados estão sumarizados na Tabela 5.

Esses compostos também apresentaram a maior inibição frente ao fungo *C. cladosporioides*, sendo que a amida **39** apresentou atividade 50 vezes maior se comparada com os compostos de referência (Tabela 6).



**Figura 10:** Compostos isolados de *P. arboreum* e *P. tuberculatum*

**Tabela 5:** Resultados obtidos para o fungo *C. sphaerospermum*

Compostos	Quantidade mínima para se observar a maior atividade (µg)
<b>38-39</b>	0,1
<b>37 e 40</b>	5,0
<b>36</b>	10,0



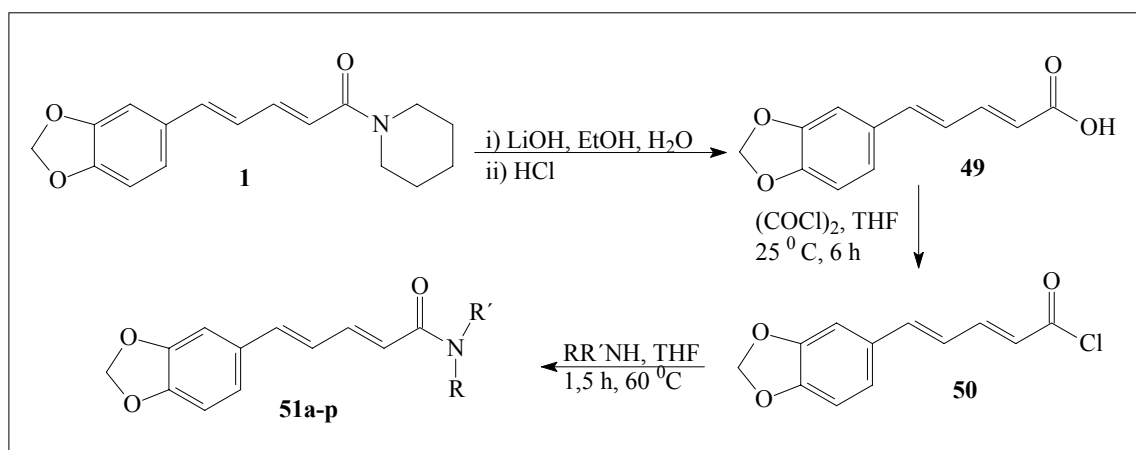
**Tabela 6:** Resultados obtidos para o fungo *C. cladosporioides*

<b>Compostos</b>	<b>Quantidade mínima para se observar a maior atividade (µg)</b>
<b>41-45</b>	5,0
<b>48</b>	5,0
<b>46 e 47</b>	10,0

Os resultados obtidos sugerem que as amidas derivadas da pirrolidina, isoladas de *P. arboreum* apresentam atividade antifúngica substancialmente maiores do que as amidas derivadas da piperidina, diidropiridona e isobutilamida, isoladas da planta *P. tuberculatum*.

Vale ressaltar ainda, que essas amidas podem apresentar efeito sinérgico quando estão em mistura, potencializando o efeito observado para as mesmas. Deyer e col.<sup>34</sup> estudaram esse efeito para três amidas isoladas da planta *P. cenocladum*: piplartina, 4'-desmetilpiplartina e cenocladamida. Essa planta possui mecanismos de defesa naturais, como por exemplo, formigas que vivem em sistema de mutualismo com a planta e que a defendem contra certos herbívoros. No entanto, descobriu-se que a planta possui três amidas que apresentam várias funções defensivas, principalmente contra insetos. O grupo de Deyer testou o efeito dessas amidas isoladamente e em mistura em cinco espécies de insetos, dentre eles a *S. frugiperda*. Isoladamente, as amidas não apresentaram efeito algum em nenhum dos insetos estudados, no entanto, os compostos em mistura apresentaram efeito bastante promissor. Em *S. frugiperda*, por exemplo, houve redução do peso pupal, menor sobrevivência dos insetos e ainda o tempo de desenvolvimento das pupas foi prolongado. As três amidas apresentaram efeito fortemente deterrente e tóxico em todos os insetos testados.

O grupo de Paula sintetizou amidas derivadas da piperina e avaliaram a atividade biológica das mesmas frente a alguns importantes insetos economicamente importantes no Brasil.<sup>35</sup> A rota sintética utilizada está descrita no Esquema 2.

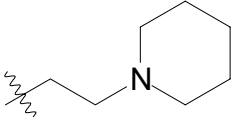
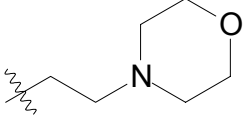
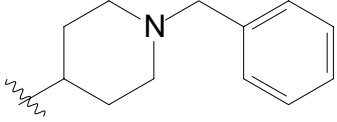
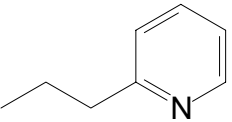


**Esquema 2:** Rota sintética utilizada para síntese de amidas derivadas da piperina

A partir da hidrólise da piperina (1), obteve-se o ácido 49, o qual foi transformado em seu cloreto, via reação com cloreto de oxalila. As amidas foram sintetizadas reagindo-se o cloreto de ácido 50 com as amins adequadas para se obter as amidas de interesse. As amidas 51a-p foram testadas frente a uma larva, *Ascia monuste orseis*, e a quatro insetos adultos, *Acanthoscelides obtectus*, *Brevicoryne brassicae*, *Protopolybia exigua* e *Cornitermes cumulans*. A metodologia utilizada no bioensaio foi o teste de contato, no qual uma solução da amida a ser testada foi aplicada no dorso do inseto ou larva em estudo. Na tabela 7 tem-se as amins utilizadas na síntese de cada amida. O rendimento das amidas variou 28-89 %.

Dentre as 16 amidas sintetizadas, apenas 6 foram ativas contra *A. monuste orseis* (dose de 40 µg/mg larva), sendo as mais ativas a 51b (97,5 %) e 51d (95,0 %), sendo comparáveis a piperina, que apresentou mortalidade de 95,0 %.

**Tabela 7:** Aminas utilizadas na síntese das amidas **51 a-p**

<b>Compostos</b>	<b>RR'NH</b>
<b>51a</b>	etil
<b>51b</b>	dietil
<b>51c</b>	isopropil
<b>51d</b>	diisopropil
<b>51e</b>	butil
<b>51f</b>	isobutil
<b>51g</b>	pentil
<b>51h</b>	isopentil
<b>51i</b>	hexil
<b>51j</b>	decil
<b>51K</b>	ciclohexil
<b>51l</b>	adamantil
<b>51m</b>	
<b>51n</b>	
<b>51o</b>	
<b>51p</b>	

No estudo com o inseto *A. obectus* (dose de 2,6 µg/mg inseto), apenas 5 compostos (**1**, **51d**, **51l**, **51m** e **51o**) foram ativos, sendo que a mortalidade apresentada foi de 25,0-30,0 %.

Em relação ao *B. brassicae*, 13 amidas foram ativas na faixa de 52,5-92,5 % (dose 31,25 µg/mg inseto), sendo as amidas **51a**, **51g**, **51i** e **51o** os compostos que apresentaram atividade mais promissora (75,0-92,5 %).

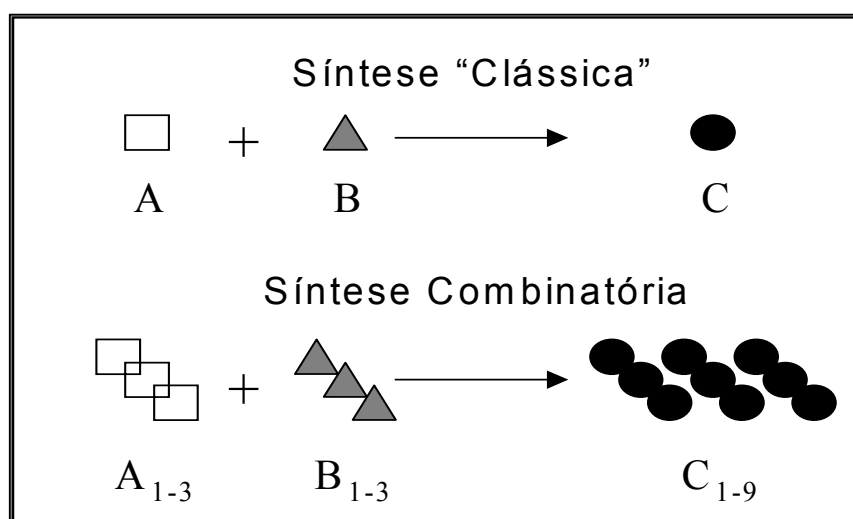
Para o inseto *C. cumulans* (dose 1,19 µg/mg inseto) as amidas **51d**, **51b** e **51m** foram as mais ativas, causando uma mortalidade variando de 22,5 a 42,5 %, e para *P. exigua* (dose 2,63 µg/mg inseto) a amida mais ativa foi a **51d**, com 45,0 % de mortalidade. É importante ressaltar que a mortalidade das amidas variou conforme a dose do composto aplicada em cada ensaio.

O grupo de Paula concluiu que as isobutilamidas, amidas que comumente apresentam atividades promissoras frente a insetos não foram as mais ativas para esse estudo. Concluiu-se também que o estudo não reuniu dados suficientes para se estabelecer a relação estrutura-atividade entre as amidas/insetos, no entanto, para *A. monuste orseis* as amidas dissubstituídas apresentaram maior atividade.<sup>35</sup>

### **1.3 - Química Combinatória: Ferramenta para a diversidade estrutural**

A Química Combinatória consiste na preparação de um conjunto de substâncias de forma simultânea, ao invés do modo clássico de se preparar compostos um a um (Figura 11). Esta técnica visa a síntese de um maior número de candidatos a composto protótipo, buscando sempre a maior diversidade estrutural possível entre os compostos sintetizados.

A vantagem da química combinatória em relação à síntese clássica na preparação de candidatos a composto-protótipo está relacionada ao menor tempo de preparação e aos menores custos (Tabela 8).<sup>36</sup>



**Figura 11:** Síntese clássica em comparação com a síntese combinatória

**Tabela 8:** Comparação de tempo e custo entre síntese clássica e combinatória

Metodologia Sintética	Clássica	Combinatória
Compostos químicos sintetizados por dia	4	3.300
Custo Total (US\$)	30.000	40.000
Custo por Composto (US\$)	7.500	12

Existem dois métodos principais de síntese dentro da Química Combinatória: em fase sólida e em solução.

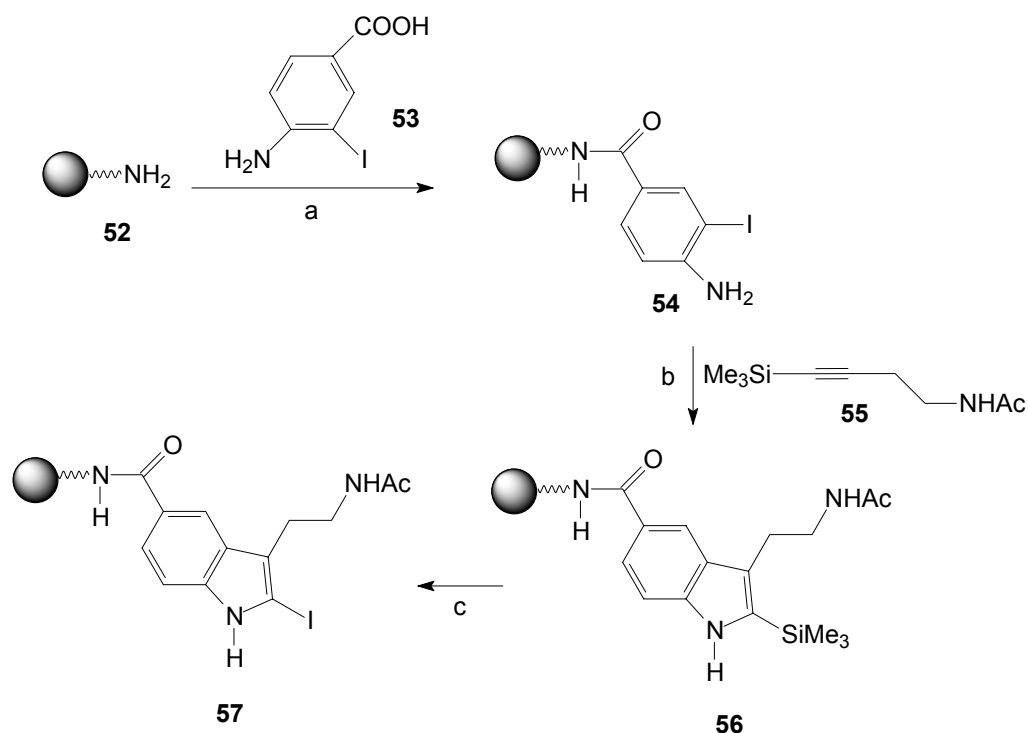
### 1.3.1 - Síntese em Fase Sólida

Na síntese em fase sólida, o substrato da reação é imobilizado em um suporte sólido. A principal vantagem da síntese em fase sólida é a facilidade de purificação do produto formado na reação, através de uma filtração, simplificando o complexo processo de tratamento da reação (*work up*), purificações cromatográficas e outros tratamentos realizados com a finalidade de isolar o produto desejado da mistura reacional.

As principais desvantagens da síntese em fase sólida são:

- necessidade de se utilizar grandes excessos dos reagentes a fim de se assegurar a completa conversão do substrato.
- escassez de métodos analíticos para o acompanhamento das reações em fase sólida. Nem todas as técnicas espectroscópicas comuns se adaptam para a utilização em reações em fase sólida.

Um exemplo é o trabalho realizado pelo grupo de Graebin<sup>37</sup> visando a síntese de carboxamido-N-acetiltriptaminados (Esquema 3).



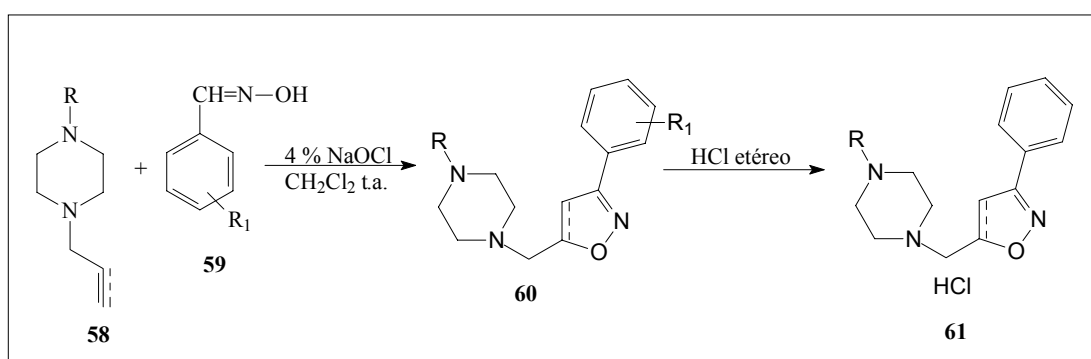
a) N,N,N',N'-tetrametil-o-(benzotiazol-1-il)-urônio tetrafluoroborato (TBTU), hidrozibenzotriazol (HOBT), trietilamina, 4-diaminopiridina (DMAP), dioxano, microondas por 3 min. b) Pd(OAc)<sub>2</sub>, PPh<sub>3</sub>, LiCl, NaOAc, N-N-dimetilamina (DMA), microondas por 13 min. c) N-iodo-succinimida (NIS), diclorometano, microondas por 14 min.

**Esquema 3:** Exemplo de síntese em fase sólida

### 1.3.3 - Síntese em Solução

A síntese em solução tem como a principal vantagem a possibilidade de se utilizar as mesmas metodologias sintéticas da síntese clássica, sem a necessidade de grandes excessos dos reagentes, como no caso da síntese em fase sólida. A principal desvantagem, no entanto, da síntese em solução, é a garantia da pureza dos compostos sintetizados, visto que a purificação dos compostos obtidos é feita pelos métodos convencionais.

Um exemplo é o trabalho de Kang e col.<sup>38</sup>, que sintetizaram uma coleção de 20 isoxazóis e 20 isoxazolinas utilizando-se a metodologia da síntese em solução através da reação de cicloadição 1,3-dipolar de nitrilas óxidos com olefinas e alcinos, seguindo-se com a precipitação do produto obtido em forma de cloridrato (Esquema 4).



**Esquema 4:** Exemplo de síntese em solução

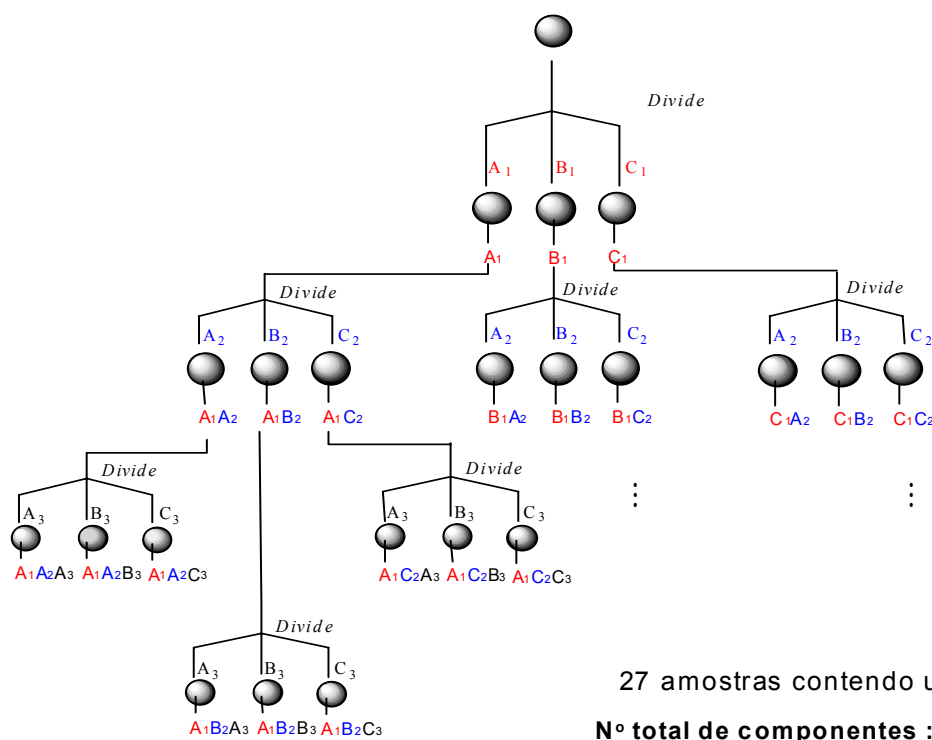
### 1.3.4 - Síntese Paralela ou Síntese em Mistura

As coleções combinatórias podem ser preparadas por meio da síntese paralela ou em mistura. Na síntese paralela, as etapas sintéticas são realizadas simultaneamente, mas cada composto é preparado em um compartimento reacional separado. Essa técnica é utilizada na síntese de coleções combinatórias com um número limitado de compostos (até algumas centenas). É necessário realizar um teste biológico para cada composto sintetizado, pois os compostos são testados puros, o que torna o bioensaio trabalhoso, apesar da vantagem de se testar os compostos puros.

Conforme mostrado no esquema 5, após a imobilização, que ocorre em um único compartimento reacional, para cada reagente, ocorre a divisão. Cada reagente



imobilizado é dividido em três partes equimolares, formando-se assim, 9 misturas, cada uma em um compartimento reacional, sendo que as três primeiras são derivadas do reagente A1, as três intermediárias, do reagente B1 e as três últimas misturas são derivadas do reagente C1. Cada bloco de três misturas recebe o tratamento com os reagentes A2, B2, C2. Assim as nove misturas são tratadas com esses reagentes, três a três. Após a reação, as três misturas derivadas dos reagentes A1 são divididas novamente. Cada mistura desse grupo gera mais três misturas, a partir da divisão em três compartimentos reacionais distintos e são tratadas com novos reagentes, A3, B3 e C3. Esse procedimento acarreta em um total de mais 9 misturas, todas derivadas do reagente A1. O mesmo padrão segue para os outros dois blocos, derivados dos reagentes B1 e C1, gerando um total de 27 compostos.

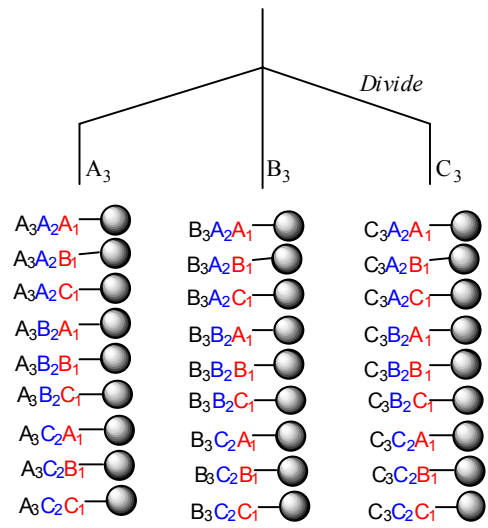
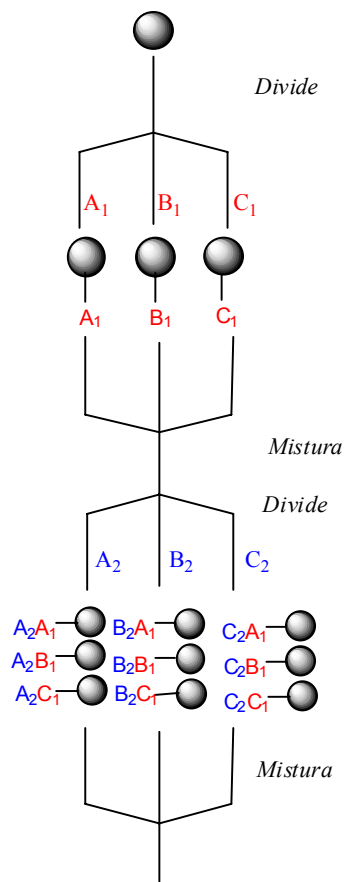


**Esquema 5:** Estratégia da síntese paralela

Na síntese em mistura, um substrato é adicionado, em um único compartimento reacional, a uma mistura de reagentes, conhecidos como blocos construtores, os quais são os responsáveis pela diversidade da coleção. Nesse caso, obtém-se uma mistura de produtos. Devido à facilidade de gerar diversidade, a coleção sintetizada via mistura são formadas, geralmente, por milhões de compostos. Pode-se também usar a estratégia mistura-divide, como mostra o Esquema 6.

Primeiramente imobiliza-se os reagentes A1, B1 e C1 em resinas comumente utilizadas na síntese em fase sólida. Depois de completa a reação de imobilização, mistura-se os reagentes imobilizados e posteriormente, divide-se os mesmos em misturas equimolares, cada um em um “compartimento” reacional. A cada mistura formada, adiciona-se uma segunda demanda de reagentes, por exemplo, A2, B2, C2. Após completa a reação, novamente mistura-se os produtos formados e procede-se uma segunda divisão equimolar dos mesmos. Serão formados 3 grupos com 3 compostos em mistura cada, conforme mostra o esquema abaixo. As misturas redivididas são tratadas com novos reagentes, A3, B3 e C3. Dessa forma, obtém-se 3 misturas equimolares com 9 componentes cada.

Cada uma das três misturas obtidas, com seus nove compostos, é testada quanto sua atividade biológica. Considerando-se que a variável entre os compostos são os reagentes A3, B3 e C3, é possível distinguir qual a mistura é mais ativa no bioensaio, ou seja, se a mistura mais ativa é referente ao composto A3, B3 ou C3. Dessa forma, após distinguir qual mistura é a mais ativa, procede-se a síntese individual dos compostos da mistura via síntese orgânica clássica e efetua-se o bioensaio com os compostos puros para avaliar a resposta dos mesmos. Assim, os 18 componentes das misturas menos ativas são descartados, pois não tiveram respostas promissoras nos bioensaios.



3 misturas equimolares com 9 componentes cada

$$\text{N}^\circ \text{ total de componentes} = n_1 \times n_2 \times n_3 = 3 \times 3 \times 3 = 27$$

**Esquema 6:** Estratégia mistura-divide

# Objetivos

## 2 - Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

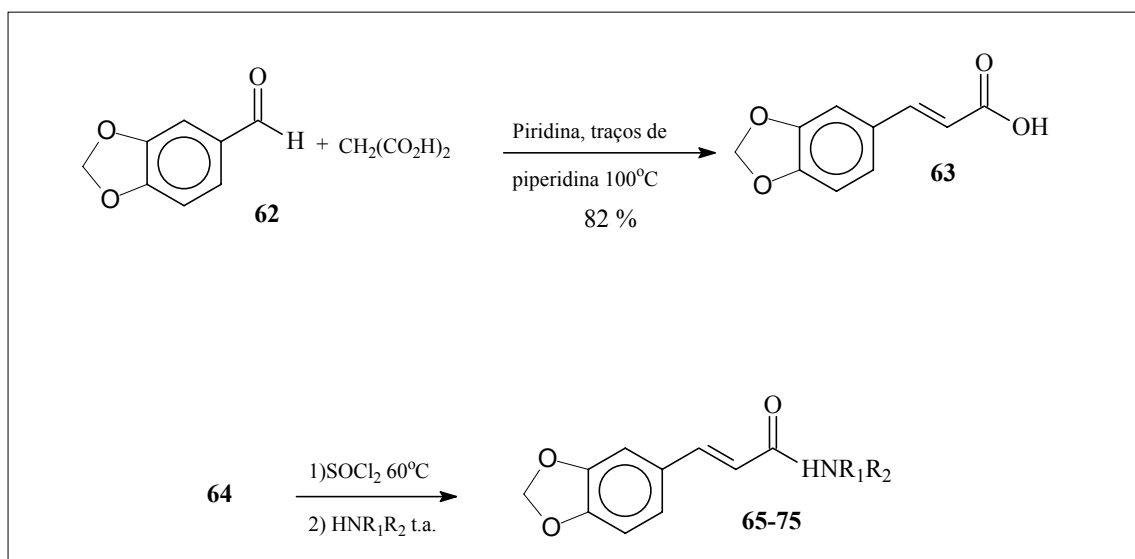
- Síntese de amidas derivadas do ácido 3,4-metilenodioxo-cinâmico e avaliação das suas atividades biológicas frente à lagarta do cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda*, e a formiga cortadeira, *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote, *Leucoagaricus gongylophorus*.
- Síntese em solução de uma coleção combinatória indexada de piperamidas, caracterização por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM), avaliação da atividade biológica da coleção sintetizada frente à *S. frugiperda* e seleção da(s) amida(s) mais ativa(s).
- Síntese via método clássico da(s) amida(s) mais ativa(s) em mistura e avaliação de sua(s) atividade(s) biológica(s) frente à *S. frugiperda*.

## **Resultados e Discussões**

### 3 - Resultados e Discussões

#### 3.1 - Síntese de amidas derivadas do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico

Primeiramente preparou-se um conjunto de amidas derivadas do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico utilizando-se a metodologia da síntese orgânica clássica. O Esquema 7 descreve a rota sintética utilizada para a preparação das amidas. A síntese foi realizada em duas etapas, iniciando-se pela utilização do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico, o qual foi convertido para o respectivo cloreto de ácido, via reação com cloreto de tionila. Em seguida, prosseguiu-se com a adição da amina de interesse e obteve-se as amidas descritas Tabela 9.



**Esquema 7:** Rota sintética via síntese clássica para obtenção das amidas

**Tabela 9:** Amidas sintetizadas via síntese clássica

<b>Amida</b>	<b>HNR<sub>1</sub>R<sub>2</sub></b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>65</b>	Piperidina	44
<b>66</b>	Dietilamina	42
<b>67</b>	Pirrolidina	68
<b>68</b>	2-metilbutilamina	38
<b>69</b>	Morfolina	40
<b>70</b>	Anilina	39
<b>71</b>	Diisopropilamina	36
<b>72</b>	Benzilamina	36
<b>73</b>	Diciclohexilamina	86
<b>74</b>	Ciclohexilamina	32
<b>75</b>	Di-n-butilamina	83

Pode-se observar que os rendimentos obtidos para as amidas variaram entre 30-80%, aproximadamente. Essa variação pode estar relacionada com a classe da amina utilizada na reação de formação de amidas. Aminas alifáticas de cadeia carbônica pequena como, por exemplo, a diisopropilamina, forneceram baixos rendimentos devido a sua fácil volatilização. Aminas alifáticas de cadeia carbônica longa como, por exemplo, a di-n-butilamina, favorecem a formação da amida, pois são mais reativas que aminas cíclicas e não são voláteis. Esta reatividade está relacionada com o fato da mesma ser uma amina primária. A benzilamina é a menos básica devido à conjugação do par de elétrons não ligante do nitrogênio com o anel aromático, o que não favorece a formação da amida.



### **3.2 - Avaliação das atividades biológicas das amidas 65-75**

As amidas obtidas foram ensaiadas frente a *S. frugiperda*, a lagarta do cartucho-do-milho, e às formigas cortadeiras *A. sexdens* e seu fungo simbionte.

#### **3.2.1 - Atividade frente à *S. frugiperda***

Em relação à praga do milho, as amidas foram ensaiadas topicamente frente às lagartas de *S. frugiperda* e a piperina foi utilizada como controle positivo, baseando-se na metodologia descrita por Paula e col.<sup>35</sup>

A toxicidade por contato das amidas foi avaliada em lagartas recém eclodidas e de segundo instar, em duas concentrações (70 e 40 µg/mg larva, respectivamente). Nos ensaios, as amidas **65, 70, 72, 74, 75** e a piperina causaram mortalidade significativa em relação ao controle, já as amidas **66, 67, 68, 69 e 73** não apresentaram diferenças estatísticas em relação à mortalidade do controle (Tabela 10).

O DL<sub>50</sub> para as amidas **65, 67, 68, e 75** e a piperina foi obtido pela curva de dose-resposta; as outras amidas (**66, 69, 70, 72, 73 e 74**) também foram testadas, mas a mortalidade não diferiu da encontrada para o controle (Tabela 11). As amidas **65 e 75** apresentaram o menor (1,07 µg/mg) e o maior (504,07 µg/mg) valores de DL<sub>50</sub>, respectivamente.

**Tabela 10:** Teste de toxicidade por contato das amidas (70 µg/mg larva) frente a larvas recém eclodidas de *S. frugiperda*

<b>Amida</b>	<b>Mortalidade* ± DP</b>
<b>65</b>	86.0 ± 8.9 <b>a</b>
<b>66</b>	22.0 ± 13.0 <b>d</b>
<b>67</b>	38.0 ± 8.3 <b>c</b>
<b>68</b>	50.0 ± 15.8 <b>b</b>
<b>69</b>	12.0 ± 8.9 <b>d</b>
<b>70</b>	22.0 ± 21.6 <b>d</b>
<b>72</b>	30.0 ± 18.1 <b>c</b>
<b>73</b>	4.0 ± 5.5 <b>e</b>
<b>74</b>	14.0 ± 5.5 <b>d</b>
<b>75</b>	56.0 ± 20.7 <b>b</b>
<b>controle</b>	4.0 ± 5.5 <b>e</b>

\*Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, indicam que não houve diferenças significativas no teste de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

A amida **65**, que causou maior mortalidade de larvas no ensaio tópico, foi testada, em um segundo experimento, no qual a mesma foi incorporada à dieta alimentar artificial (composta basicamente por feijão e germe de trigo) oferecida ao inseto, a fim de se estudar o efeito desse composto em relação ao ciclo de vida.<sup>39</sup>

**Tabela 11:** Valores de DL<sub>50</sub> frente a *S. frugiperda* (larvas de segundo instar) obtidos para as amidas no ensaio tópico

Amida*	Inclinação ± EP	DL <sub>50</sub> (IC 90%)
<b>65</b>	0.68 ± 0.063	1.07 (0.12 - 5.2)
<b>67</b>	0.24 ± 0.085	14.14 (2.93 - 580.65)
<b>68</b>	0.18 ± 0.06	388.8 (47.37 - 836.9)
<b>75</b>	0.23 ± 0.087	504.07 (42.9 - 851.1)
Piperine	0.58 ± 0.073	41.79 (22.6 - 86.9)

EP erro padrão; DL dose letal; IC intervalo de confiança; N = 300 insetos.

\*Amidas **66, 69, 70, 72, 73 e 74** foram testadas e o resultado não diferiu do controle (1%).

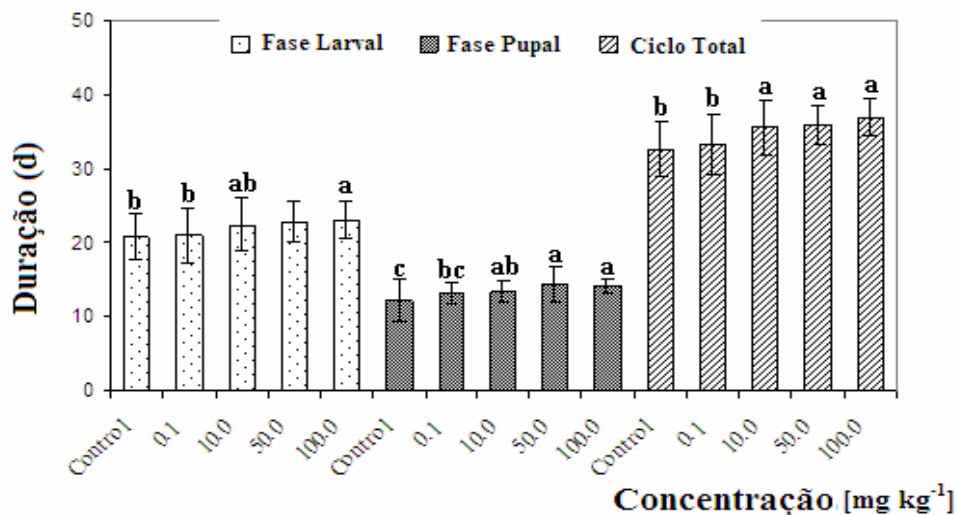
Avaliando-se os resultados obtidos para o ensaio de ingestão realizado com a amida **65**, observou-se que houve diferença estatística entre o tratamento e controle, tanto na fase larval, bem como na fase pupal, e conseqüentemente, em todo o ciclo do inseto (Figuras 12-14). Em relação à fase larval, observou-se um ciclo de  $20,8 \pm 3,2$  dias. Para a amida testada, nas concentrações de 100 e 50 mg/kg, observou-se, respectivamente um ciclo de  $23,1 \pm 2,9$  e  $22,9 \pm 2,9$  dias.

Já na fase pupal, o ciclo teve duração de  $12,1 \pm 2,9$  para o controle e para a amida na concentração de 100 mg/kg, de  $14,1 \pm 1,0$  dias. Pode-se observar um aumento na duração de ambas as fases, provocando um aumento no total do ciclo do inseto de 4,3 dias.

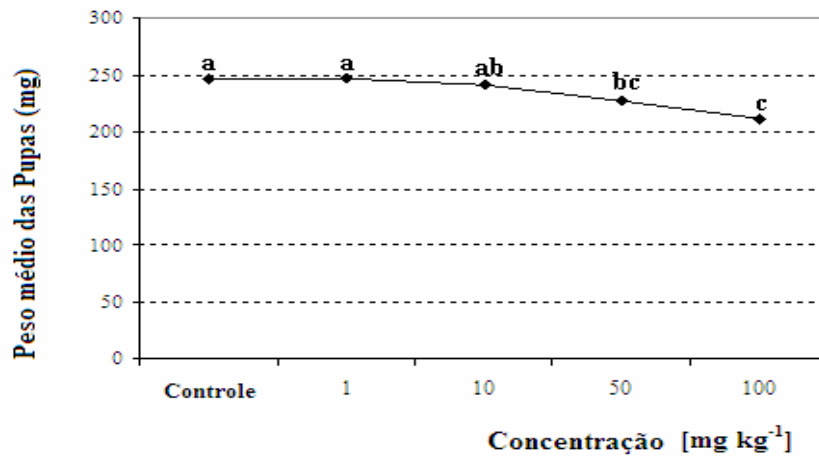
Em relação ao peso da pupa, a amida nas concentrações de 100 e 50 mg/kg, acarretou uma significativa redução de peso nas pupas. Já na concentração de 10 mg/kg, a redução foi moderada, e na concentração de 1,0 mg/kg, não se observou diferenças estatísticas em comparação com o controle.

Quanto à mortalidade, na fase larval, o controle apresentou um percentual de 16 % e nas concentrações de 10, 50, e 100 mg/kg, de 42%. Já na fase pupal, o controle apresentou mortalidade de 10 % e a amida testada, nas concentrações de 10, 50 e 100 mg/kg causou 35 % de mortalidade.

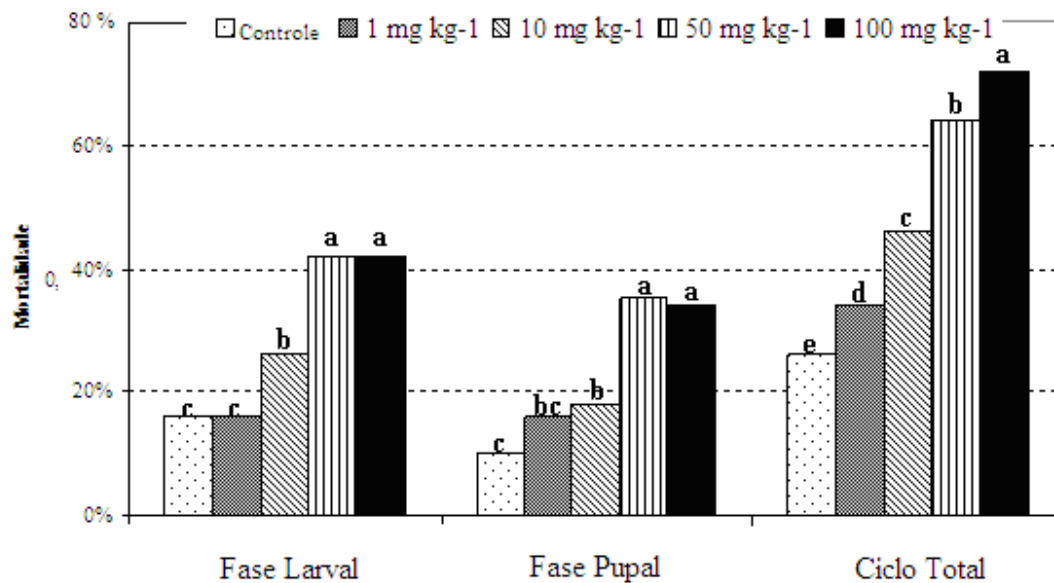
Em resumo, a amida **65** causou mortalidade nas concentrações de 10,0 a 1,0 mg/kg na fase larval e pupal, respectivamente, sendo o máximo de mortalidade para ambos de 100 mg/kg. Essas variações interferiram significativamente na mortalidade total observada durante o ciclo total, sendo que o controle apresentou mortalidade de 26 % e a amida, na concentração de 100,0 mg/kg causou 72 % de mortalidade.



**Figura 12:** Duração Média (dias) da fase larval, pupal e do ciclo total de *S. frugiperda* após ingestão da amida **65** via dieta artificial. \*Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, indicam que não houve diferença significativa no teste de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 13:** Peso médio das pupas após ingestão da amida **65** via dieta artificial. \*Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, indicam que não houve diferenças significativas no teste de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 14:** Mortalidade (%) na fase larval, pupal e no ciclo completo. Resultados seguidos de mesma letra indicam diferença não significativa no teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

Verificou-se que a amida **65** foi ativa por ingestão, corroborando com os resultados obtidos por Scott e McKibben<sup>40</sup> e Gbewonyo e col.<sup>41</sup> para extratos da planta *Piper sp.* frente a insetos que atacam grãos armazenados.

Quando se analisa o efeito da amida **65** durante todo o ciclo de vida do inseto, verifica-se que o aumento da amida na dieta artificial causa um prolongamento da fase larval e pupal e ainda uma diminuição no peso da pupa, e conseqüentemente, um aumento no tempo de desenvolvimento do inseto, aumentando o tempo de empupação e emergência dos adultos. Resultados similares foram obtidos por Dyer e col.<sup>34</sup> que testaram três amidas isoladas da planta *P. cenocladum*.

O prolongamento da fase larval e pupal associados à diminuição de peso da pupa indicam a inibição tanto do crescimento como do consumo de comida pelo inseto nas respectivas fases de acordo com Tanzubil e McCaffery.<sup>42</sup> Esta redução no crescimento pode indicar dois modos de ação da amida **65**: deterrência alimentar causando uma diminuição no consumo de comida e/ou efeito de toxicidade crônica após-ingestão.<sup>43</sup> Como conseqüência desses resultados, o inseto pode se tornar mais vulnerável a ação de patógenos e a variações do ambiente.<sup>42,44</sup>

Adultos que emergem de pupas com peso abaixo da média se tornam mais debilitados. O prolongamento do ciclo do inseto é interessante para a estratégia do MIP (Manejo Integrado de Pragas), diminuindo o número de insetos no campo.<sup>45</sup>

Os resultados dos bioensaios de contato e ingestão realizados com a amida **65** sugerem que o modo de ação da amida pode ser por toxicidade de contato, deterrência alimentar e/ou toxicidade crônica pós-ingestão.

Relações de estrutura-atividade indicam que os substituintes na porção amina da molécula e do anel aromático são essenciais para a atividade biológica. No entanto, observou-se atividades de moderadas a baixa para as amidas **66 - 70** e **72 - 75**. O grupo de Neal<sup>46</sup> descreveu que a fagaramida, um isômero natural da amida **68**

apresentou efeito de sinergismo junto a algumas toxinas, por exemplo, a xantotoxina, frente ao inseto *Heliothis zea*.

Os resultados obtidos para as piperamidas incentivaram um aprofundamento do estudo da atividade biológica frente a *S. frugiperda*, na tentativa se obter melhores interpretações das relações de estrutura-atividade.

### 3.2.2 - Atividade frente à *A. sexdens* e seu fungo simbiote

Em relação às formigas cortadeiras, os bioensaios foram realizados com operárias e também com o fungo simbiote, *L. gongylophorus*, no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) na UNESP de Rio Claro.

O crescimento do fungo foi avaliado utilizando-se como base o tamanho do miscélio e a densidade após 30 dias de incubação (Figura 15), utilizando-se o procedimento descrito por Pagnocca col.<sup>47</sup> Na Tabela 12 encontram-se os resultados obtidos para bioensaio realizado com o fungo simbiote da formiga cortadeira.



**Figura 15:** Experimento para avaliar a atividade inibitória das amidas no fungo *L. gongylophorus*

**Tabela 12:** Resultado de bioensaio com fungo simbiote

<b>Compostos</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Inibição (%)</b>
<b>65</b>	100	100
	50	100
	25	40
<b>66</b>	100	100
	50	100
	25	40
<b>67</b>	100	100
	50	40
	25	40
<b>68</b>	100	80
	50	80
	25	40
<b>69</b>	100	40
	50	20
<b>70</b>	100	20
<b>71</b>	100	0
<b>72</b>	100	0
<b>73</b>	100	0

Controle com ou sem solvente = 0 % de inibição do fungo

Em relação ao bioensaio realizado com as operárias de formigas cortadeiras, foram selecionadas formigas com massa corpórea entre 20 a 25 mg, randomicamente, de ninhos mantidos no CEIS. O total de 50 formigas foi colocado em placas de petri,



distribuídas de dez em dez, para cada tratamento, e o ensaio foi realizado em duplicata. Na Tabela 13 tem-se os resultados de sobrevivência apresentados pelas formigas.

**Tabela 13:** Resultado do bioensaio frente às formigas cortadeiras

Composto	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Dia										$S_{50}$
		1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Solvente (controle)	-	2	8	10	24	30	38	50	62	74	84	14a
65	25	2	4	4	18	32	38	56	66	80	86	13a
	50	4	4	8	22	30	46	62	74	92	96	12a
	100	2	4	4	18	32	44	66	78	90	100	12a
66	25	2	2	4	18	30	40	56	68	84	90	13a
	50	4	10	12	30	38	46	56	72	86	92	12a
	100	2	4	8	24	34	44	62	72	84	92	12a
67	25	0	0	4	26	36	38	54	70	84	88	14a
	50	0	2	6	18	28	40	58	70	80	92	13a
	100	2	6	12	26	40	48	78	88	98	100	11b
68	25	0	12	14	30	40	42	50	56	68	82	14a
	50	4	14	16	26	36	42	54	66	80	90	13a
	100	0	4	8	22	32	42	58	68	84	96	12a

69	25	0	6	6	16	34	44	58	72	90	96	13a
	50	0	2	4	20	30	38	56	66	84	90	13a
	100	0	2	4	14	26	44	66	84	98	100	12a
70	25	0	4	10	24	34	44	58	68	78	86	12a
	50	0	4	10	20	32	44	62	74	86	94	12a
	100	0	2	4	16	24	36	62	78	96	98	13a
71	25	4	8	12	32	44	44	52	64	78	88	14a
	50	4	4	4	22	30	42	54	66	82	94	14a
	100	2	6	8	22	38	46	60	72	84	94	13a
72	25	0	2	2	24	28	40	54	64	76	90	13a
	50	2	4	10	32	46	54	70	80	88	94	9a
	<b>100</b>	0	2	8	38	60	66	80	86	96	100	<b>7,5b</b>
73	25	0	4	4	20	32	40	48	66	80	90	15a
	50	2	2	6	16	28	40	58	70	86	92	13a
	100	2	6	6	24	32	48	68	82	98	98	11a

\* Letras diferentes após o valor de  $S_{50}$  indicam diferenças significativas no valor de log rank test

Muitas piperamidas que estão sendo estudadas têm mostrado atividade inseticida<sup>41</sup>,<sup>31,48,49</sup> ou deterrente para as formigas cortadeiras.<sup>34,50</sup>

Os dados mostraram que a sobrevivência das operárias de formigas alimentadas com dieta artificial contendo as amidas testadas foi reduzida ( $P < 0,05$ ) para o composto **67** e **72** na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . No entanto, os compostos **65**, **62**,

**68 - 71 e 73** não afetaram o valor de  $S_{50}$  (taxa de sobrevivência) para as concentrações testadas (25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 13).

A inibição total do crescimento do fungo simbiote na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  foi observada em relação aos compostos **65 - 67**. A inibição parcial foi observada em relação aos compostos **68** (80 %), **69** (40 %), e **70** (20 %), já os compostos **71 - 73** não causaram inibição na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . No entanto, os compostos **65** e **66** podem ser considerados os mais ativos, pois inibiram totalmente o crescimento do fungo na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 12).

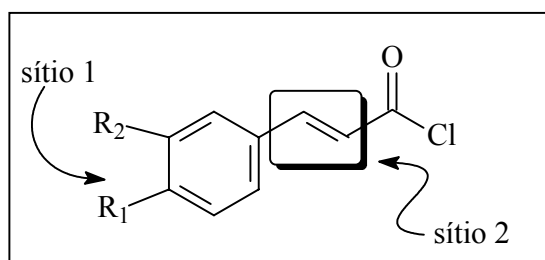
As nove piperamidas testadas possuem estrutura similar, pois possuem o grupo metilenodioxifenil (MDF), efetivo inibidor do citocromo P450, ligado à estrutura da amida. Fabricantes de inseticidas geralmente combinam em formulações compostos não tóxicos que possuem o grupo MDF na estrutura, como o butóxido de piperonila, por exemplo, a fim de aumentar o poder inseticida da formulação.<sup>51</sup>

Victor e col.<sup>52</sup> estudaram a atividade de um grupo de éteres sintéticos contendo o grupo piperonil frente à formiga *A. sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Foi possível realizar correlações de estrutura-atividade para os éteres estudados, variando-se o número de carbonos na cadeia lateral de 2 a 12 carbonos. A inibição do fungo foi observada para compostos com cadeia lateral contendo de 2 a 8 carbonos e em relação às operárias de formiga cortadeira, observou-se atividade para compostos com 10 e 12 carbonos na cadeia lateral.

Em relação às amidas estudadas neste trabalho, não foi possível estabelecer uma relação entre a estrutura e a atividade apresentada, sendo necessários estudos complementares para se obter essas informações a respeito da atividade desses compostos quando o inseto adquire um “status” de praga.

### 3.3 - Preparação de uma coleção indexada de piperamidas

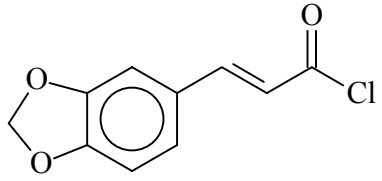
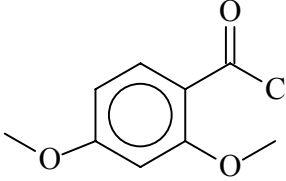
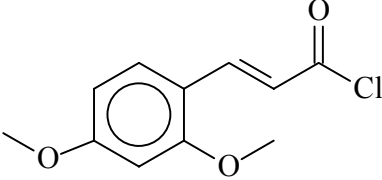
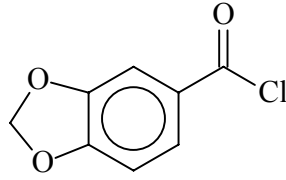
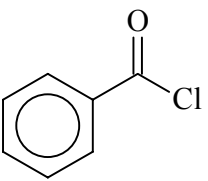
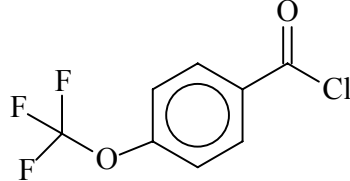
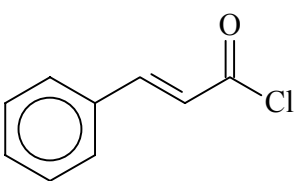
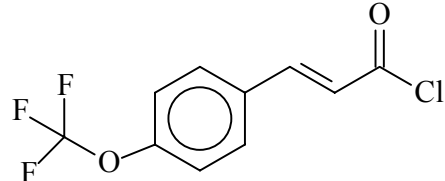
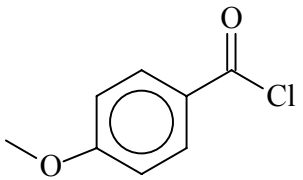
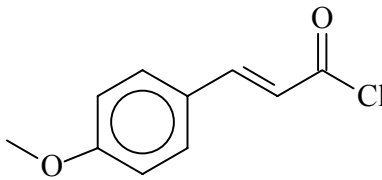
Considerando a atividade biológica proeminente encontrada para as amidas em estudo, propôs-se a preparação de uma coleção combinatória de amidas análogas ao composto **65**. A metodologia utilizada foi a desenvolvida por Smith e col.<sup>53</sup> para a preparação de uma coleção combinatória indexada, a qual permite, dentre as misturas de compostos, identificar qual(is) o(s) composto(s) responsável(is) pela atividade biológica. Optou-se por se utilizar 10 aminas diferentes (aromáticas, cíclicas e alifáticas) e também por se utilizar 10 diferentes cloretos de ácido, variando-se dois sítios na molécula, a substituição no anel benzênico e a presença ou não da dupla ligação entre o anel e a carbonila (Figura 16).



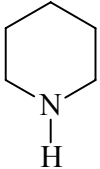
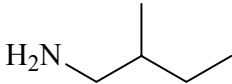
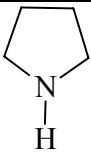
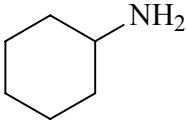
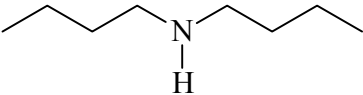
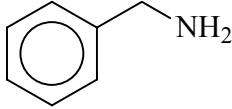
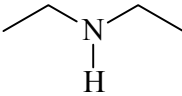
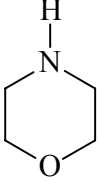
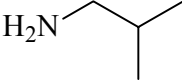
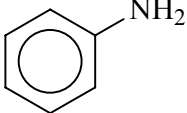
**Figura 16:** Diversidade dos cloretos de ácidos utilizados.

Nas Tabelas 14 e 15 estão listados os cloretos de ácidos e as aminas utilizadas na síntese da coleção combinatória.

**Tabela 14:** Cloretos de ácidos utilizados na síntese da coleção combinatória

Cloreto de Ácido	Estrutura	Cloreto de Ácido	Estrutura
A1		A6	
A2		A7	
A3		A8	
A4		A9	
A5		A10	

**Tabela 15:** Aminas utilizadas na síntese da coleção combinatória

Amina	Estrutura	Amina	Estrutura
<b>B1</b>		<b>B6</b>	
<b>B2</b>		<b>B7</b>	
<b>B3</b>		<b>B8</b>	
<b>B4</b>		<b>B9</b>	
<b>B5</b>		<b>B10</b>	

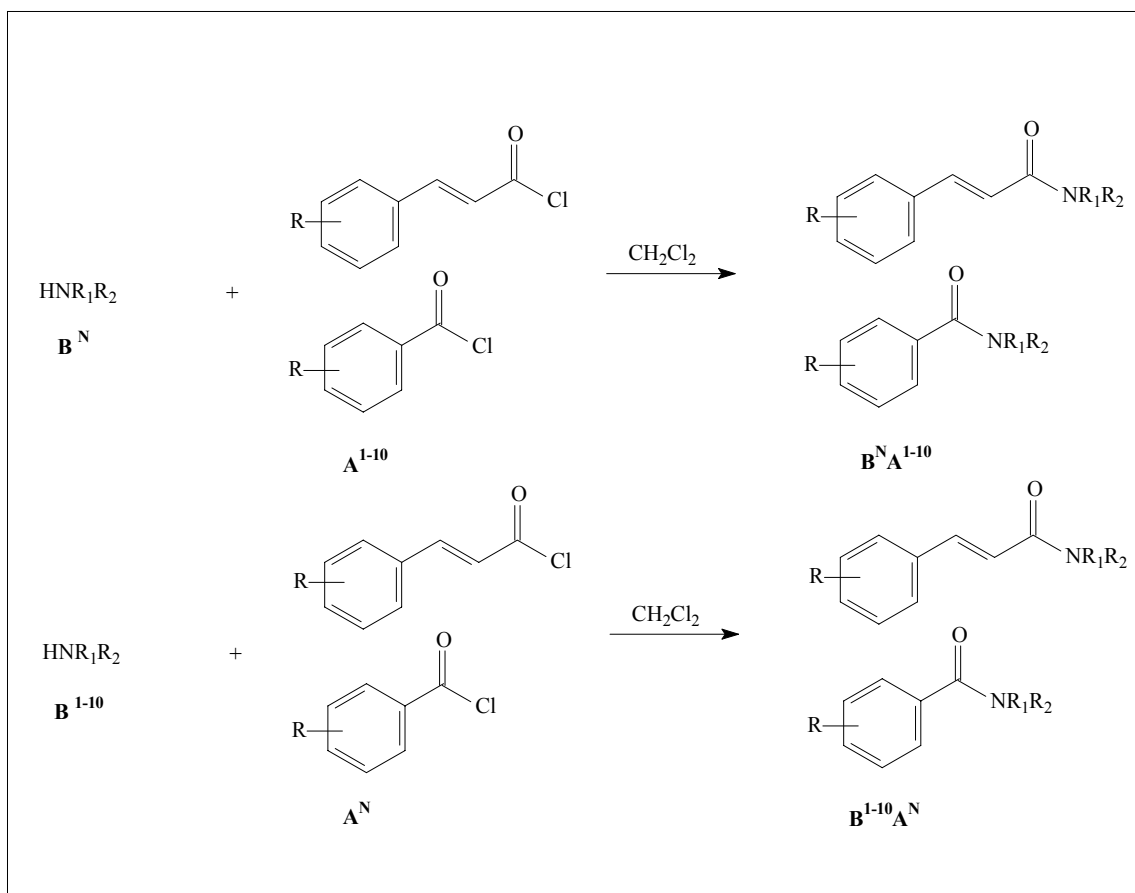
Na tabela 16 está representada a forma de análise de uma coleção combinatória indexada para a identificação de um composto ativo. Se uma das 100 substâncias preparadas fosse ativa, por exemplo, a amida  $A^5B^7$ , ela seria detectada em dois bioensaios: no ensaio das 10 amidas preparadas utilizando-se o cloreto de ácido  $A^5$  e no ensaio das 10 amidas preparadas utilizando-se a amida  $B^7$ .

**Tabela 16:** Estratégia de análise de uma coleção combinatória indexada em bioensaio

	$A^1B^{1-10}$	$A^2B^{1-10}$	$A^3B^{1-10}$	$A^4B^{1-10}$	$A^5B^{1-10}$	...	$A^7B^{1-10}$
$B^1A^{1-10}$							
$B^2A^{1-10}$							
$B^3A^{1-10}$							
$B^4A^{1-10}$							
$B^5A^{1-10}$							
...							
$B^7A^{1-10}$					$A^5B^7$		

As primeiras 10 misturas sintetizadas foram preparadas a partir da adição de 0,11 equivalente de cada amina ( $B^{1-10}$ ) a 1 equivalente do cloreto de ácido ( $A^N$ ). Esse procedimento foi realizado com os dez cloretos de ácidos escolhidos para a síntese da coleção combinatória, resultando-se em 100 diferentes amidas em mistura, agrupadas de dez em dez.

Concomitantemente, a 1,0 equivalente de uma determinada amina ( $B^N$ ), uma mistura de 0,11 equivalente de cada cloreto de ácido ( $A^{1-10}$ ) foi adicionado. Sendo assim, as mesmas 100 amidas obtidas anteriormente foram preparadas, no entanto, estão dispostas em meio à mistura de maneira diferente, formando uma coleção indexada. O Esquema 8 exemplifica o esquema de preparação da coleção combinatória.



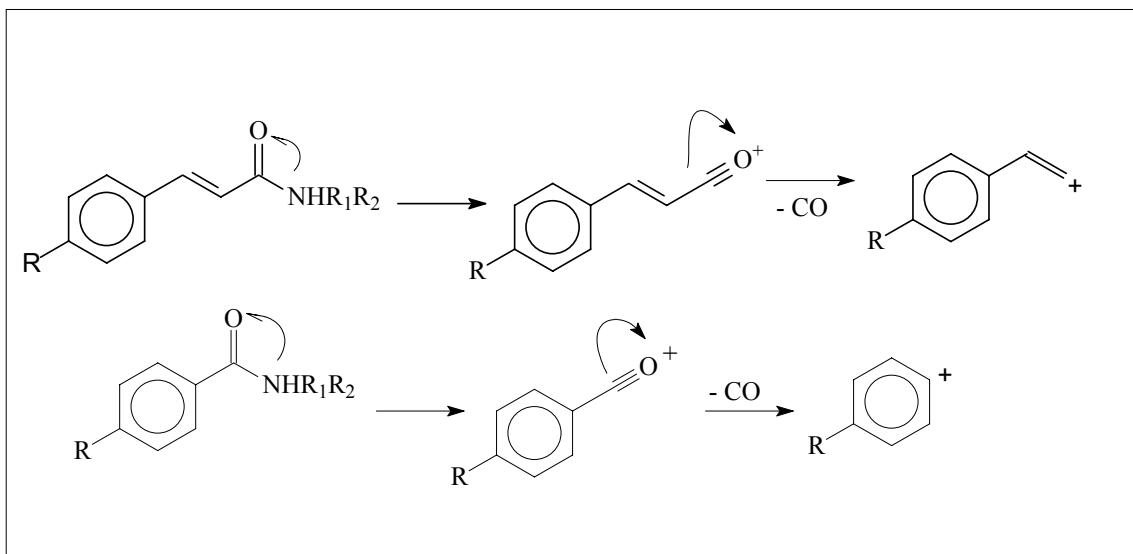
**Esquema 8:** Estratégia utilizada para preparação da coleção de amidas em solução.

### 3.4 - Análise da coleção de piperamidas por CG/EM

Após a preparação, as 20 coleções combinatórias obtidas ( $\text{A}^{1-10}\text{B}^{\text{N}}$  e  $\text{B}^{1-10}\text{A}^{\text{N}}$ ) foram analisadas por CG/EM. Por meio da análise do espectro de massas de cada sinal analítico obtido por cromatografia gasosa, foi possível identificar a maioria das amidas em meio às misturas.

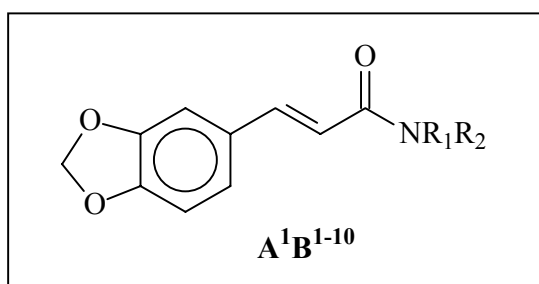
No Esquema 9 estão representadas as fragmentações para gerar o pico base para as amidas sintetizadas.

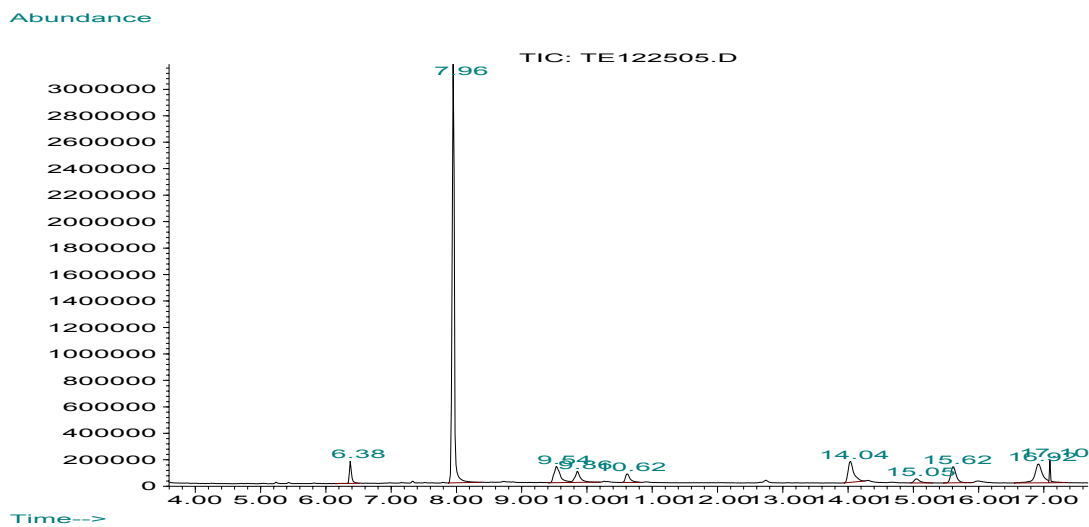




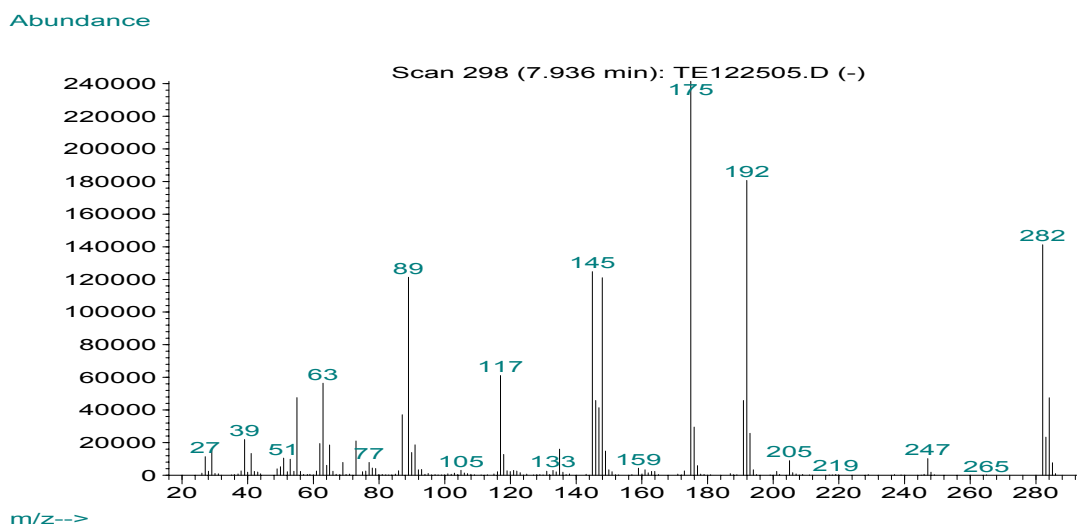
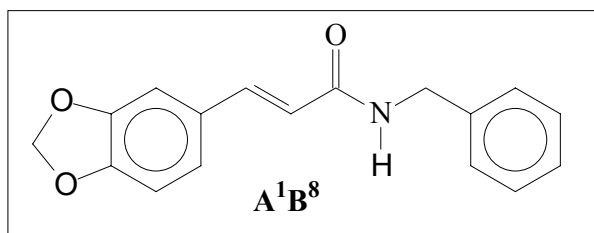
**Esquema 9:** Fragmentação típica para as amidas sintetizadas

As coleções  $A^1B^{1-10}$  e  $A^2B^{1-10}$  não tiveram a síntese bem sucedida. Na coleção  $A^1B^{1-10}$  apenas 2 amidas foram identificadas,  $A^1B^9$  (9,5 min) e  $A^1B^8$  (7,9 min) (Figura 17). A amida  $A^1B^8$ , derivada da benzilamina, foi o sinal analítico majoritário presente no cromatograma da mistura (Figura 18).



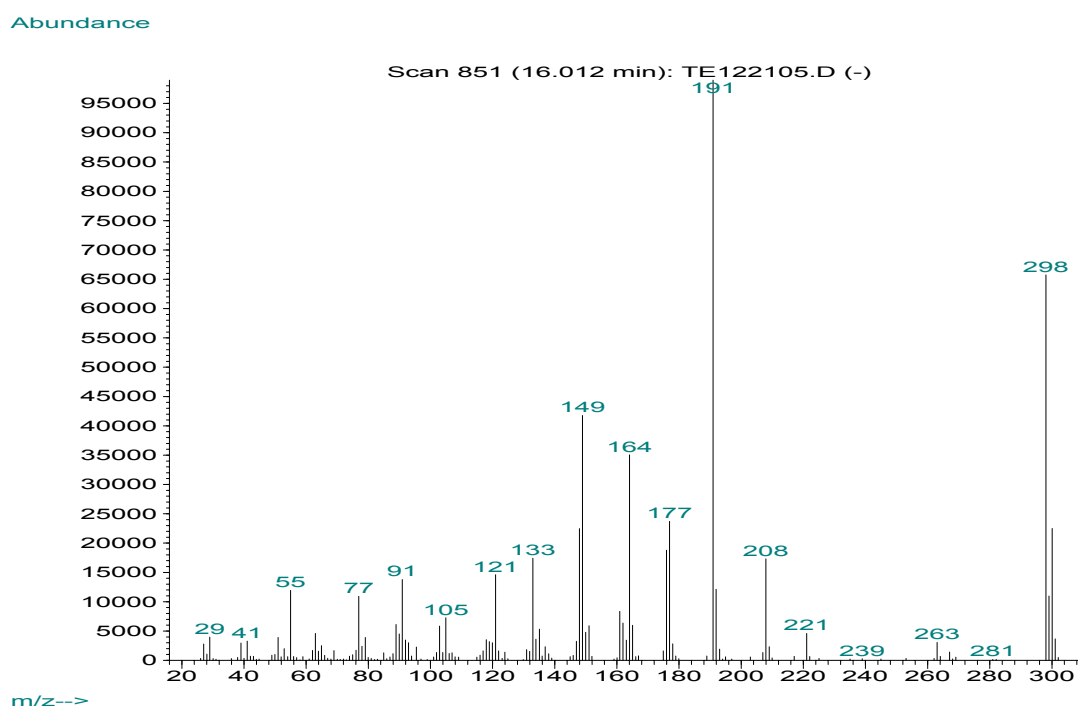
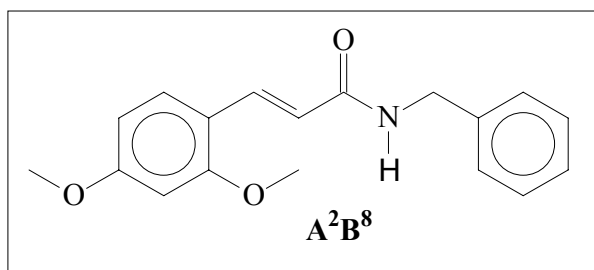


**Figura 17:** Cromatograma referente à mistura A<sup>1</sup>B<sup>1-10</sup>

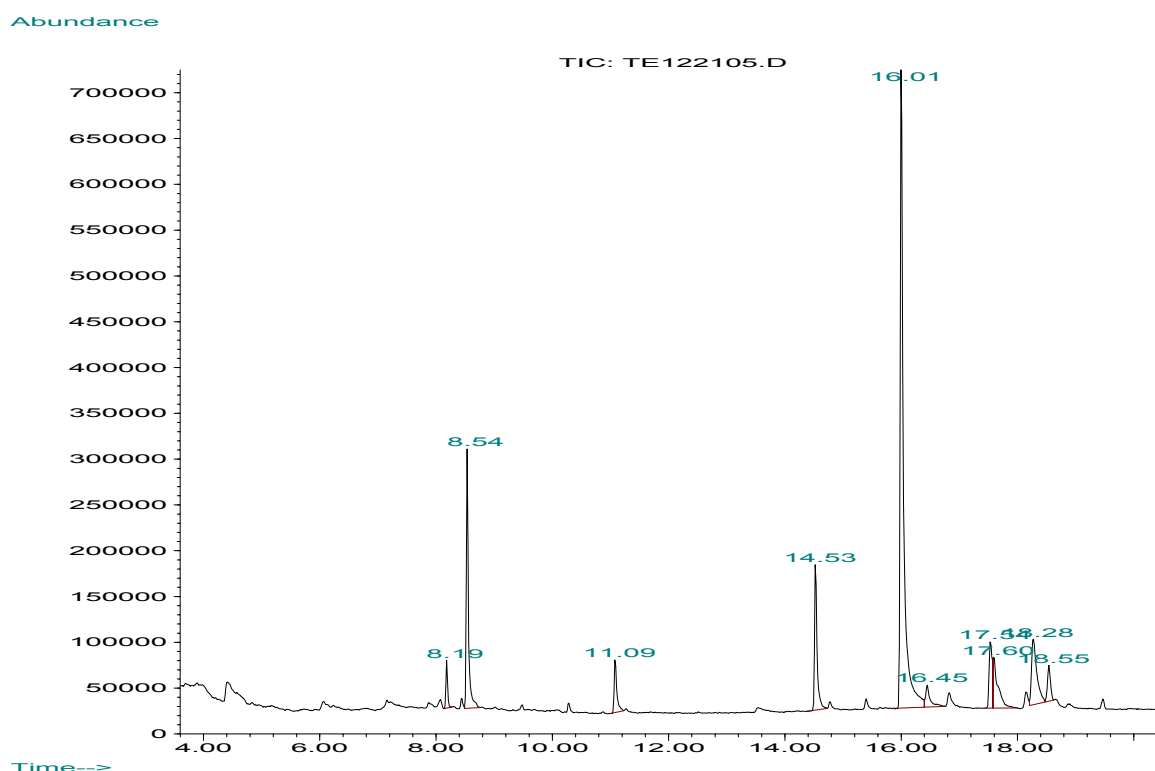


**Figura 18:** Espectro de massas da amida A<sup>1</sup>B<sup>8</sup>, tempo de retenção aproximado de 7,9 min.

Na coleção  $A^2B^{1-10}$  (Figura 20), apenas a amida  $A^2B^8$  (Figura 19), derivada da benzilamina foi detectada (tempo de retenção aproximado: 16,01 min).



**Figura 19:** Espectro de massas da amida  $A^2B^8$



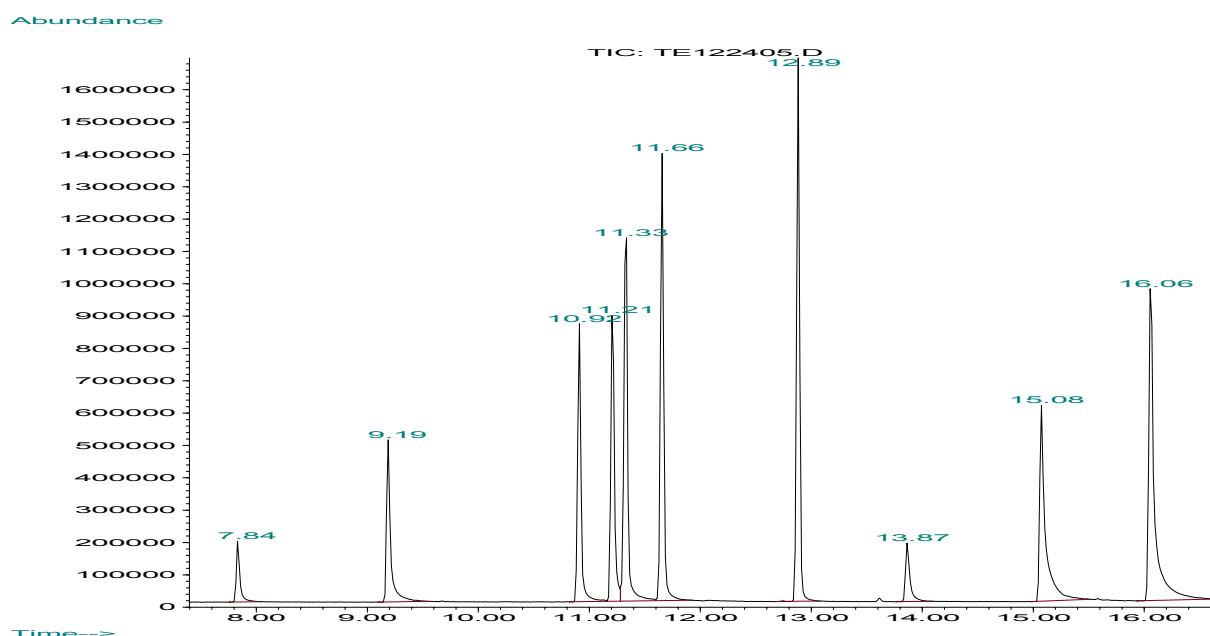
**Figura 20:** Cromatograma da coleção  $A^2B^{1-10}$

O cloreto de ácido  $A^1$  não tem boa reatividade frente a aminas, assim como o cloreto de ácido  $A^2$ , pois ambos possuem substituintes no anel benzênico doadores de elétrons, o que deixa a carbonila menos suscetível a um ataque nucleofílico.

No entanto, no caso do cloreto de ácido  $A^1$ , a não formação das amidas utilizando-se o método da química combinatória não prejudica o resultado do bioensaio da coleção indexada, pois as amidas correspondentes à coleção  $A^1B^{1-10}$  foram sintetizadas via síntese clássica, como descrito no item 3.1, e testadas frente a *S. frugiperda*. A atividade biológica dessas amidas frente à lagarta do-cartucho-do-milho já havia sido estabelecida, sendo a amida  $A^1B^1$  a mais ativa ( $DL_{50}$  1,07  $\mu\text{g}/\text{mg}$  larva).

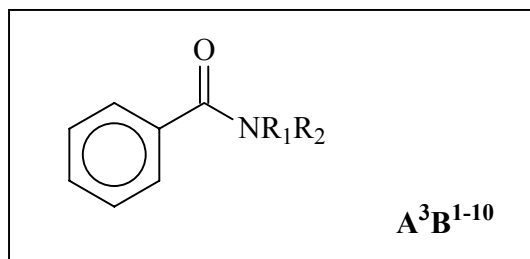
Os rendimentos obtidos na síntese das amidas via síntese clássica, tiveram grande variação, sendo alguns baixos (Tabela 9), corroborando o mau desempenho da síntese desses mesmos compostos via síntese combinatória.

Já para a mistura  $A^3B^{1-10}$ , foi possível detectar todas as amidas, mostrando que o cloreto de ácido  $A^3$  é um bom substrato para a formação de amidas. Na figura 21 vê-se o cromatograma obtido por CG/EM.



**Figura 21:** Cromatograma da mistura  $A^3B^{1-10}$

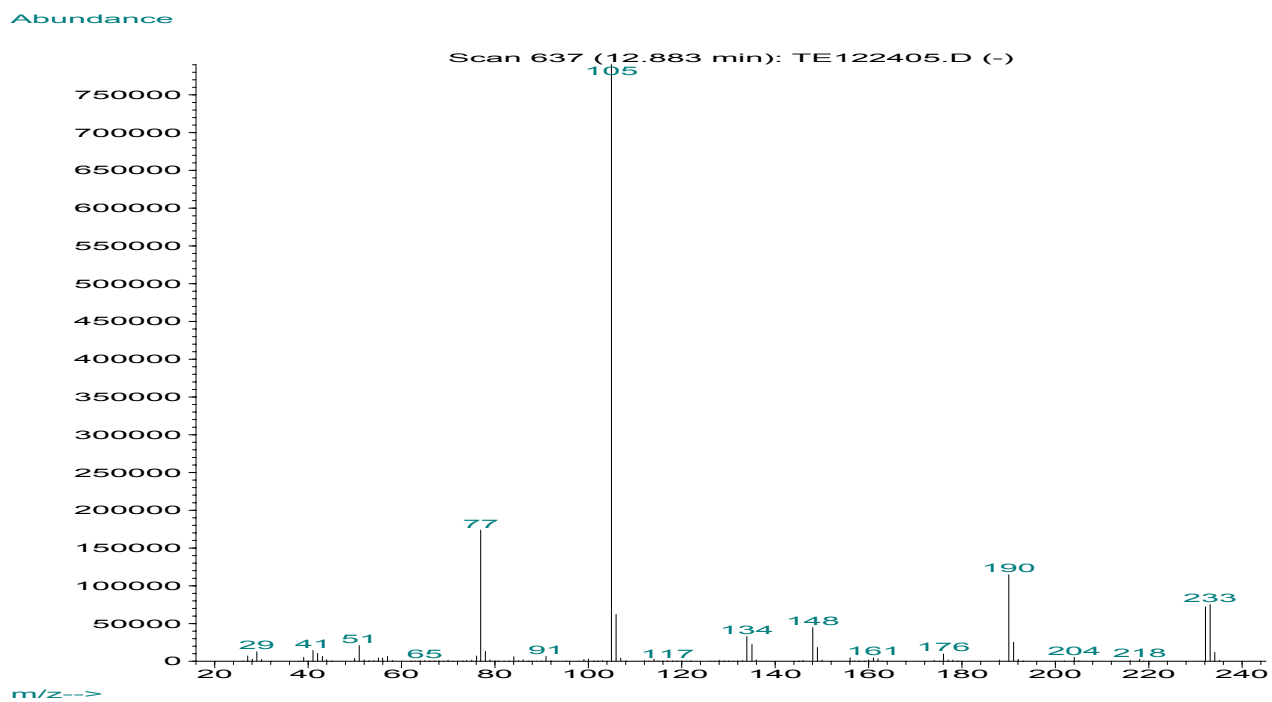
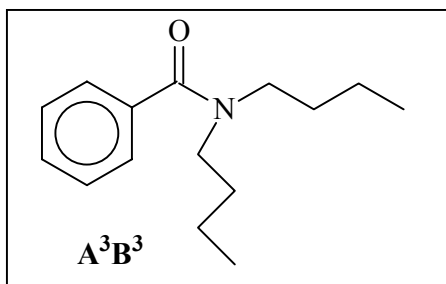
O pico base do espectro de massas das amidas referentes à mistura  $A^3B^{1-10}$  é o íon  $m/z$  105. Na Tabela 14, estão listadas as amidas identificadas nessa coleção e os respectivos tempos de retenção.



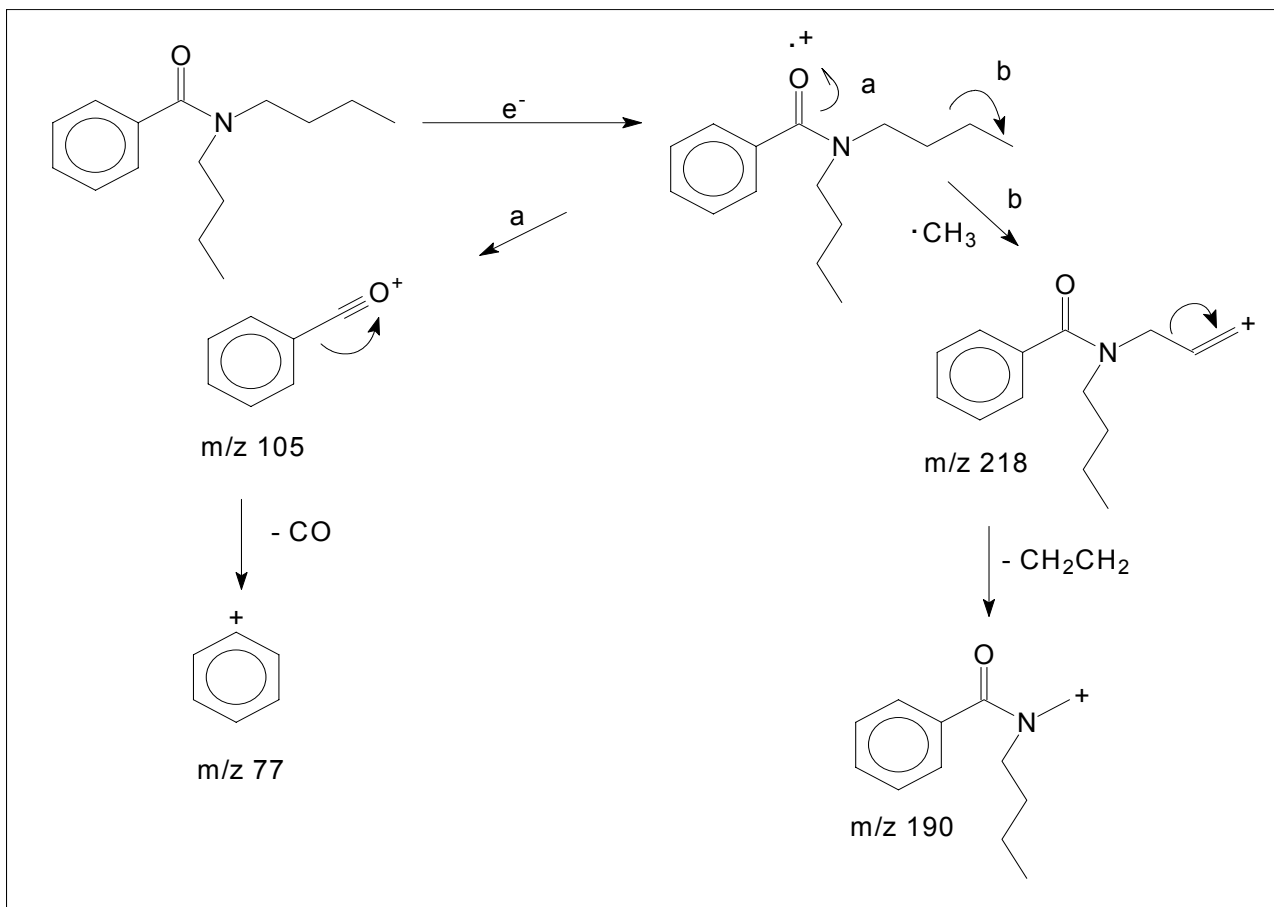
**Tabela 17:** Amidas identificadas na coleção A<sup>3</sup>B<sup>1-10</sup>

<b>Tempo de Retenção Aproximado (min.)</b>	<b>NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub></b>
7,8	Isobutilamina
9,2	Dietilamina
10,9	Morfolina
11,2	Pirrolidina
11,3	2-Metilbutilamina
11,6	Piperidina
12,8	Di-n-butilamina
13,8	Ciclohexilamina
15,1	Anilina
16,0	Benzilamina

No espectro de massas mostrado na Figura 22, vê-se a fragmentação referente à amida A<sup>3</sup>B<sup>3</sup> (Figura 22). O pico referente ao M<sup>+</sup> *m/z* 233 caracteriza a molécula. No Esquema 10 está apresentada a proposta de fragmentação para a amida A<sup>3</sup>B<sup>3</sup>.

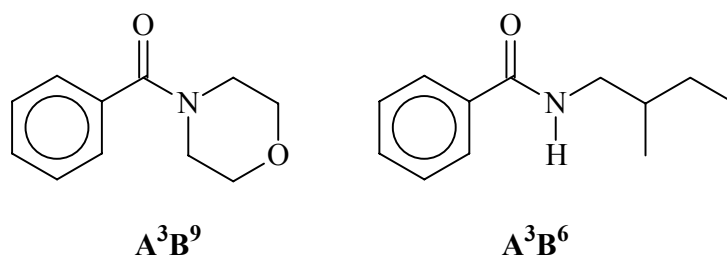


**Figura 22:** Espectro de massas da amida A<sup>3</sup>B<sup>3</sup>



**Esquema 10:** Proposta de fragmentação para a amida  $A^3B^3$ .

Dentre todas as amidas previstas na coleção, alguns compostos possuem a mesma massa molar. Por exemplo, as amidas derivadas das aminas  $B^4$  e  $B^5$ , e as aminas derivadas das aminas  $B^6$  e  $B^9$  (Figura 23).



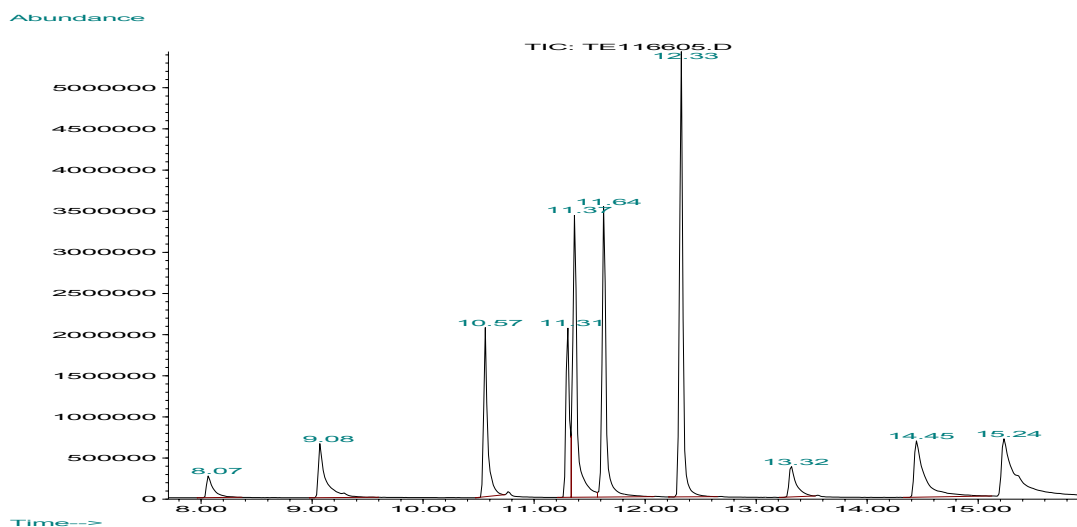
**Figura 23:** Amidas  $A^3B^9$  e  $A^3B^6$



As amidas derivadas da amina B<sup>4</sup> e B<sup>5</sup> são isômeros, e por meio apenas da espectrometria de massas não se pode afirmar a identidade dos compostos, sendo necessário a síntese das substâncias puras, a fim de serem utilizadas como padrão. No entanto, para os compostos derivados das amidas B<sup>6</sup> e B<sup>9</sup>, pode-se sugerir a identidade dos mesmos via espectrometria de massas, pois a amina B<sup>9</sup> possui um oxigênio em sua estrutura, e dessa maneira as aminas não possuem a mesma composição atômica. Outra possibilidade seria realizar uma identificação via espectrometria de massas de alta resolução, no entanto, vale ressaltar a necessidade de existir o acoplamento da cromatografia gasosa com a espectrometria de massas, pois se trata de uma mistura de compostos.

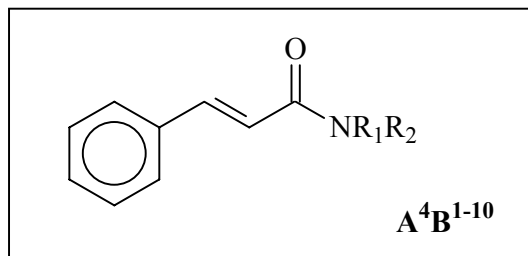
No entanto, esse grau de caracterização dos compostos não se faz necessário, pois se no bioensaio algum composto derivado dessas aminas apresentasse atividade biológica interessante, os mesmos seriam sintetizados via síntese clássica, purificados e caracterizados por meio dos procedimentos padrões e a atividade biológica seria comprovada.

Na coleção A<sup>4</sup>B<sup>1-10</sup> todas as amidas foram identificadas. Na Figura 24 está apresentado o cromatograma da mistura.



**Figura 24:** Cromatograma referente à mistura  $A^4B^{1-10}$ .

Na Tabela 6 estão listadas as amidas identificadas nessa coleção e os respectivos tempos de retenção.

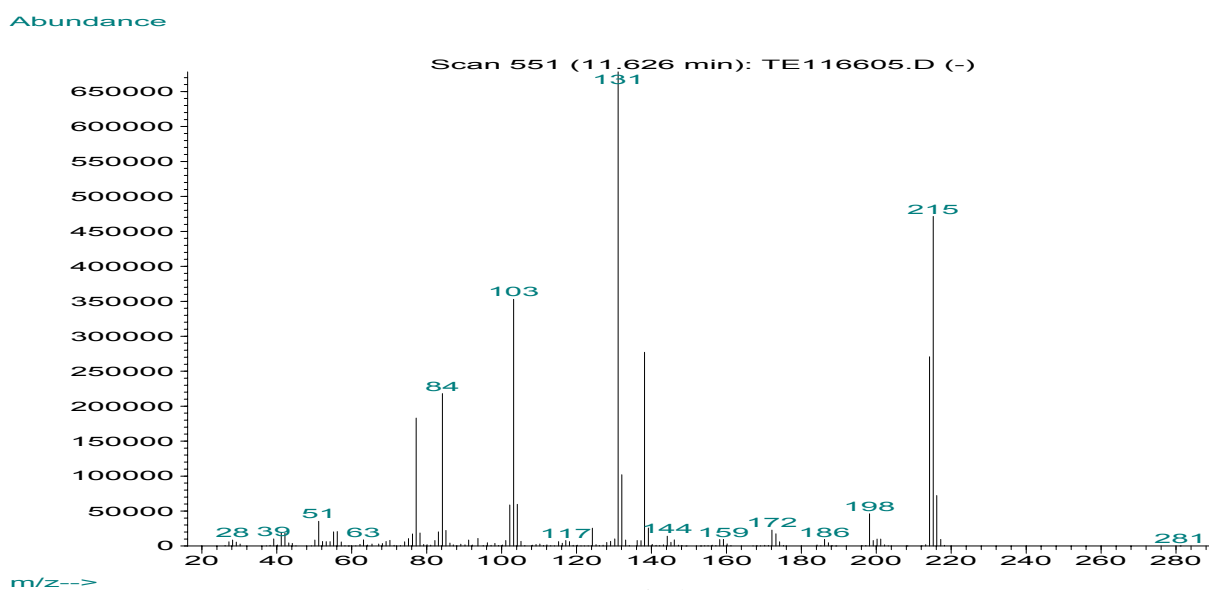
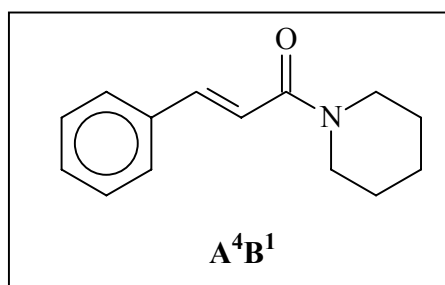


**Tabela 18:** Amidas identificadas  $A^4B^{1-10}$

Tempo de Retenção Aproximado (min.)	$NR_1R_2$
8,0	Isobutilamina
9,0	Dietilamina
10,5	Morfolina
11,3	Pirrolidina

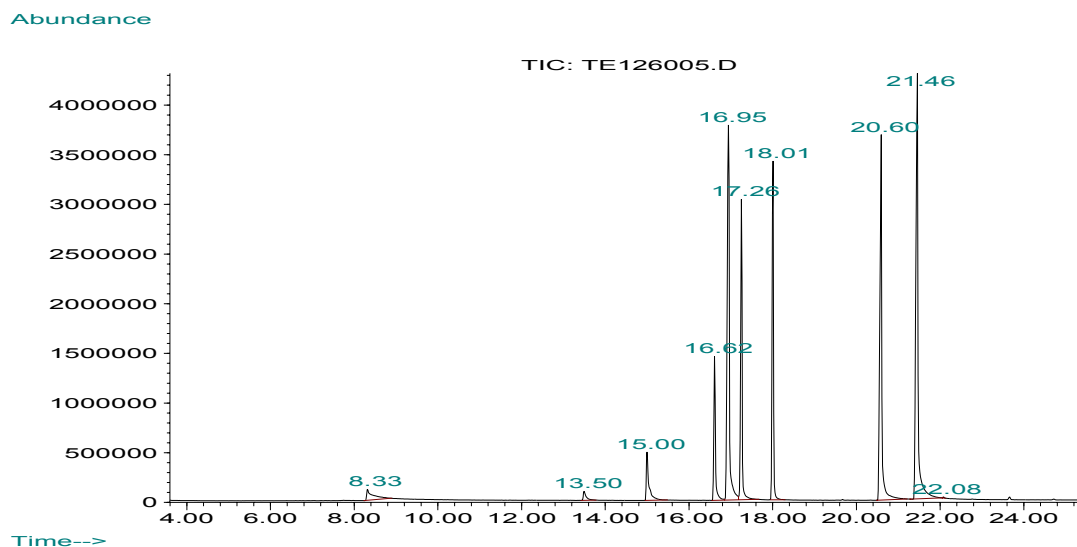
11,4	2-Metilbutilamina
11,6	Piperidina
12,3	Di-n-butilamina
13,3	Ciclohexilamina
14,4	Anilina
15,3	Benzilamina

Na mistura A<sup>4</sup>B<sup>1-10</sup> o pico base é o  $m/z$  131. Na Figura 25 está apresentado o espectro de massas referente à amida A<sup>4</sup>B<sup>1</sup>. O pico referente ao M<sup>+</sup> é o  $m/z$  215.

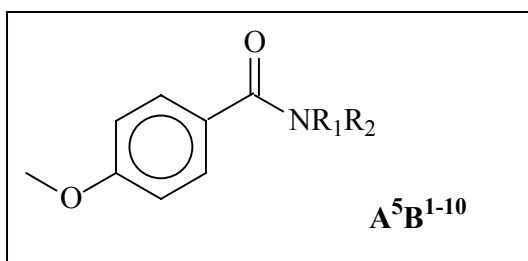


**Figura 25:** Espectro de massas da amida A<sup>4</sup>B<sup>1</sup>.

Na mistura  $A^5B^{1-10}$  oito amidas foram identificadas. As amidas  $A^5B^2$ , derivada da pirrolidina e  $A^5B^7$ , derivada da ciclohexilamina, não foram detectadas. Na Figura 26 está apresentado o cromatograma da mistura  $A^5B^{1-10}$ . O pico base para as amidas dessa mistura é o  $m/z$  135.



**Figura 26:** Cromatograma da mistura  $A^5B^{1-10}$

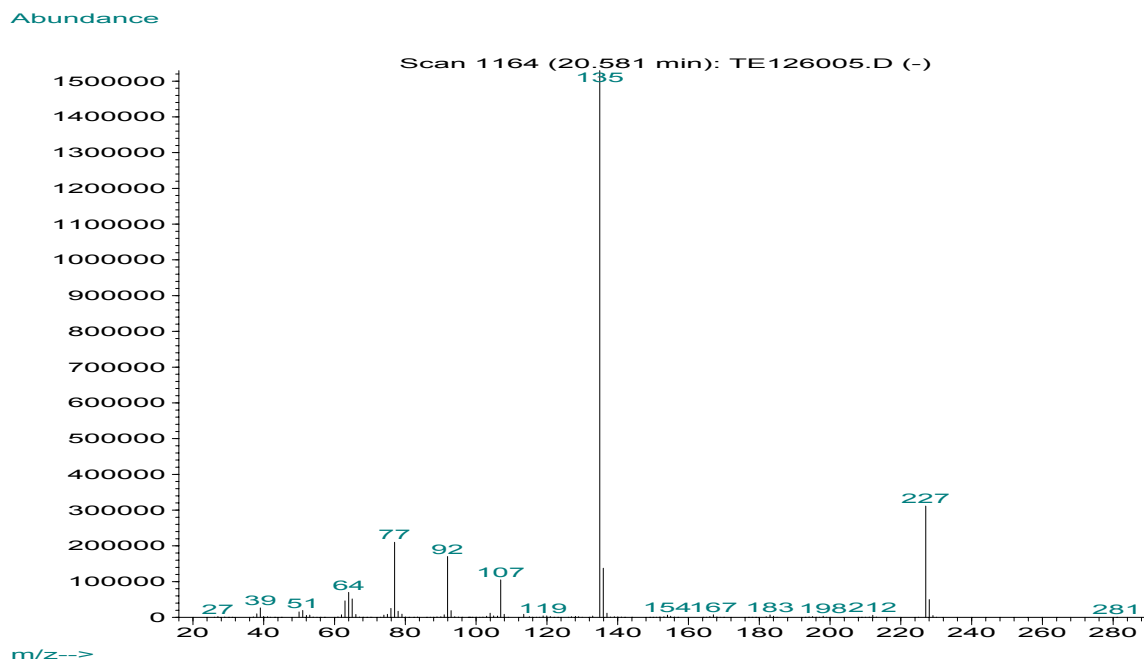
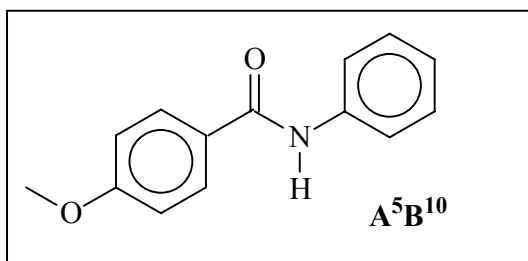


**Tabela 19:** Amidas identificadas  $A^5B^{1-10}$

Tempo de Retenção Aproximado (min.)	$NR_1R_2$
13,5	Isobutilamina
15,0	Diisopropilamina
16,6	Morfolina

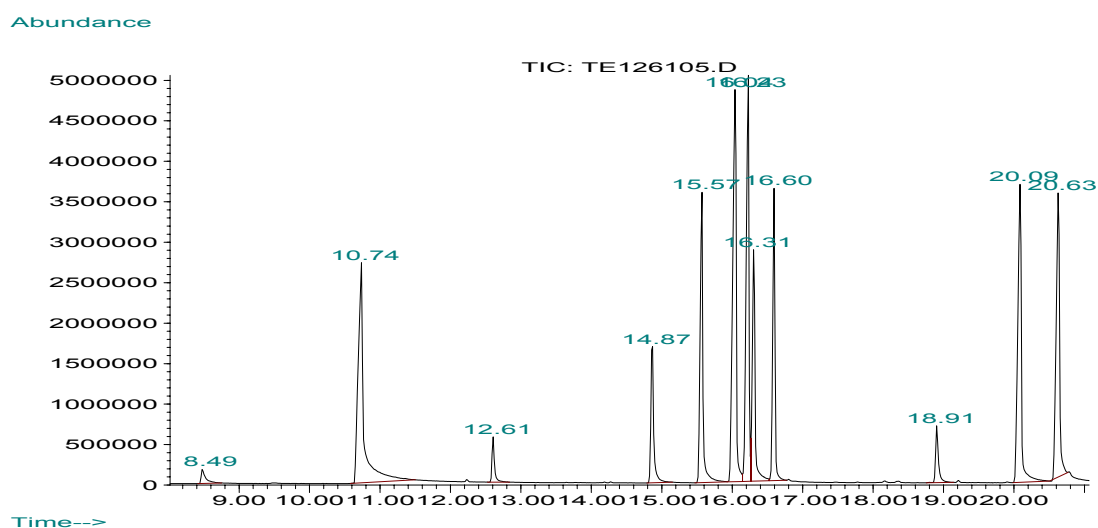
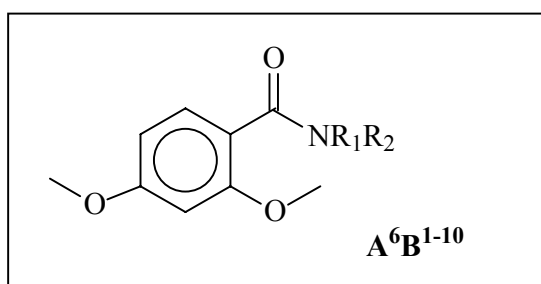
16,9	2-Metilbutilamina
17,2	Piperidina
17,9	Di-n-butilamina
20,6	Anilina
21,4	Benzilamina

Na figura 27 tem-se o espectro da amida  $A^5B^{10}$ . O pico referente ao íon molecular  $M^+$  é o  $m/z$  227.



**Figura 27:** Espectro de massas da amida  $A^5B^{10}$

Na coleção A<sup>6</sup>B<sup>1-10</sup> todas as amidas foram identificadas. Na Figura 28 está apresentado o cromatograma da mistura. O pico base característico é o *m/z* 165. Um exemplo é o espectro de massas da amida A<sup>6</sup>B<sup>8</sup> (Figura 29). O pico referente ao M<sup>+</sup> é o *m/z* 271, caracterizando a molécula.

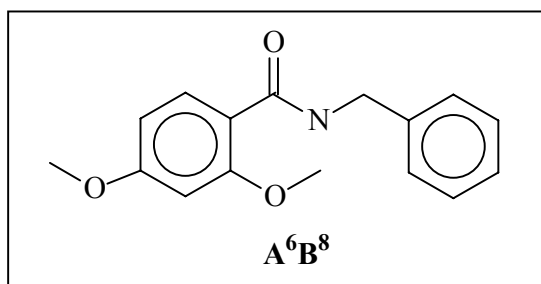


**Figura 28:** Cromatograma característico da mistura A<sup>6</sup>B<sup>1-10</sup>

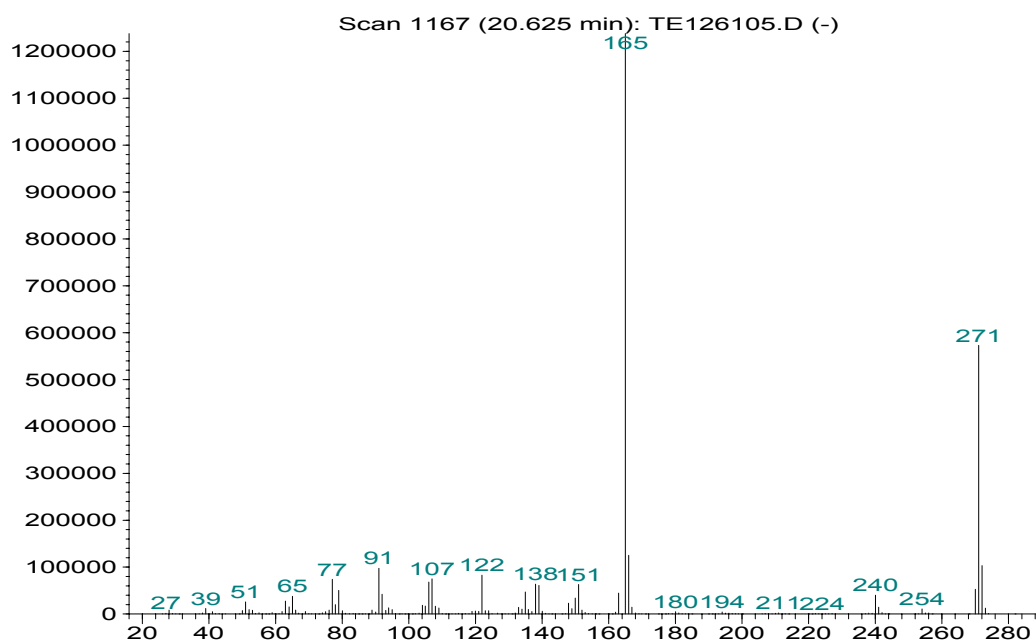
**Tabela 20:** Amidas identificadas A<sup>6</sup>B<sup>1-10</sup>

Tempo de Retenção Aproximado (min.)	NR <sub>1</sub> R <sub>2</sub>
12,6	Isobutilamina
14,8	Dietilamina
15,6	Pirrolidina

16,0	2-Metilbutilamina
16,2	Piperidina
16,3	Morfolina
16,6	Di-n-butilamina
18,8	Ciclohexilamina
20,0	Anilina
20,6	Benzilamina



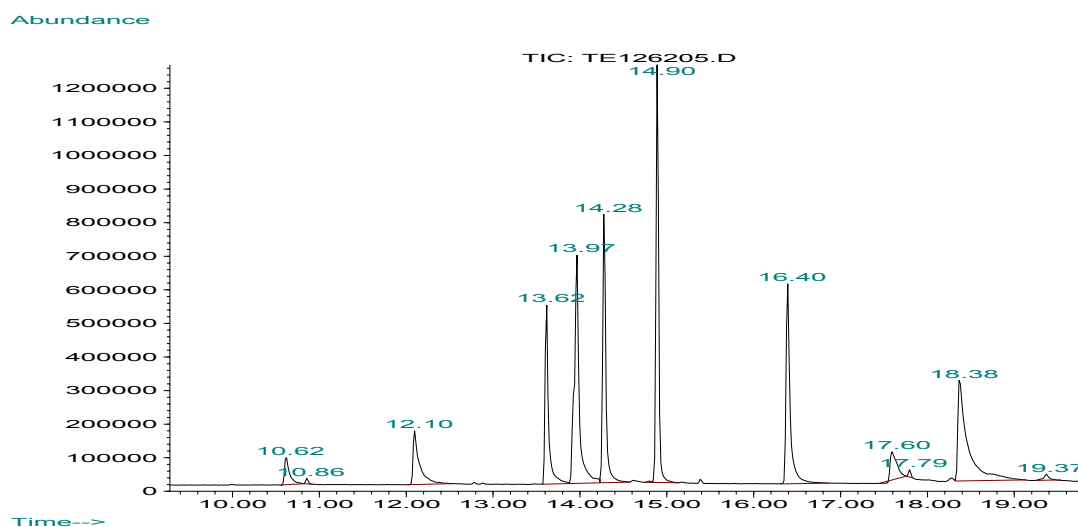
Abundance



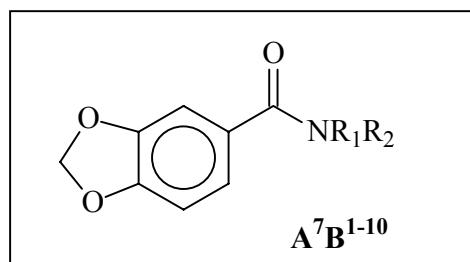
m/z-->

**Figura 29:** Espectro de Massas referente a amida A<sup>6</sup>B<sup>8</sup>

Na mistura  $A^7B^{1-10}$ , nove amidas foram identificadas. Somente a amida  $A^7B^2$  não foi detectada. Na Figura 30 está apresentado o cromatograma da mistura  $A^7B^{1-10}$ . O pico base para as amidas dessas misturas é  $m/z$  149.



**Figura 30:** Cromatograma da mistura  $A^7B^{1-10}$



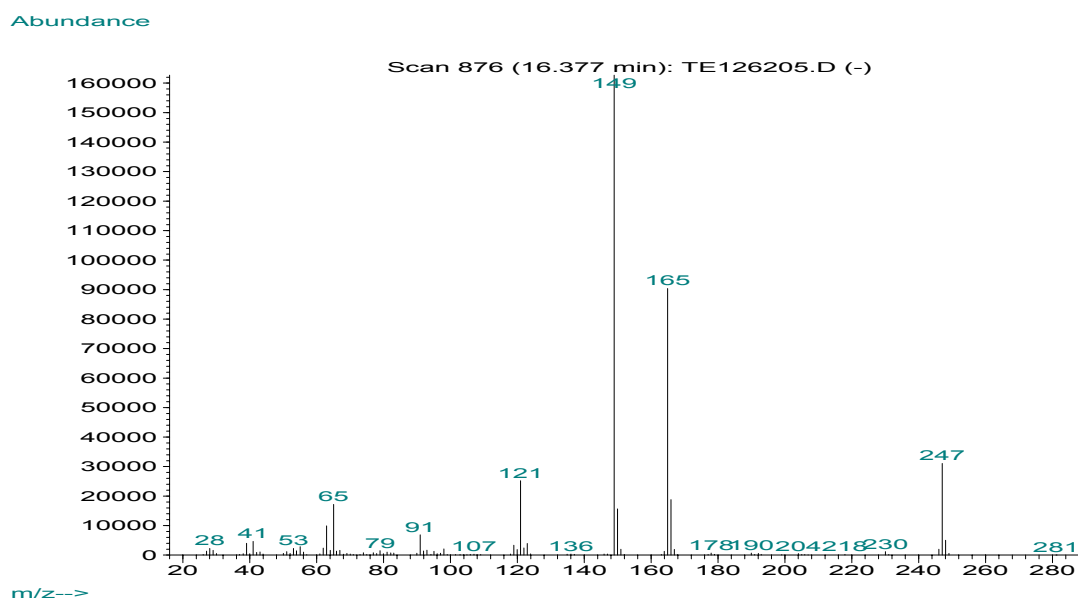
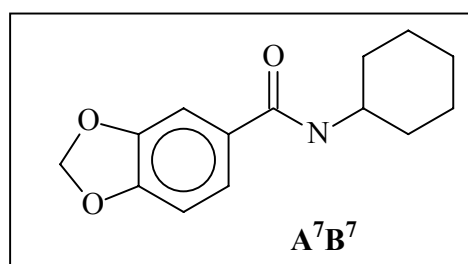
**Tabela 21:** Amidas identificadas na coleção  $A^7B^{1-10}$

Tempo de Retenção Aproximado (min.)	$NR_1R_2$
10,6	Isobutilamina
12,1	Dietilamina



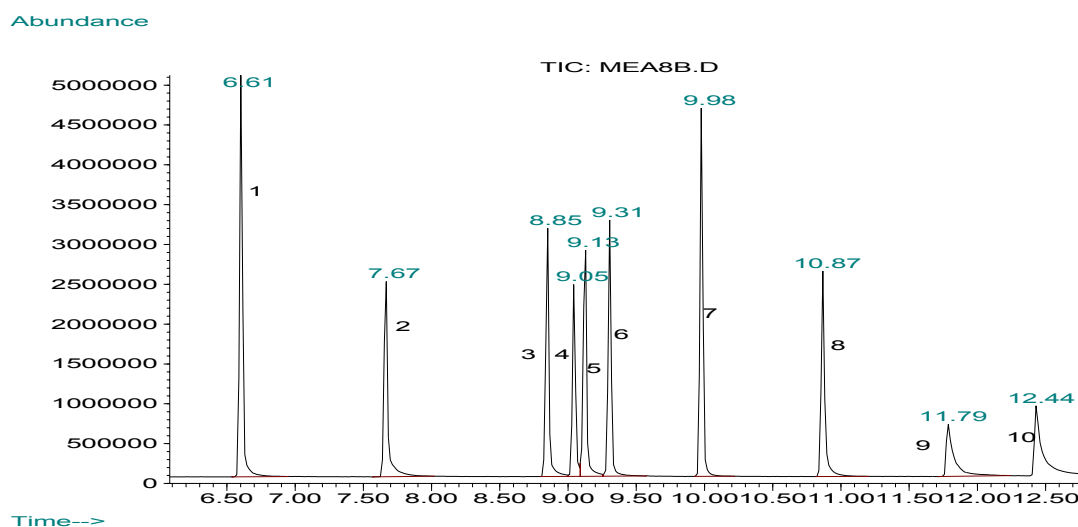
13,6	Morfolina
13,9	2-Metilbutilamina
14,2	Piperidina
14,9	Di-n-butilamina
16,4	Ciclohexilamina
17,6	Anilina
18,3	Benzilamina

Na Figura 31 tem-se o espectro de massas da amida  $A^7B^7$ . O pico do íon molecular  $M^+$  é o  $m/z$  247.

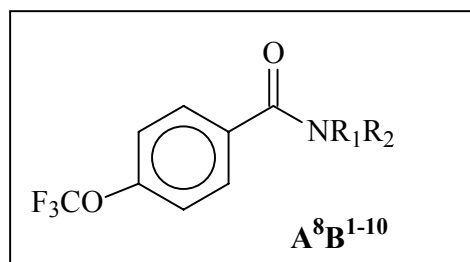


**Figura 31:** Espectro de massas da amida  $A^7B^7$

Na Figura 32 vê-se o cromatograma referente à mistura  $A^8B^{1-10}$ . Pode-se observar 10 picos referentes às dez amidas sintetizadas, listadas na Tabela 9, tendo o cloreto de ácido  $A^8$  como estrutura base para todas as moléculas.



**Figura 32:** Cromatograma referente à mistura  $A^8B^{1-10}$

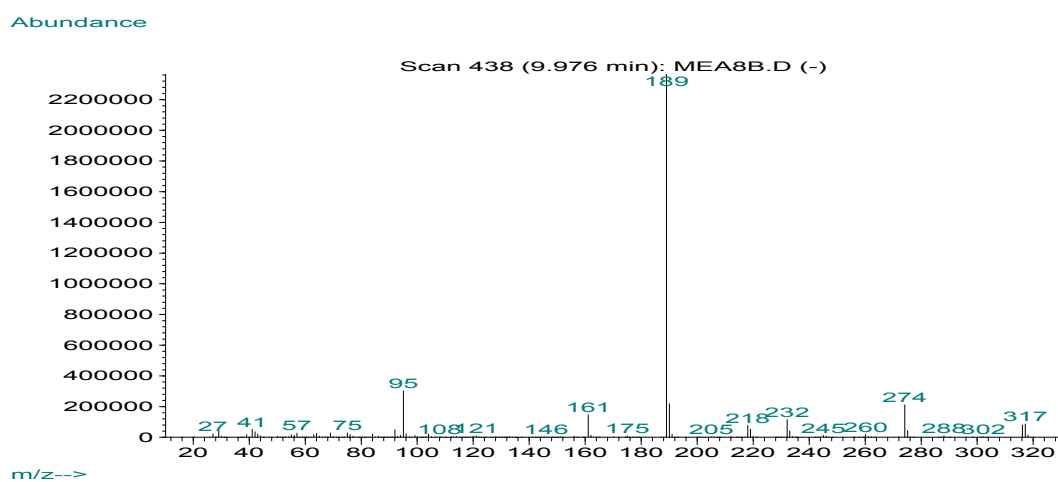
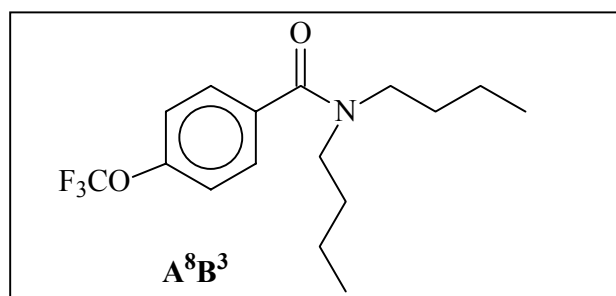


**Tabela 22:** Amidas identificadas na coleção  $A^8B^{1-10}$

Tempo de Retenção Aproximado (min.)	$NR_1R_2$
6,6	Dietilamina
7,6	Isobutilamina

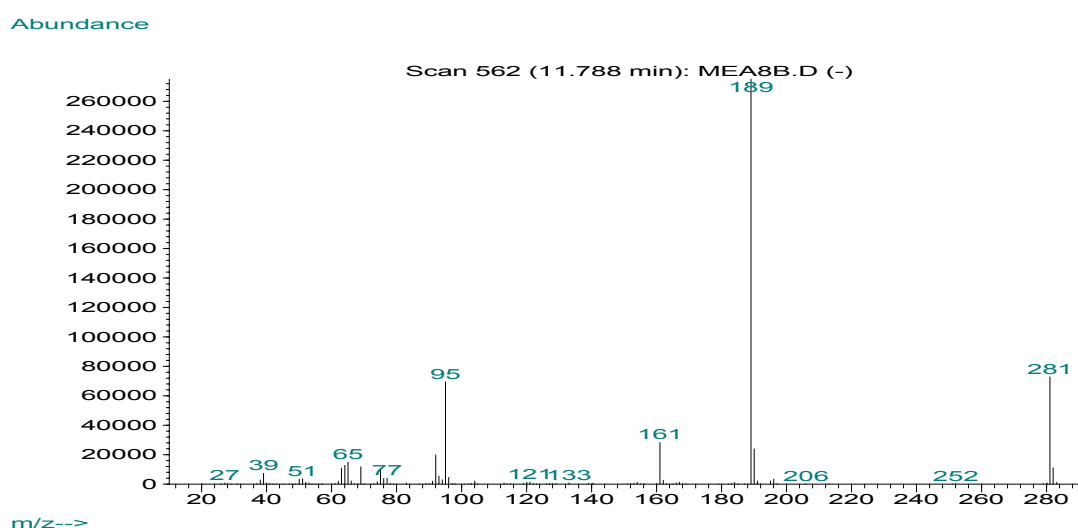
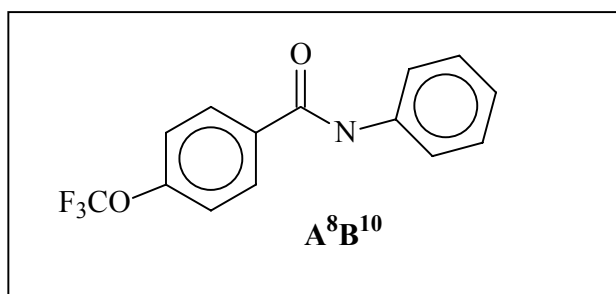
8,8	Morfolina
9,0	Pirrolidina
9,1	2-Metilbutilamina
9,3	Piperidina
9,9	Di-n-butilamina
10,8	Ciclohexilamina
11,8	Anilina
12,4	Benzilamina

Na Figura 33 vê-se o espectro de massas referente à amida  $A^8B^3$ , observando-se os íons referentes ao  $M^+$   $m/z$  317 e ao pico base  $m/z$  189, caracterizando a molécula.



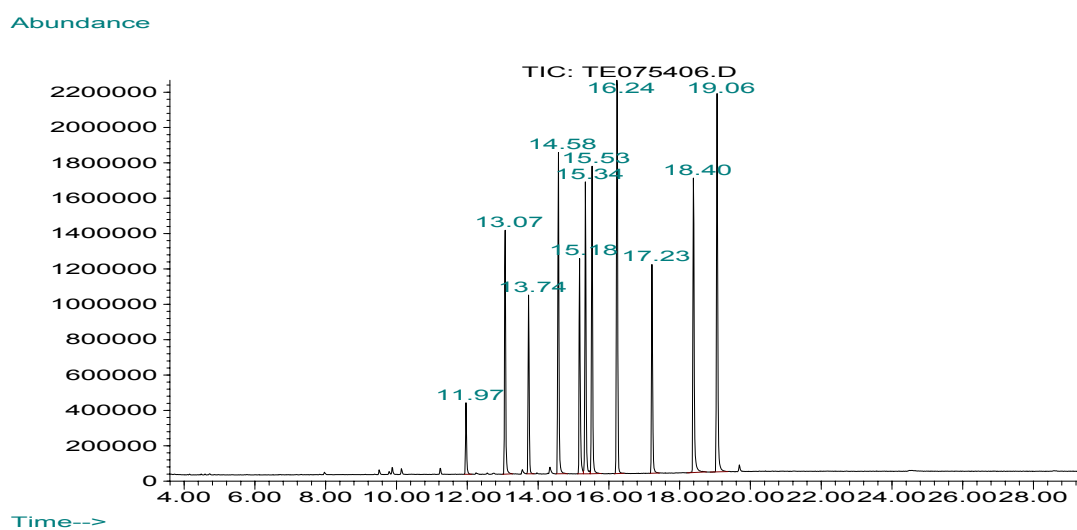
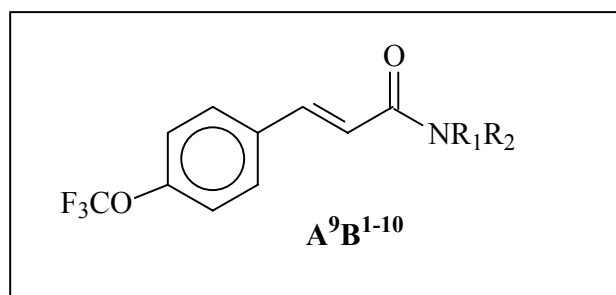
**Figura 33:** Espectro de Massas da amida  $A^8B^3$

Na Figura 34 vê-se o espectro de massas referente à amida  $A^8B^{10}$ , sendo o íon  $m/z$  281 referente ao  $M^+$ , e o pico base o  $m/z$  189.



**Figura 34:** Espectro de Massas da amida  $A^8B^{10}$

Na Figura 36 está apresentado o cromatograma referente à mistura  $A^9B^{1-10}$ , no qual 10 amidas são facilmente identificadas através do espectro de massas e 5 impurezas foram detectadas. As impurezas são provavelmente provenientes de reações paralelas com impurezas dos reagentes presentes no meio reacional. Na Tabela 20 estão listadas as amidas detectadas e seus respectivos tempos de retenção.

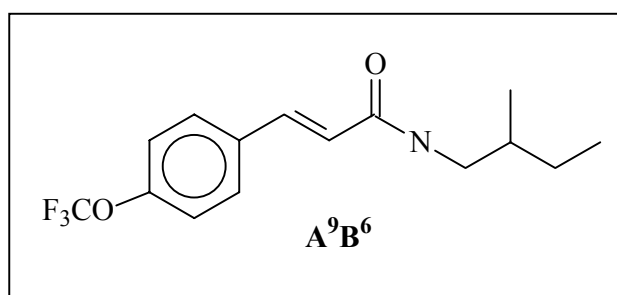


**Figura 35:** Cromatograma referente à coleção A<sup>9</sup>B<sup>1-10</sup>

**Tabela 23:** Amidas identificadas na coleção A<sup>9</sup>B<sup>1-10</sup>

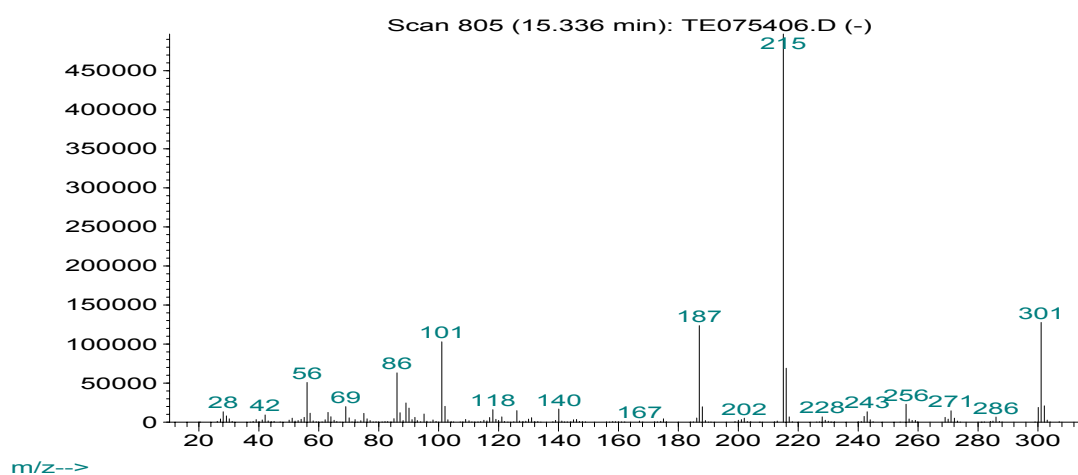
Tempo de Retenção Aproximado (min.)	NR <sub>1</sub> R <sub>2</sub>
11,8	Dietilamina/Isobutilamina
13,0	Dietilamina/Isobutilamina
14,5	Morfolina
15,1	Pirrolidina
15,3	2-metilbutilamina
15,4	Piperidina
16,1	Di-n-butilamina

17,2	Ciclohexilamina
18,4	Anilina
19,0	Benzilamina



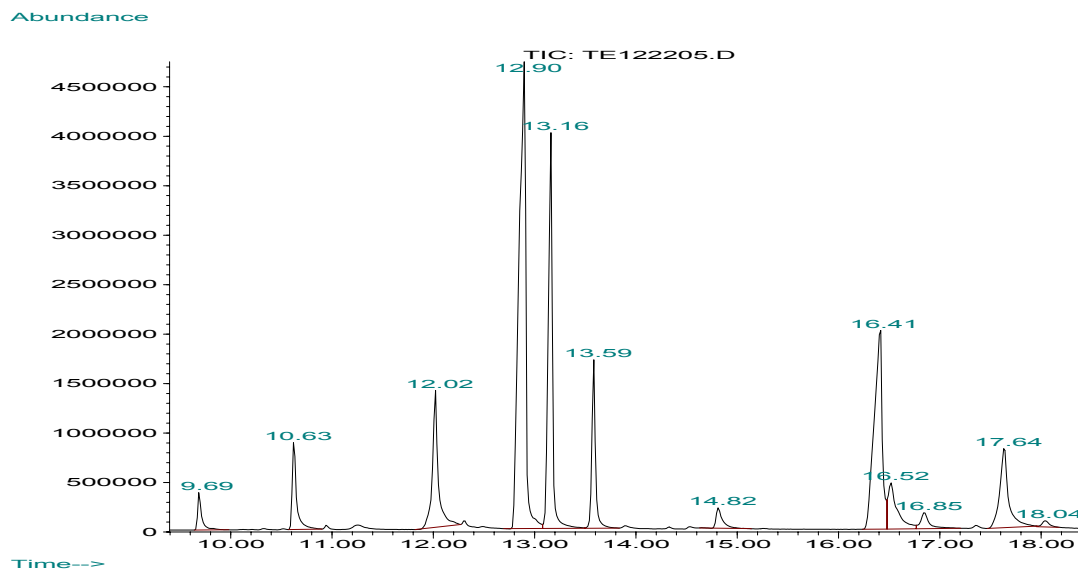
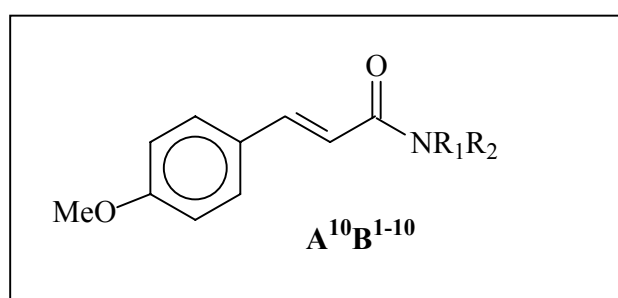
Na Figura 36 está mostrado o espectro de massas da amida A<sup>9</sup>B<sup>6</sup>. O pico base  $m/z$  215 é proveniente da quebra da ligação nitrogênio-carbono carbonílico. Todas as amidas seguem o mesmo padrão de fragmentação para gerar o íon referente ao pico base do espectro. O  $M^+$  de 301 confirma a identidade da amida A<sup>9</sup>B<sup>6</sup>.

Abundance



**Figura 36:** Espectro de massas referente à amida A<sup>9</sup>B<sup>6</sup>

Na coleção A<sup>10</sup>B<sup>1-10</sup> foi possível detectar 9 amidas em meio a mistura. Na Figura 37 vê-se o cromatograma obtido no CG/EM. Observam-se doze sinais analíticos majoritários, sendo três deles correspondentes a impurezas. Analisando-se o cromatograma obtido da mistura das aminas verifica-se a presença de algumas impurezas nos tempos de retenção de 16.5, 16.8 e 18.0 min.

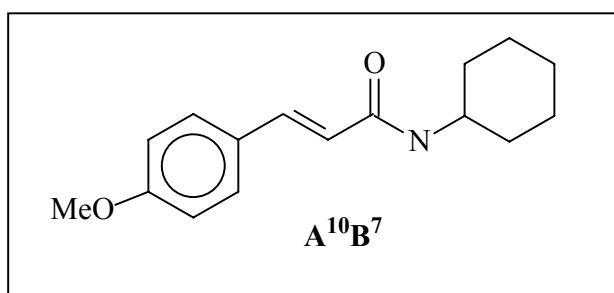


**Figura 37:** Cromatograma da mistura A<sup>10</sup>B<sup>1-10</sup>

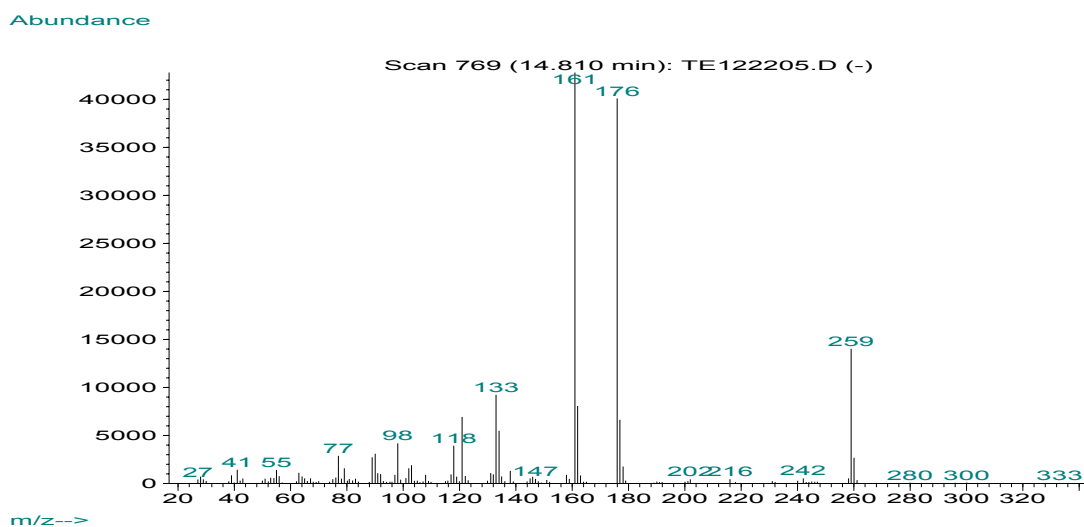
**Tabela 24:** Amidas identificadas na coleção A<sup>10</sup>B<sup>1-10</sup>

<b>Tempo de Retenção Aproximado (min.)</b>	<b>NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub></b>
9,6	Dietilamina/Isobutilamina
10,6	Dietilamina/Isobutilamina
12,0	Morfolina
12,8	Pirrolidina
13,1	Piperidina
13,5	Di-n-butilamina
14,8	Ciclohexilamina
16,4	Anilina
17,6	Benzilamina

Na Figura 38 tem-se o espectro de massas da amida A<sup>10</sup>B<sup>7</sup>. O pico base é o  $m/z$  161, caracterizando essa coleção A<sup>10</sup>B<sup>1-10</sup> e o M<sup>+</sup> é o pico com  $m/z$  259, caracterizando a amida derivada da ciclohexilamina.



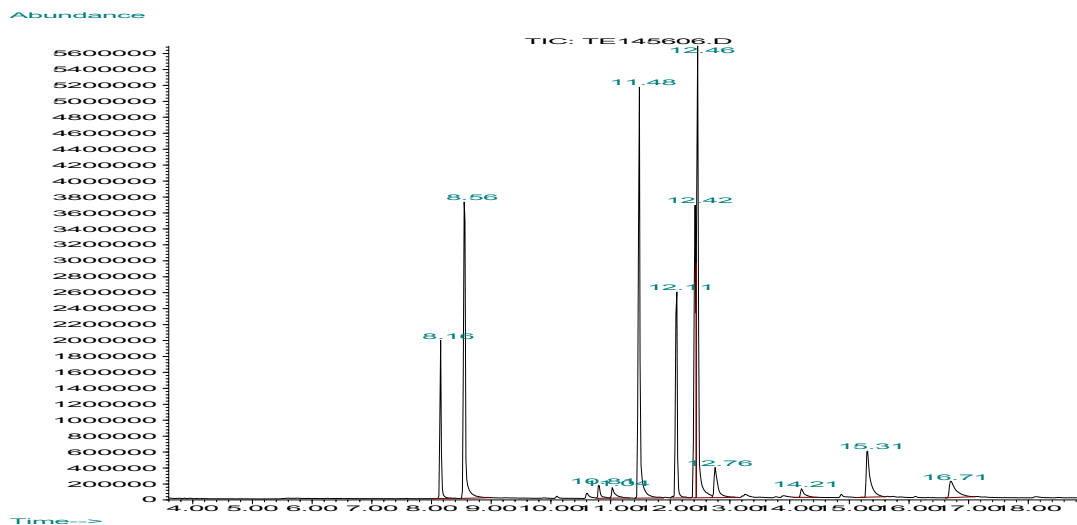




**Figura 38:** Espectro de massas da amida A<sup>10</sup>B<sup>7</sup>

Após a obtenção das 10 coleções, nas quais a diversidade estrutural foi devida à porção amina da molécula, fez-se a síntese das outras 10 coleções na qual a diversidade foi devida ao cloreto de ácido, denominadas B<sup>N</sup>A<sup>1-10</sup>.

Analisando-se o cromatograma obtido para a coleção B<sup>1</sup>A<sup>1-10</sup> (Figura 39), verificou-se a presença de 12 sinais analíticos, sendo 2 relativos a impurezas. Na Tabela 21 abaixo estão descritos os cloretos de ácido utilizados para a síntese das respectivas amidas encontradas nessa coleção e seus respectivos tempos de retenção.



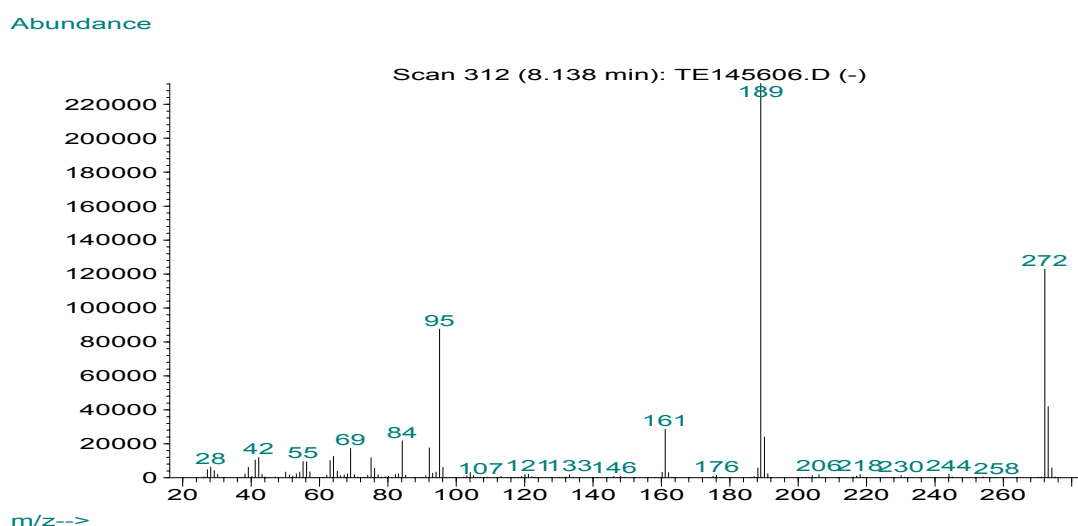
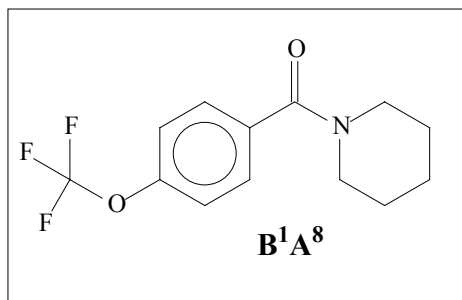
**Figura 39:** Cromatograma referente à coleção B<sup>1</sup>A<sup>1-10</sup>

**Tabela 25:** Amidas formadas na coleção B<sup>1</sup>A<sup>1-10</sup>

Tempo de Retenção Aproximado (min.)	Cloreto de Ácido
8,1	A <sup>8</sup>
8,5	A <sup>3</sup>
11,5	A <sup>5</sup>
12,1	A <sup>9</sup>
12,4	A <sup>7</sup>
12,5	A <sup>4</sup>
12,7	A <sup>6</sup>
14,2	A <sup>1</sup>
15,3	A <sup>10</sup>
16,7	A <sup>1</sup>

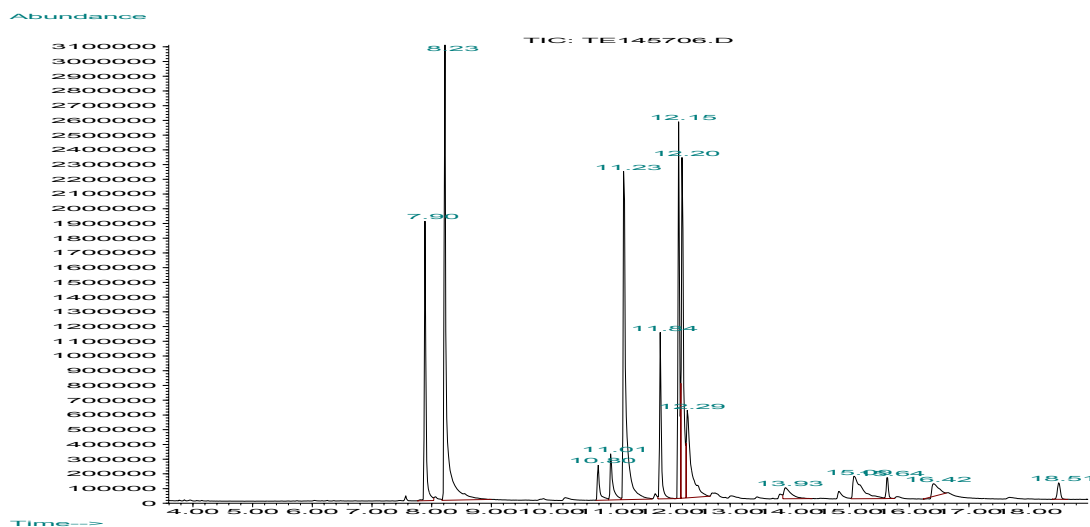
A amida derivada do cloreto de ácido A<sup>2</sup> não foi encontrada, o que corrobora os resultados obtidos na primeira etapa sintética, correspondente às amidas A<sup>N</sup>B<sup>1-10</sup>,

pois na maioria das coleções da primeira etapa, a coleção  $A^2B^{1-10}$  não foi obtida com sucesso, pois não houve a formação da maioria dos compostos. Na Figura 40 vê-se o espectro de massas da amida  $B^1A^8$ .



**Figura 40:** Espectro de massas da amida  $B^1A^8$

Na Tabela 22 estão relacionadas às amidas formadas na síntese da coleção  $B^2A^{1-10}$  (Figura 41). Apenas a amida derivada do cloreto de ácido  $A^2$  não foi encontrada na mistura, sendo que a amida majoritária, ou seja, a que apresentou o sinal analítico de maior intensidade no cromatograma foi à derivada do cloreto de ácido  $A^3$ , que não possui nenhum grupo substituinte no anel benzênico, sendo um cloreto bastante reativo.

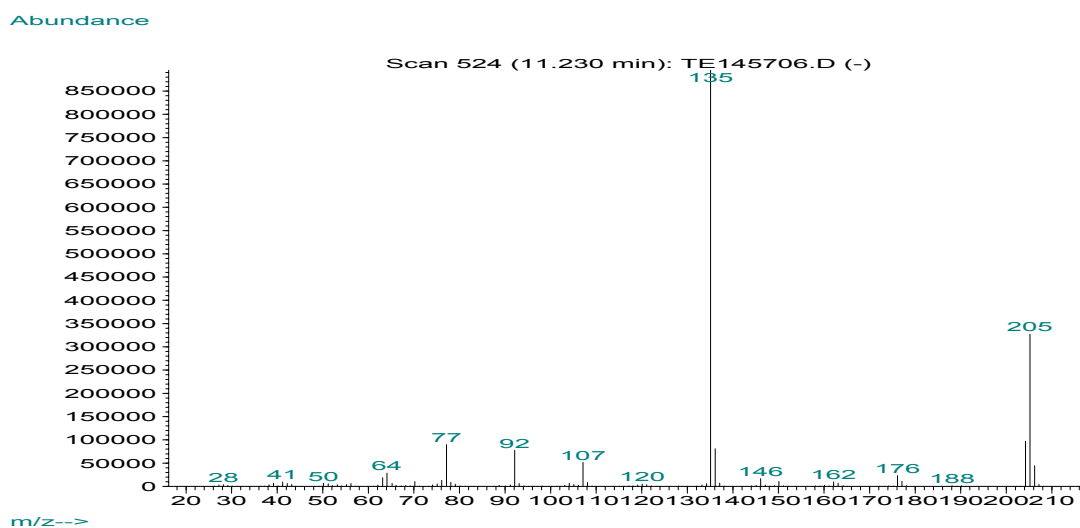
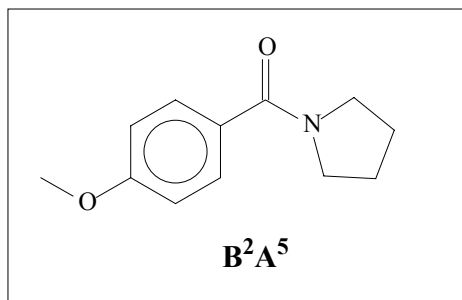


**Figura 41:** Cromatograma referente à mistura B<sup>2</sup>A<sup>1-10</sup>

**Tabela 26:** Amidas formadas na coleção B<sup>2</sup>A<sup>1-10</sup>

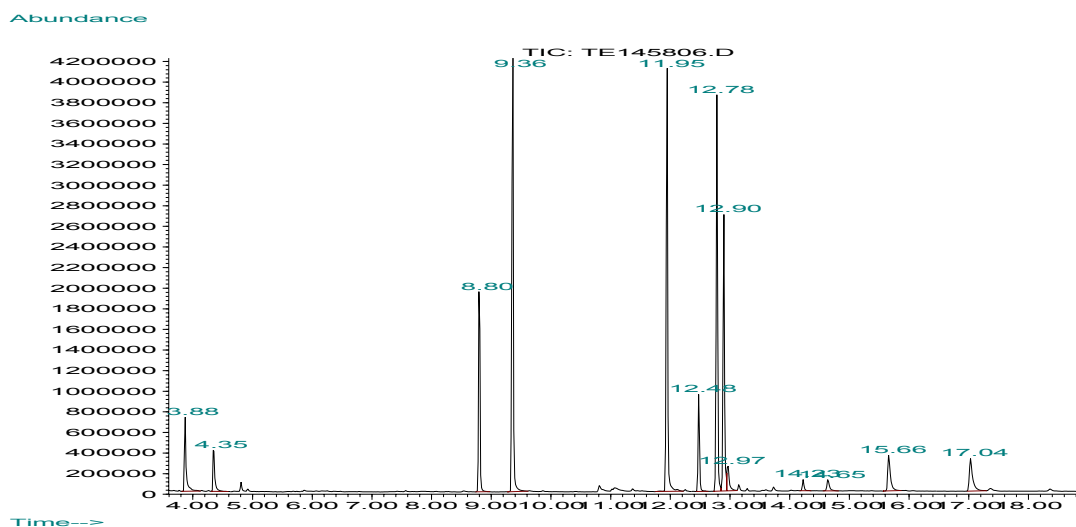
Tempo de Retenção Aproximado (min)	Cloreto de Ácido
7,9	A <sup>8</sup>
8,2	A <sup>3</sup>
11,2	A <sup>5</sup>
11,8	A <sup>9</sup>
12,1	A <sup>7</sup>
12,2	A <sup>4</sup>
12,3	A <sup>6</sup>
15,0	A <sup>10</sup>
16,4	A <sup>1</sup>

Na Figura 42 tem-se o espectro de massas referente a amida B<sup>2</sup>A<sup>5</sup>. O pico base é o  $m/z$  135, característico do cloreto de ácido A<sup>5</sup>. O pico do íon molecular M<sup>+</sup> 205 caracteriza a molécula.



**Figura 42:** Espectro de Massas referente à amida B<sup>2</sup>A<sup>5</sup>.

Na Tabela 23 estão descritas as amidas obtidas na síntese da coleção B<sup>3</sup>A<sup>1-10</sup> (Figura 43).



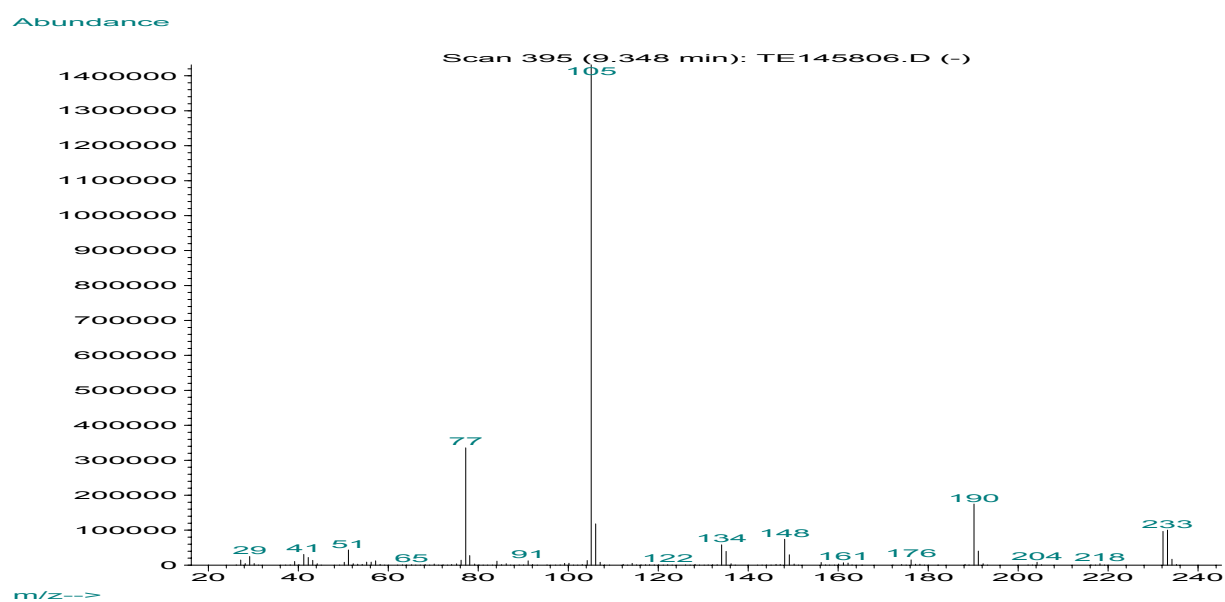
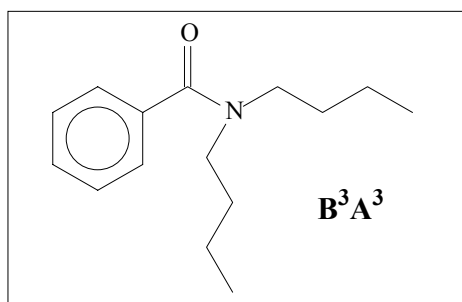
**Figura 43:** Cromatograma referente à mistura B<sup>3</sup>A<sup>1-10</sup>

Nesta coleção foi possível detectar 9 sinais analíticos, sendo que a única amida não detectada é derivada do cloreto de ácido A<sup>2</sup>. Os cloretos de ácidos que tiveram que foram mais reativos nessa coleção foram A<sup>3</sup>, A<sup>5</sup> e A<sup>7</sup>.

**Tabela 27:** Amidas formadas na coleção B<sup>3</sup>A<sup>1-10</sup>

Tempo de Retenção Aproximado (min.)	Cloreto de Ácido
8,8	A <sup>8</sup>
9,3	A <sup>3</sup>
11,9	A <sup>5</sup>
12,4	A <sup>9</sup>
12,7	A <sup>7</sup>
12,9	A <sup>4</sup>
12,97	A <sup>6</sup>
14,6	A <sup>1</sup>
15,6	A <sup>10</sup>

Na Figura 44 tem-se o espectro de massas referente a amida B<sup>3</sup>A<sup>3</sup>. O pico base é o  $m/z$  105, característico do cloreto de ácido A<sup>3</sup>. O pico do íon molecular M<sup>+</sup> 233 caracteriza a molécula.



**Figura 44:** Espectro de Massas referente à mistura B<sup>3</sup>A<sup>3</sup>

Na Tabela 28 estão descritas as amidas formadas na coleção B<sup>4</sup>A<sup>1-10</sup>.

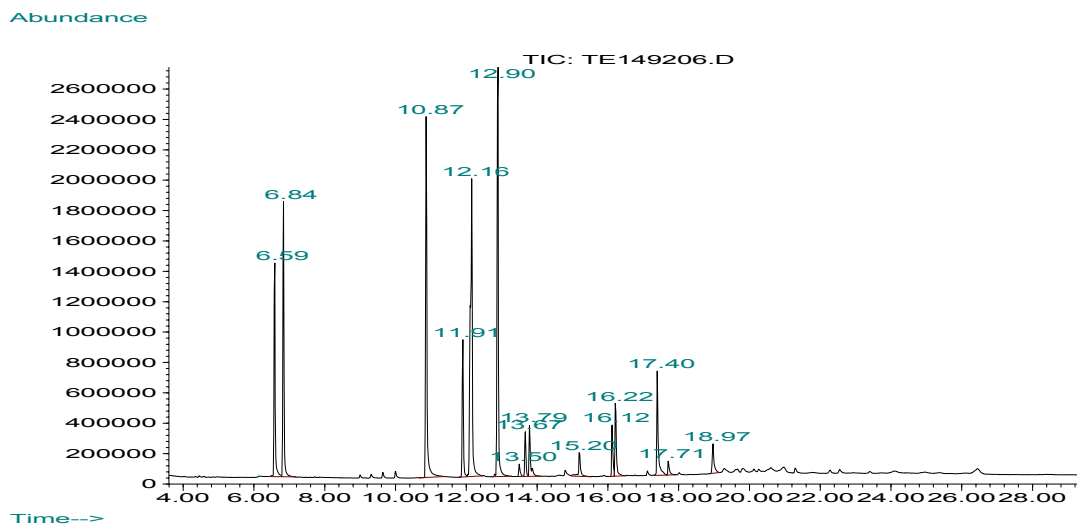
**Tabela 28:** Amidas formadas na coleção B<sup>4</sup>A<sup>1-10</sup>

<b>Tempo de Retenção Aproximado (min.)</b>	<b>Cloreto de Ácido</b>
6,6	A <sup>8</sup>
6,8	A <sup>3</sup>
10,8	A <sup>5</sup>
11,9	A <sup>9</sup>
12,1	A <sup>4</sup>
12,2	A <sup>7</sup>
12,9	A <sup>6</sup>
13,9	A <sup>10</sup>
15,2	A <sup>1</sup>
17,4	A <sup>1</sup>

Analisando-se os espectros de massas referentes aos sinais analíticos observados no cromatograma da mistura em questão (Figura 45), é possível observar a repetição de alguns picos base em diferentes tempos de retenção, indicando que o mesmo cloreto de ácido reagiu tanto com a amina B<sup>4</sup> quanto com algum composto que poderia estar presente no meio reacional, na forma de uma impureza.

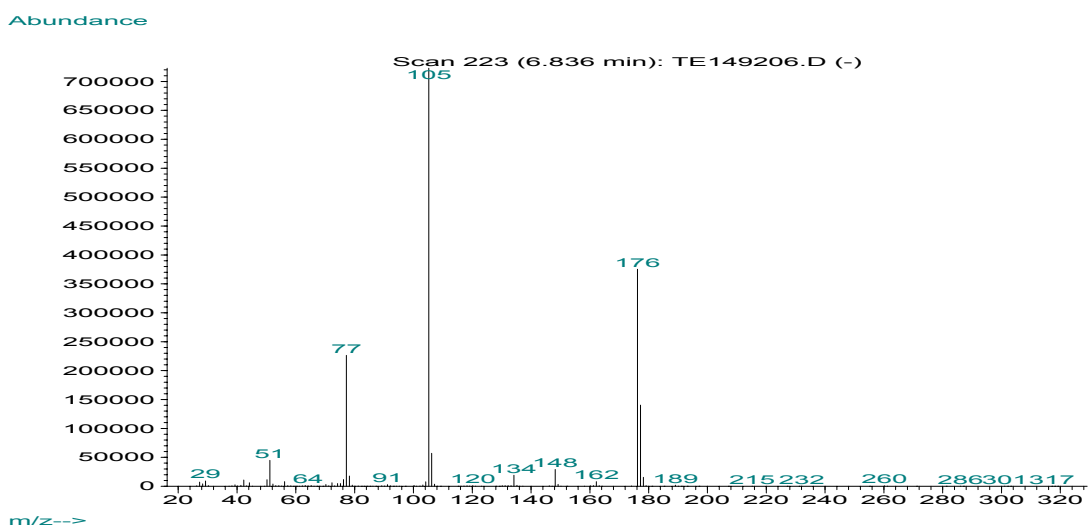
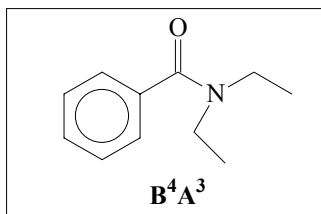
Em relação à reatividade dos cloretos de ácidos frente a essa amina, é possível verificar que os cloretos de ácidos mais reativos foram os seguintes: A<sup>3</sup>, A<sup>4</sup>, A<sup>5</sup>, A<sup>6</sup>.





**Figura 45:** Cromatograma referente à amida  $B^4A^{1-10}$

Na Figura 46 observa-se o espectro de massas referente à amida derivada do cloreto de ácido  $A^3$ , cujo pico base é  $m/z$  105. O pico do íon molecular é o  $m/z$  176.



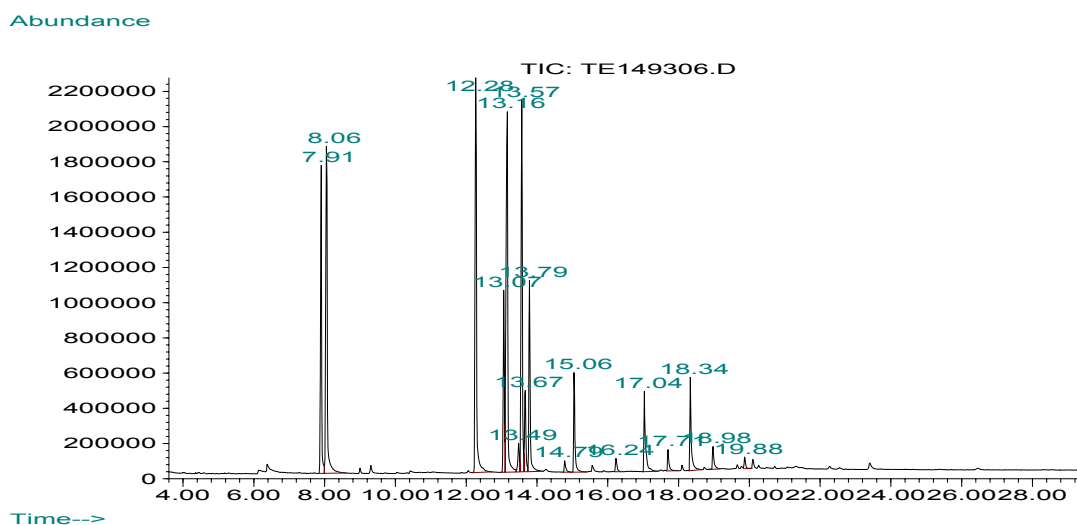
**Figura 46:** Espectro de massas da amida  $B^4A^3$

A Tabela 29 apresenta as amidas encontradas na coleção B<sup>5</sup>A<sup>1-10</sup>. A mesma tendência observada para as coleções anteriormente descritas se observa na coleção B<sup>5</sup>A<sup>1-10</sup>. Não foi observada reação com o cloreto de ácido A<sup>2</sup>, assim como observou-se a reação de alguns cloretos de ácido (A<sup>4</sup>, por exemplo) com impurezas provavelmente presentes no meio reacional.

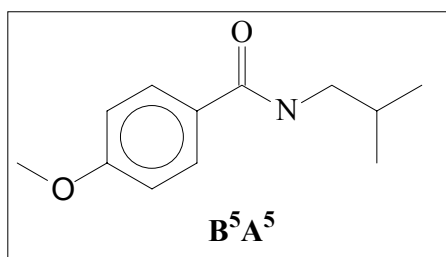
**Tabela 29:** Amidas formadas na coleção B<sup>5</sup>A<sup>1-10</sup>

<b>Tempo de Retenção Aproximado (min.)</b>	<b>Cloreto de Ácido</b>
7,9	A <sup>8</sup>
8,0	A <sup>3</sup>
12,3	A <sup>5</sup>
13,1	A <sup>9</sup>
13,1	A <sup>4</sup>
13,5	A <sup>7</sup>
13,7	A <sup>9</sup>
13,8	A <sup>4</sup>
15,0	A <sup>6</sup>
17,4	A <sup>10</sup>
18,4	A <sup>1</sup>

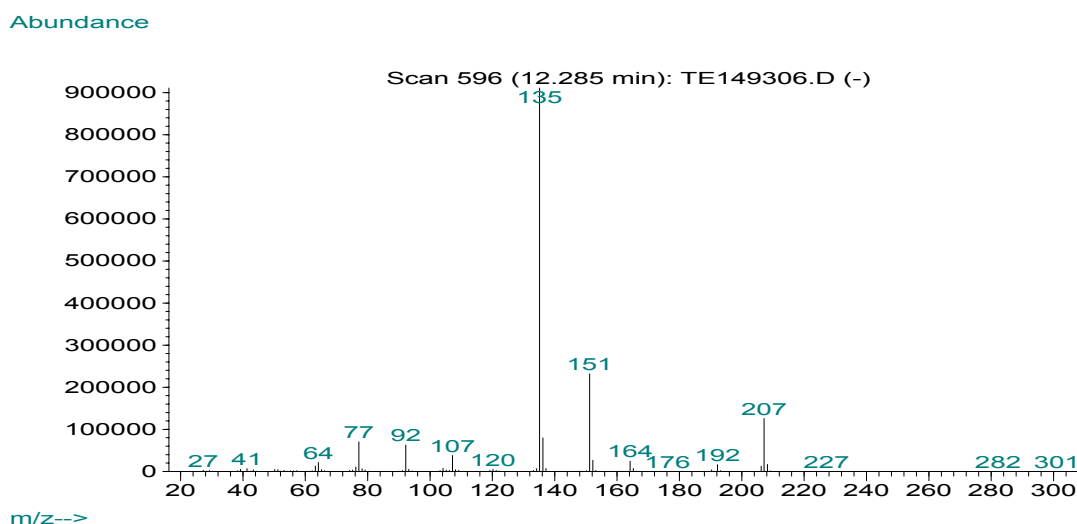
Os cloretos de ácidos mais reativos foram os seguintes: A<sup>3</sup>, A<sup>4</sup>, A<sup>5</sup>, A<sup>7</sup>, A<sup>8</sup>, A<sup>9</sup>. Observa-se que os cloretos mais reativos são provenientes de ácidos substituídos com grupos retiradores de elétrons e/ou não possuem a dupla ligação entre o anel benzênico e a carbonila. Na Figura 47 observa-se o cromatograma referente à amida B<sup>5</sup>A<sup>1-10</sup>.



**Figura 47:** Cromatograma referente à amida B<sup>5</sup>A<sup>1-10</sup>



Na Figura 48 é possível observar o espectro de massas da amida B<sup>5</sup>A<sup>5</sup>, cujo pico base é o  $m/z$  135.

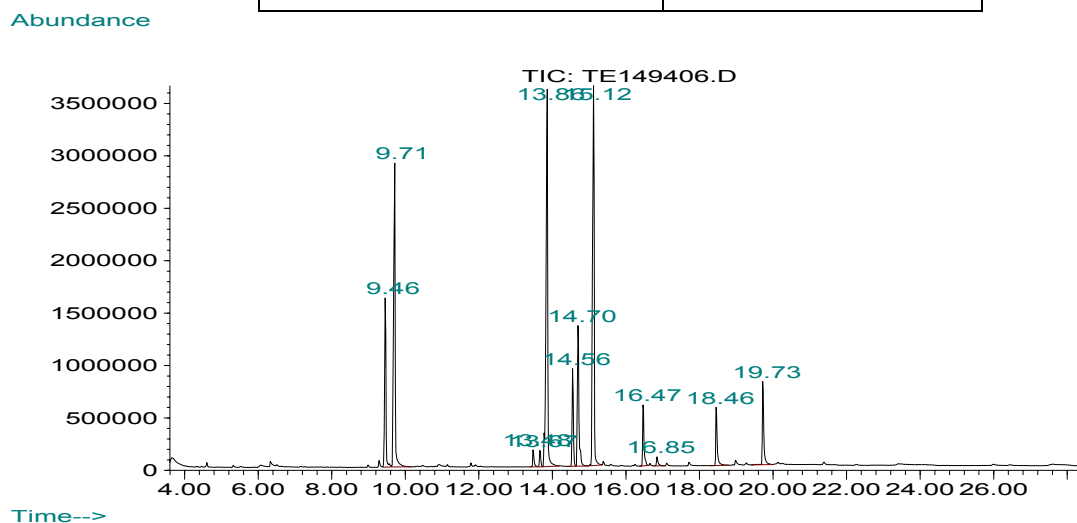


**Figura 48:** Espectro de massas referente à amida B<sup>5</sup>A<sup>5</sup>

Na Tabela 30 estão relacionadas às amidas obtidas na síntese da coleção B<sup>6</sup>A<sup>1-10</sup> (Figura 49). Foram observados 9 sinais analíticos correspondentes às amidas. Não foi observado sinal analítico com pico base *m/z* 191, correspondente ao cloreto de ácido A<sup>2</sup>.

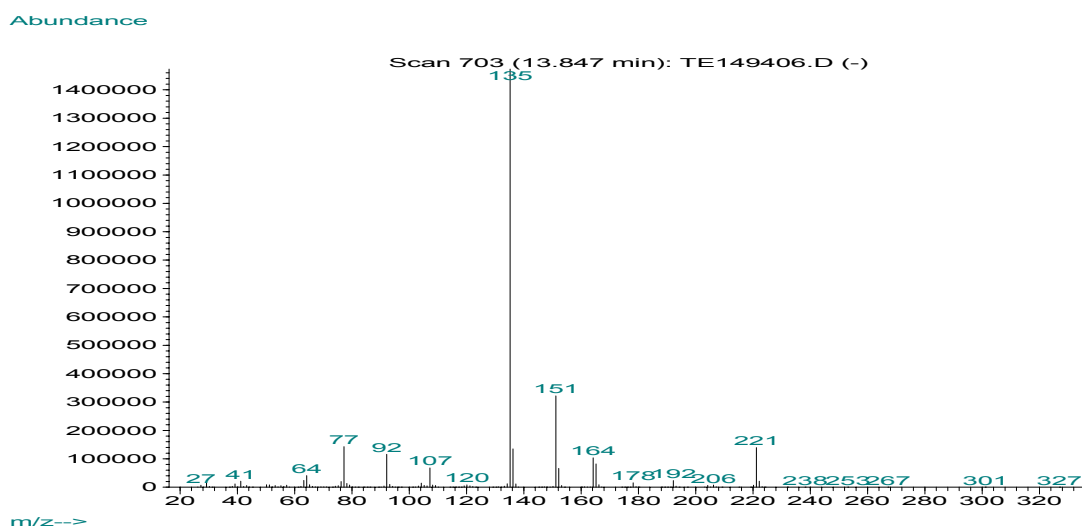
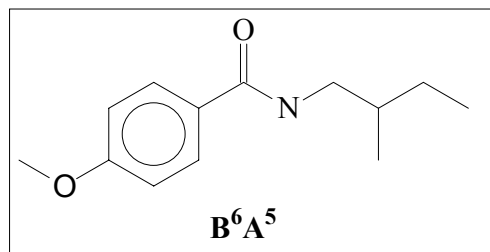
**Tabela 30:** Amidas formadas na coleção B<sup>6</sup>A<sup>1-10</sup>

Tempo de Retenção Aproximado (min.)	Cloreto de Ácido
9,4	A <sup>8</sup>
9,7	A <sup>3</sup>
13,8	A <sup>5</sup>
14,5	A <sup>9</sup>
14,7	A <sup>4</sup>
15,1	A <sup>7</sup>
16,5	A <sup>6</sup>
18,4	A <sup>10</sup>
19,7	A <sup>1</sup>



**Figura 49:** Cromatograma referente à mistura B<sup>6</sup>A<sup>1-10</sup>

Na Figura 50 tem-se o espectro de massas da amida B<sup>6</sup>A<sup>5</sup>, cujo pico base é o íon  $m/z$  135 e o pico do íon molecular é M<sup>+</sup> 121.



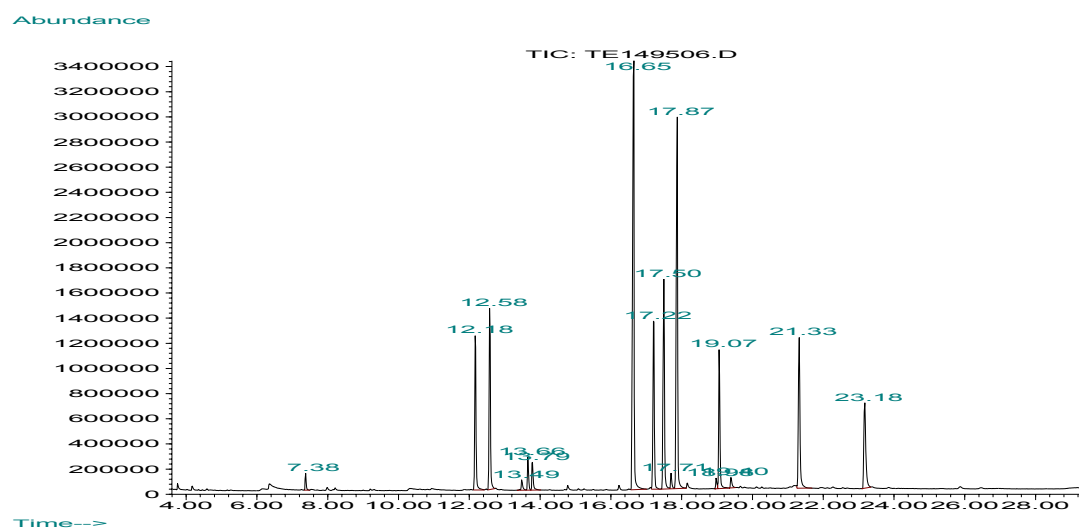
**Figura 50:** Espectro de massas referente à amida B<sup>6</sup>A<sup>5</sup>

Na Tabela 31 estão descritas as amidas obtidas na coleção B<sup>7</sup>A<sup>1-10</sup>.

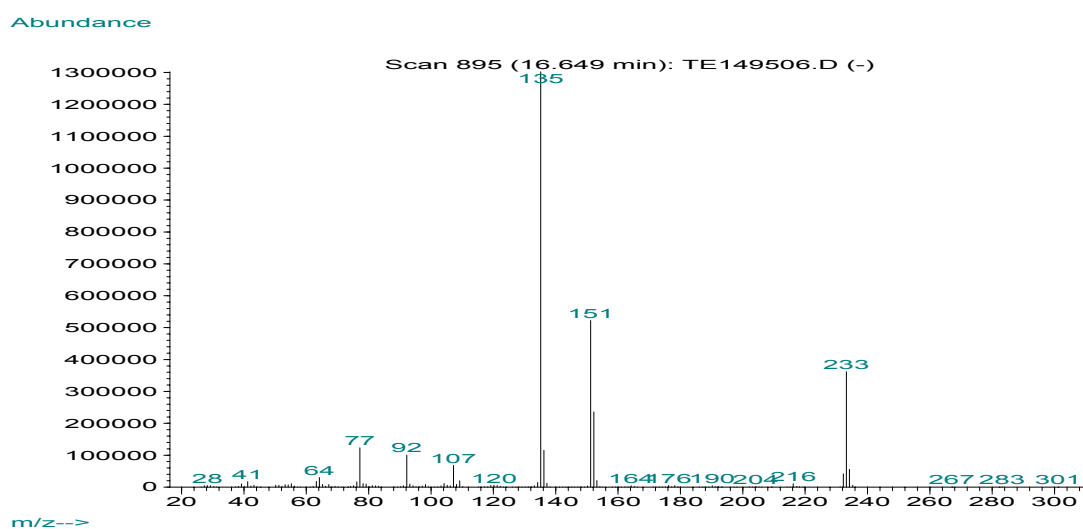
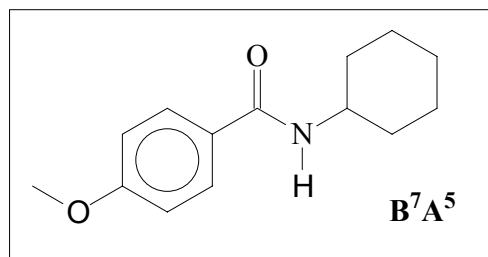
**Tabela 31:** Amidas formadas na coleção B<sup>7</sup>A<sup>1-10</sup>

Tempo de Retençã Aproximado (min.)	Cloreto de Ácido
12,2	A <sup>8</sup>
12,5	A <sup>3</sup>
16,6	A <sup>5</sup>
17,2	A <sup>9</sup>
17,4	A <sup>4</sup>
17,8	A <sup>4</sup>
18,9	A <sup>1</sup>
19,1	A <sup>6</sup>
21,3	A <sup>10</sup>

Nesta coleção não se observou reação com o cloreto de ácido A<sup>2</sup> e A<sup>7</sup>, e foi observada duplicação de pico base  $m/z$  131, referente ao cloreto de ácido A<sup>4</sup> (Figura 51). Um exemplo de amida formada é a B<sup>7</sup>A<sup>5</sup> (Figura 52).



**Figura 51:** Cromatograma referente à coleção B<sup>7</sup>A<sup>1-10</sup>

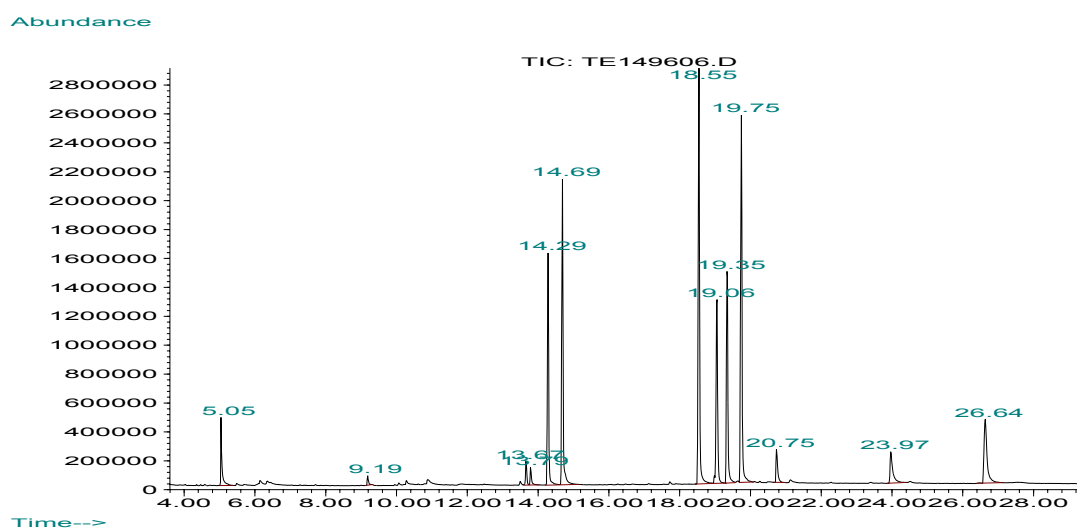


**Figura 52:** Espectro de massas referente à amida B<sup>7</sup>A<sup>5</sup>

Na Tabela 32 estão descritas as amidas obtidas na coleção B<sup>8</sup>A<sup>1-10</sup>. Como se pode observar na síntese da coleção B<sup>8</sup>A<sup>1-10</sup> apenas sete sinais analíticos referentes às amidas foram detectados (Figura 53). Sinais referentes aos cloretos de ácidos A<sup>4</sup>, A<sup>6</sup> e A<sup>9</sup> não foram encontrados. A ausência de amidas derivadas desses cloretos de ácidos não indicam que os mesmos não são reativos frente a aminas. Provavelmente ocorreram problemas no meio reacional, como presença de umidade, por exemplo.

**Tabela 32:** Amidas formadas na coleção B<sup>8</sup>A<sup>1-10</sup>

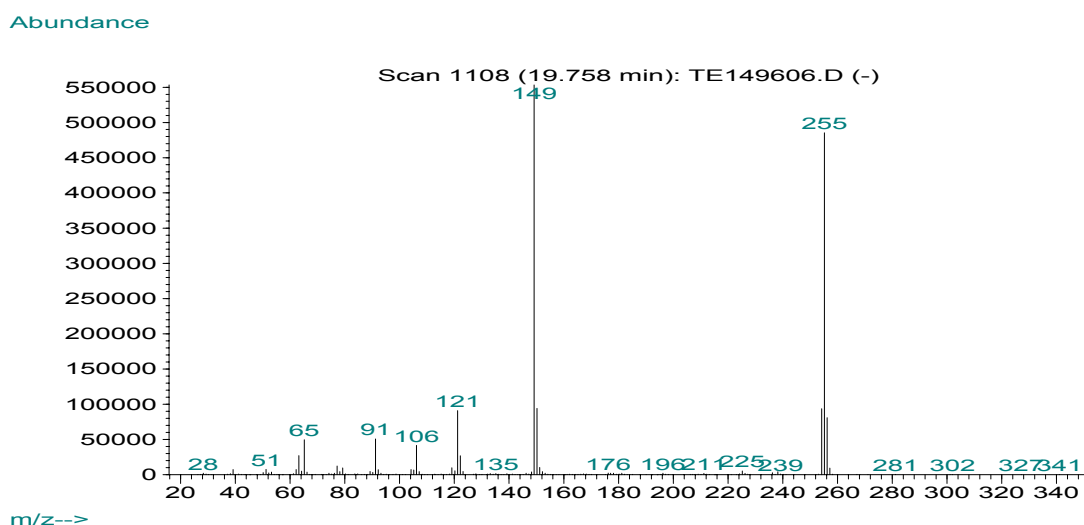
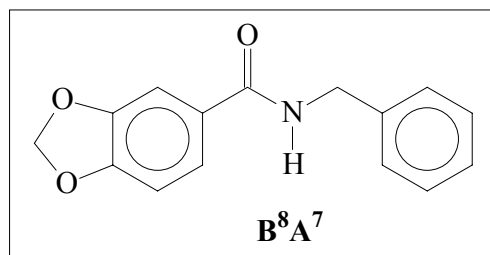
Tempo de Retenção Aproximado (min.)	Cloreto de Ácido
14,3	A <sup>8</sup>
14,7	A <sup>3</sup>
18,5	A <sup>5</sup>
19,3	A <sup>4</sup>
19,7	A <sup>7</sup>
20,7	A <sup>1</sup>
23,9	A <sup>10</sup>



**Figura 53:** Cromatograma referente à mistura B<sup>8</sup>A<sup>1-10</sup>

Na Figura 54 tem-se espectro de massas referente à amida B<sup>8</sup>A<sup>7</sup>. Observa-se o pico base  $m/z$  149, característico do cloreto de ácido A<sup>7</sup>, e o pico do íon molecular M<sup>+</sup> 255.





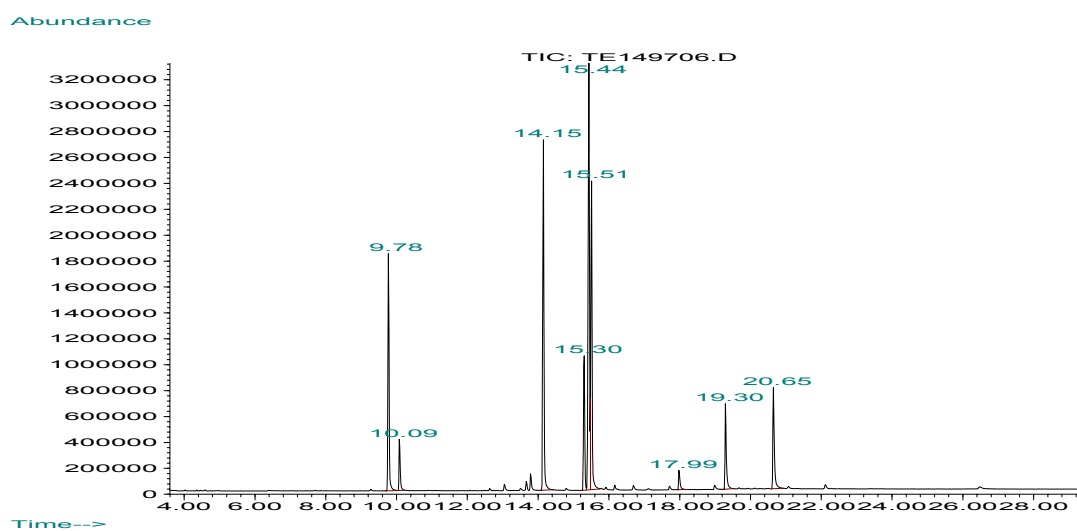
**Figura 54:** Espectro de massas referente à mistura B<sup>8</sup>A<sup>7</sup>

Na Tabela 33 estão descritas as amidas obtidas na coleção B<sup>9</sup>A<sup>1-10</sup>. Observou-se 8 sinais analíticos, sendo que os cloretos de ácido A<sup>2</sup> e A<sup>6</sup> não reagiram com a amina B<sup>9</sup> (Figura 55). Os cloretos de ácidos mais reativos, que apresentaram, em proporção, os sinais analíticos mais intensos foram os seguintes: A<sup>3</sup>, A<sup>4</sup>, A<sup>7</sup> e A<sup>8</sup>.

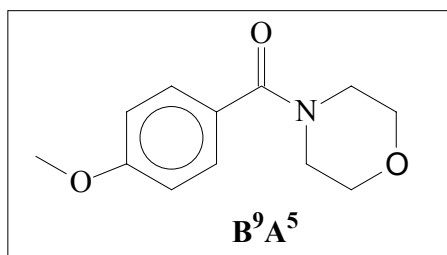
**Tabela 33:** Amidas formadas na coleção B<sup>9</sup>A<sup>1-10</sup>

Tempo de Retenção Aproximado (min.)	Cloreto de Ácido
9,8	A <sup>8</sup>
10,1	A <sup>3</sup>

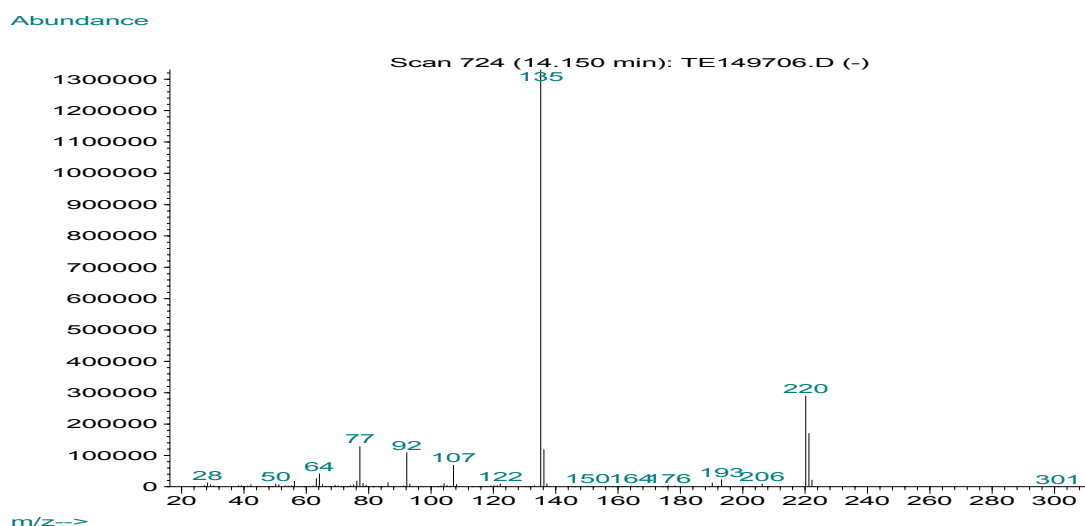
14,1	A <sup>5</sup>
15,3	A <sup>9</sup>
15,4	A <sup>7</sup>
15,5	A <sup>4</sup>
17,9	A <sup>1</sup>
19,3	A <sup>10</sup>



**Figura 55:** Cromatograma referente à coleção B<sup>9</sup>A<sup>1-10</sup>



Na Figura 56 observa-se o espectro de massas referente à amida B<sup>9</sup>A<sup>5</sup>, cujo pico base é o íon  $m/z$  135, característico do cloreto de ácido A<sup>5</sup>, e o pico do íon molecular é o M<sup>+</sup> 220.



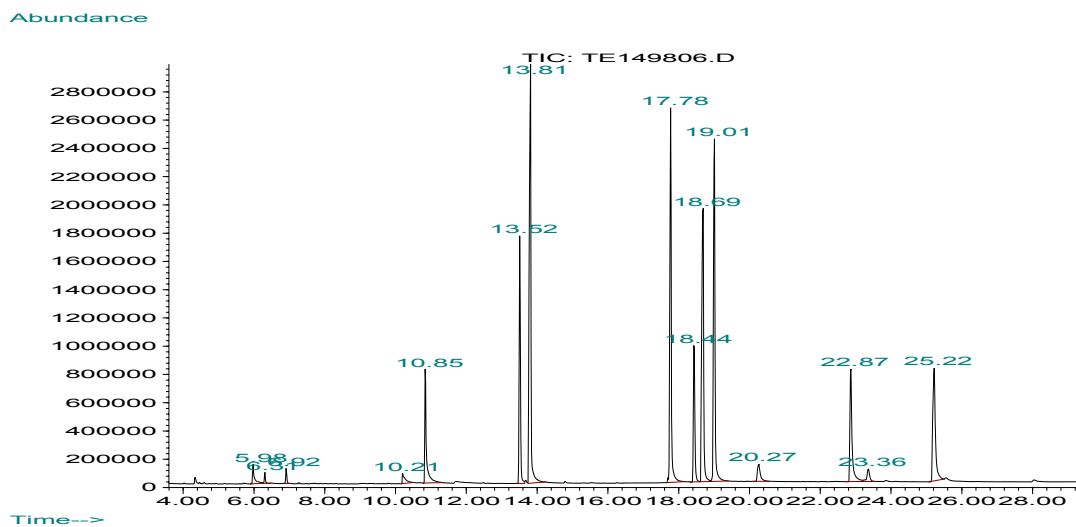
**Figura 56:** Espectro de massas referente à amida B<sup>9</sup>A<sup>5</sup>

Na Tabela 34 estão descritas as amidas obtidas na coleção B<sup>10</sup>A<sup>1-10</sup>. Foram observados 8 sinais analíticos nessa coleção, sendo que os sinais referentes aos cloretos de ácido A<sup>2</sup> e A<sup>6</sup> não estavam presentes (Figura 57). Os cloretos que resultaram nos sinais analíticos de maior intensidade foram: A<sup>3</sup>, A<sup>4</sup>, A<sup>5</sup>, A<sup>7</sup> e A<sup>8</sup>.

**Tabela 34:** Amidas formadas na coleção B<sup>10</sup>A<sup>1-10</sup>

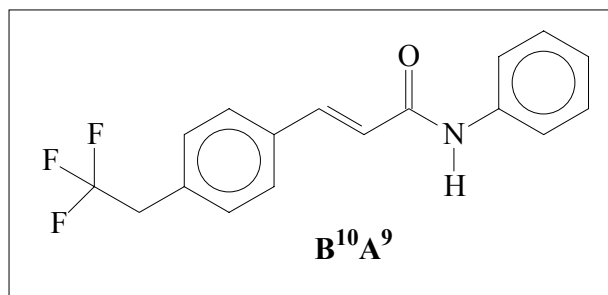
Tempo de Retenção Aproximado (min.)	Cloreto de Ácido
13,5	A <sup>8</sup>
13,8	A <sup>3</sup>
17,7	A <sup>5</sup>
18,4	A <sup>9</sup>

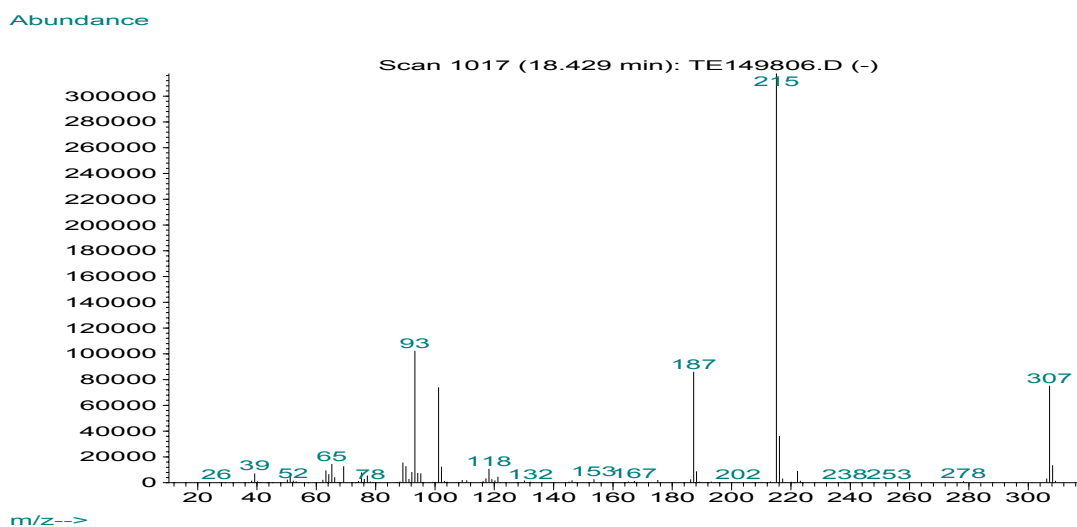
18,7	A4
18,9	A <sup>7</sup>
22,8	A <sup>10</sup>
25,2	A <sup>1</sup>



**Figura 57:** Cromatograma referente à coleção B<sup>10</sup>A<sup>1-10</sup>

Na Figura 58 observa-se o espectro de massas referente à amida B<sup>10</sup>A<sup>9</sup>, cujo pico base é o íon  $m/z$  215, característico do cloreto de ácido A<sup>9</sup>, e o pico do íon molecular é o M<sup>+</sup> 307.





**Figura 58:** Espectro de massas referente à amida B<sup>10</sup>A<sup>9</sup>

### 3.5 - Avaliação da atividade biológica da coleção de piperamidas

Para cada coleção obtida, A<sup>N</sup>B<sup>1-10</sup> e B<sup>N</sup>A<sup>1-10</sup>, realizou-se o bioensaio frente à lagarta-do-cartucho-do-milho, *S. frugiperda*. Cada mistura foi testada como se fosse um composto puro. Dessa forma o bioensaio realizado tem como objetivo identificar os possíveis compostos com maior atividade biológica em meio à mistura. Utilizou-se a metodologia da coleção combinatória indexada (item 3.3) para realizar o bioensaio, seguindo as mesmas condições descritas no item 3.2.1, e detectar quais são os compostos mais ativos frente a *S. frugiperda*.

Foram realizados 20 bioensaios e as misturas foram testadas na concentração de 2000 mg/L. Considerando-se a presença de dez amidas por mistura, na mesma concentração, tem-se 200 mg/L por mistura.

Analisando-se os resultados obtidos nos 20 bioensaios, as coleções que resultaram na maior atividade foram as derivadas do cloreto A<sup>8</sup> e da amina B<sup>1</sup>. Cruzando-se os resultados obtidos, conforme mostra a Tabela 35, provavelmente o composto responsável pela atividade observada é o A<sup>8</sup>B<sup>1</sup>. Isto ocorre, pois a coleção em que o

cloreto de ácido  $A^8$  era a estrutura base dos compostos, foi observada a maior atividade para os compostos do tipo  $A^N B^{1-10}$ . O mesmo ocorre em relação aos compostos  $B^N A^{1-10}$ , pois a coleção cuja amina  $B^1$  era a estrutura base, apresentou maior atividade.

**Tabela 35:** Análise esquemática dos resultados de bioensaio para as coleções

	$A^1 B^{1-10}$	$A^2 B^{1-10}$	$A^3 B^{1-10}$	$A^4 B^{1-10}$	$A^5 B^{1-10}$	$A^6 B^{1-10}$	$A^7 B^{1-10}$	$A^8 B^{1-10}$	$A^9 B^{1-10}$	$A^{10} B^{1-10}$
$B^1 A^{1-10}$								$A^8 B^1$		
$B^2 A^{1-10}$										
$B^3 A^{1-10}$										
$B^4 A^{1-10}$										
$B^5 A^{1-10}$										
$B^6 A^{1-10}$										
$B^7 A^{1-10}$										
$B^8 A^{1-10}$										
$B^9 A^{1-10}$										
$B^{10} A^{1-10}$										

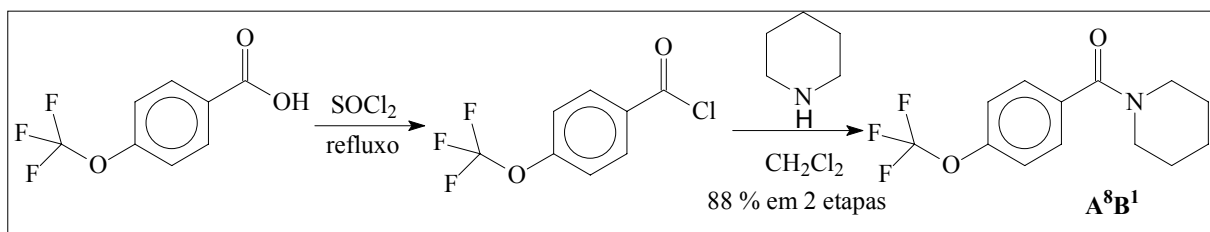
Na tabela 36 estão apresentados os resultados dos bioensaios obtidos para as 20 coleções ensaiadas frente a *S. frugiperda*.

**Tabela 36:** Resultado obtido no bioensaio realizado com a coleção de amidas frente a larvas de segundo ínstar de *S. frugiperda*

<b>Coleção</b>	<b>Mortalidade Média*</b>
<b>A<sup>3</sup>B<sup>1-10</sup></b>	8,0 ± 4,0 <b>bc</b>
<b>A<sup>4</sup>B<sup>1-10</sup></b>	14,0 ± 17,0 <b>ab</b>
<b>A<sup>5</sup>B<sup>1-10</sup></b>	8,0 ± 8,0 <b>bc</b>
<b>A<sup>6</sup>B<sup>1-10</sup></b>	6,0 ± 9,0 <b>cd</b>
<b>A<sup>7</sup>B<sup>1-10</sup></b>	12,0 ± 13,0 <b>b</b>
<b>A<sup>8</sup>B<sup>1-10</sup></b>	20,0 ± 20,0 <b>a</b>
<b>A<sup>9</sup>B<sup>1-10</sup></b>	12,0 ± 13,0 <b>b</b>
<b>A<sup>10</sup>B<sup>1-10</sup></b>	12,0 ± 16,0 <b>b</b>
<b>B<sup>1</sup>A<sup>1-10</sup></b>	68,0 ± 15,0 <b>a</b>
<b>B<sup>2</sup>A<sup>1-10</sup></b>	28,0 ± 18,0 <b>c</b>
<b>B<sup>3</sup>A<sup>1-10</sup></b>	46,0 ± 29,0 <b>b</b>
<b>B<sup>4</sup>A<sup>1-10</sup></b>	20,0 ± 12,0 <b>cd</b>
<b>B<sup>5</sup>A<sup>1-10</sup></b>	2,0 ± 4,0 <b>fg</b>
<b>B<sup>6</sup>A<sup>1-10</sup></b>	2,0 ± 4,0 <b>fg</b>
<b>B<sup>7</sup>A<sup>1-10</sup></b>	10,0 ± 7,0 <b>ef</b>
<b>B<sup>8</sup>A<sup>1-10</sup></b>	16,0 ± 13,0 <b>de</b>
<b>B<sup>9</sup>A<sup>1-10</sup></b>	17,0 ± 5,0 <b>de</b>
<b>B<sup>10</sup>A<sup>1-10</sup></b>	4,0 ± 9,0 <b>f</b>

\*Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).  
Concentração da amostra contendo a mistura de amidas: 2000 mg/L.

A amida A<sup>8</sup>B<sup>1</sup>, detectada como a mais ativa dentre os compostos sintetizados via química combinatória, foi sintetizada via síntese orgânica clássica, como mostra o Esquema 11.



**Esquema 11:** Obtenção da amida A<sup>8</sup>B<sup>1</sup>

Reagiu-se o cloreto do ácido A<sup>8</sup> com a amina B<sup>1</sup>, piperidina, e diclorometano, sob atmosfera de N<sub>2</sub>. O rendimento obtido foi de 88 %. O cloreto de ácido A<sup>8</sup> tem como substituinte no anel benzênico um grupo retirador de elétrons e ainda, não possui dupla ligação entre a carbonila e o anel benzênico, favorecendo assim a formação da amida.

Na análise por RMN <sup>1</sup>H observou-se dois dubletos, um na região de 7,4 ppm, referente aos hidrogênios em C1 e C4, e outro na região de 7,2 ppm, referentes aos hidrogênios em C2 e C3. Em 3,7 e 3,3 ppm, observou-se a presença de dois singletos, correspondentes a 4 hidrogênios, no total, que se situam nos carbonos vizinhos ao nitrogênio, C5 e C9 respectivamente. Em 1,68 ppm, observou-se um multipletto, integrando para 6 hidrogênios, correspondente aos hidrogênios restantes da porção amina da molécula (C6, C7 e C8).

Após a obtenção da amida A<sup>8</sup>B<sup>1</sup> pura, realizou-se o bioensaio frente a *S. frugiperda* a fim de se observar a atividade biológica. Os resultados obtidos testadas estão descritos nas Tabelas 37 e 38.

A amida **65**, na dose de 70 µg/mg de larva causou 86 % de mortalidade. Já amida A<sup>8</sup>B<sup>1</sup>, na dose de 17,86 µg/mg de larva ocasionou a morte de 76 % de lagartas.

O valor do DL<sub>50</sub> frente a *S. frugiperda* foi calculado para a amida A<sup>8</sup>B<sup>1</sup>. O valor obtido foi de 8,15 µg/mg larva, o qual é maior que o obtido para a amida **65** (1,07 µg/mg larva).



**Tabela 37:** Valor do DL<sub>50</sub> obtido para a amida A<sup>8</sup>B<sup>1</sup> frente a *S. frugiperda*

Amida	GL	Inclinação ± EPM	DL <sub>50</sub> (IC 90%) (mg/mg larva)	$\chi^2$	G (0.95)
A <sup>8</sup> B <sup>1</sup>	3	1,26 ± 0,254	8,15 (7,041-34,19)	2,41	0,16

GL= graus de liberdade; EPM= erro padrão da média; IC= intervalo de confiança;  
X<sup>2</sup> = qui-quadrado; G = índice de significância; N=300 insetos

**Tabela 38:** Mortalidade causada pela amida A<sup>8</sup>B<sup>1</sup> em diversas concentrações, frente a lagartas de segundo instar de *S. frugiperda*

Concentração (µg/mg larva)	Mortalidade Média (%) ± DP
178,6	96,0 ± 5,5 <b>a</b>
17,86	76,0 ± 16,7 <b>b</b>
1,78	36,0 ± 13,4 <b>c</b>
1,78 x 10 <sup>-1</sup>	28,0 ± 13,0 <b>d</b>
1,78 x 10 <sup>-2</sup>	26,0 ± 15,0 <b>de</b>
Controle	20,0 ± 2,0 <b>e</b>

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

Esse resultado evidencia que a toxicidade observada para a amida **65** é mais homogênea que a observada para a amida A<sup>8</sup>B<sup>1</sup>, a qual foi tóxica, efetivamente, apenas quando aplicada em altas dosagens.

Vale ressaltar que em relação ao bioensaio realizado com as amidas em mistura, pode ter ocorrido um efeito de sinergismo entre as amidas derivadas do ácido A<sup>8</sup>, o

que provocaria um resultado falso-positivo, em relação à atividade da amida  $A^8B^1$ . O fato das amidas testadas não estarem puras, também pode ocasionar resultados falseados, devido à presença de impurezas.

## **Conclusões e Perspectivas**

#### 4 - Conclusões e Perspectivas

Os compostos sintetizados via síntese orgânica clássica apresentaram rendimentos de moderados a bons, variando-se de 30-80 %. A amida **65** foi a mais ativa frente ao inseto *S. frugiperda*, dentre os compostos testados puros. Quanto às formigas cortadeiras, os mais ativos foram **67** e **72**. Já em relação ao fungo simbionte, os compostos mais ativos foram às amidas **65** e **66**.

Em relação à metodologia da química combinatória, pode-se concluir que os resultados obtidos, foram eficientes, pois mais de 80 % dos compostos propostos foram obtidos.

A técnica CG/EM permitiu caracterizar os compostos com sucesso, e ainda, de maneira geral, verificar a reatividade dos compostos, bem como a proporção entre eles em meio à mistura reacional.

A molécula  $A^8B^1$ , que apresentou maior atividade biológica no ensaio com *S. frugiperda* não possui insaturação, evidenciando que a porção olefínica existente entre o anel benzênico e a carbonila pode não ser essencial para a atividade frente a este inseto.

É importante evidenciar a vantagem da síntese combinatória em relação à síntese orgânica clássica. Com a metodologia da síntese orgânica clássica, 12 compostos foram sintetizados individualmente. Utilizando-se a metodologia da química combinatória, em torno de 180 compostos foram obtidos, em apenas dois blocos reacionais: as coleções  $A^NB^{1-10}$  e  $B^NA^{1-10}$ . Como se pode observar, a química combinatória, além da economia de tempo, permite a síntese de um número maior de compostos e facilita a busca por novos compostos protótipos.

Em relação à porção amina da molécula  $A^8B^1$ , a amina correspondente é a Piperidina. É importante ressaltar que a amida **65** e a amida  $A^8B^1$  apresentam essa

amina em sua estrutura evidenciando que a mesma pode contribuir significativamente para a atividade biológica em *S. frugiperda*.

Avaliando-se os resultados do bioensaio da amida A<sup>8</sup>B<sup>1</sup> em relação a *S. frugiperda*, o DL<sub>50</sub> observado para a amida A<sup>8</sup>B<sup>1</sup> é maior que o observado para a amida **55**, evidenciando que a amida obtida via síntese orgânica clássica (**55**) é mais ativa frente a *S. frugiperda* do que o composto obtido via química combinatória (A<sup>8</sup>B<sup>1</sup>). No entanto, a amida A<sup>8</sup>B<sup>1</sup> pode ser considerada um composto de partida no desenvolvimento de uma nova molécula eficiente no controle da praga-do-milho, sendo um indicativo de que piperamidas fluoradas podem apresentar atividades biológicas significativas frente a *S. frugiperda*. É possível, ainda, inferir, que um efeito de sinergismo pode ter ocorrido no resultado do bioensaio das amidas em mistura.

Como perspectiva, deve-se realizar o ensaio de toxicidade por ingestão para a amida A<sup>8</sup>B<sup>1</sup>, inoculando-se a mesma na dieta artificial de *S. frugiperda* e avaliando-se o impacto desse composto no ciclo de vida do inseto. Também seria de grande importância estudar o possível efeito sinergista dessas amidas.

O composto A<sup>8</sup>B<sup>1</sup> pode ser testado frente a outros insetos a fim de se avaliar sua atividade biológica em relação a diferentes artrópodes. No entanto é preciso destacar que essa amida possui um halogênio em sua estrutura, o flúor. Sendo assim, faz-se necessário estudar o quanto o composto pode ser tóxico para o meio ambiente e realizar uma ponderação entre a atividade biológica apresentada e o possível impacto ao meio ambiente.

# **Procedimento Experimental**

## 5 - Procedimento Experimental

### 5.1 - Aspectos Gerais

Os espectros de absorção no infravermelho foram registrados em um espectrômetro Bomem modelo M 102. As amostras foram utilizadas em forma de filme em pastilha de KBr e as absorções estão expressas em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram registrados no espectrômetro Bruker ARX-200 e 400 MHz. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) estão expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Para indicar a multiplicidade dos sinais foram realizadas as seguintes abreviações: s (singleto), d (dubleto), t (triplete), q (quadruplete), m (multiplete).

Nas separações feitas por cromatografia em coluna utilizou-se sílica gel 60, 230-400 mesh ASTM Merck e sílica gel 60 A, 70-230 mesh Aldrich Co. Na placas de vidro de 2 cm x 5 cm para CCD, utilizou-se sílica gel 60 G Merck Darmstadt e revelou-se sobre luz ultravioleta, iodo molecular ou utilizando-se um borrifador contendo uma solução de 1g de vanilina, 1mL de ácido sulfúrico concentrado e 100 mL de ácido acético.

Nas análises feitas por cromatografia gasosa (CG), utilizou-se um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17 A, equipado com coluna DB-5, utilizando-se detector ionização de chama e  $\text{H}_2$  como gás de arraste. Nas identificações realizadas por espectrometria de massas, utilizou-se CG/EM HP 5890/6973, equipado com coluna capilar MDN-5S, 5 % fenil, polidimetilsiloxana. O hélio foi utilizado como gás de arraste.

Os solventes utilizados foram destilados previamente e possuem grau de pureza P.A.

As análises de ponto de fusão foram realizadas em um aparelho Microquímica, modelo MQAPF-301.

## **5.2 - Procedimento Experimental referente à síntese das amidas via a metodologia da Síntese Orgânica Clássica**

### **5.2.1 - Obtenção do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico (63)**

Em um balão de fundo redondo foram dissolvidos (6.0 g, 40 mmol) de piperonal e (9.16 g, 127 mmol) de ácido malônico em uma mistura de piridina/piperidina (19mL/0.32mL). Em seguida aqueceu-se o sistema até atingir o refluxo que foi mantido por aproximadamente uma hora e trinta minutos. Uma vez resfriado o sistema, foi adicionado ao mesmo HCl 38% (20 mL) e água destilada (50 mL). O produto desejado se apresentou na forma de um precipitado de cor branca que foi filtrado do meio reacional num funil de Buchner. Após ser lavado com água destilada (3 x 50 mL), o precipitado foi transferido para uma placa de petri e colocado na estufa por 6 horas a 60<sup>0</sup>C.

Obteve-se o ácido **63** em 82% de rendimento.

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz-CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.64 (d, J = 15.4 Hz, 1H); 7.03-6.99 (m, 2H); 6.80 (d, J = 8.0 Hz, 1H); 6.65 (d, J = 15.4 Hz, 1H); 5.99 (s, 2H).



### 5.2.2 - Obtenção das amidas (55-65) derivadas do ácido 63 e da amida A<sup>8</sup>B<sup>1</sup>, derivada do ácido A<sup>8</sup>

Em um balão de fundo redondo, sob atmosfera de nitrogênio, provido de agitação magnética e condensador de refluxo, o ácido apropriado foi colocado em SOCl<sub>2</sub> e em seguida aqueceu-se o sistema até aproximadamente 50°C (Tabela 39). Após 4 horas de reação adicionou-se hexano anidro (10,0 mL) e trocou-se o condensador de refluxo por um sistema de destilação, a fim de se retirar o excesso de SOCl<sub>2</sub>. O resíduo obtido foi diluído em diclorometano (10 mL) e sob atmosfera de nitrogênio e banho de gelo a amina adequada foi adicionada. Após 12 horas, adicionou-se uma solução de NaHCO<sub>3</sub> saturado (30 mL) e a extração foi feita com diclorometano (3 x 20 mL). A fase orgânica foi lavada com água destilada (3 x 20 mL) e solução saturada de NaCl (3 x 20 mL) e em seguida seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Tabela 39:** Quantidade dos reagentes utilizada na síntese das amidas 65-75

<b>Amida</b>	<b>HNR<sub>1</sub>R<sub>2</sub></b>	<b>Amina (mmol)</b>	<b>Cloreto de Ácido (mmol)</b>	<b>Equivalentes*</b>	<b>Rend. (%)</b>
<b>65</b>	Piperidina	9,16	8,33	1,1	44
<b>66</b>	Dietilamina	25,30	23,00	1,1	42
<b>67</b>	Pirrolidina	15,00	14,00	1,1	68
<b>68</b>	2-Metilbutilamina	25,28	23,00	1,1	38
<b>69</b>	Morfolina	25,00	12,50	2,0	40
<b>70</b>	Anilina	25,00	12,50	2,0	39

<b>71</b>	Diisopropilamina	25,7	23,4	1,1	36
<b>72</b>	Benzilamina	30,58	27,80	1,1	36
<b>73</b>	Diciclohexilamina	33,00	11,00	3,0	86
<b>74</b>	Ciclohexilamina	6,80	13,11	0,5	32
<b>65</b>	Di-n-butilamina	12,21	11,11	1,1	83
<b>B<sup>1</sup></b>	Piperidina	2,5	2,3	1,1	88

**\*mmol amina/mmol cloreto de ácido**

### **5.2.3 - Dados Espectroscópicos das Amidas 65-75**

#### **N, N-(piperidina) -3-(3',4'-metilendioxfenil)-2-(E)-propenamida (65)**

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz-CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.57 (d, J = 16.0 Hz, 1H); 7.04 (m, 2H); 6.76 (m, 2H); 5.99 (s, 2H); 3.62 (m, 4H); 1,65 (m, 6H).

RMN <sup>13</sup>C (50 MHz-CDCl<sub>3</sub>) δ: 24.59; 26.14; 45.35; 101.34; 106.27; 108.42; 115.50; 123.59; 129.83; 142.03; 148.12; 148.78; 165.39.

E.M. (intensidade relativa %): *m/z* = 260 (8); 259 (M<sup>+</sup>, 50); 176 (45); 175 (100); 145 (83); 117 (45); 84 (94).

I.V. (ν<sub>max</sub>, filme): 3071; 2969; 1641; 1491; 1361 cm<sup>-1</sup>.

p.f. (° C): 88-89

**N, N-(dielil) -3-(3', 4'-metilenodioxifenil)-2-(E)-propenamida (66)**

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz-CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.62 (d, J = 14.0 Hz, 1H); 7.01 (d, J = 8.0 Hz, 2H); 6.80 (d, J = 8.0 Hz, 1H); 6.65 (d, J = 14.0 Hz, 1H); 5.99 (s, 2H); 3.47 (m, 4H); 1.21 (m, 6H).

RMN <sup>13</sup>C (50 MHz-CDCl<sub>3</sub>) δ: 14.21; 41.74; 101.45; 106.36; 108.54; 115.25; 123.93; 129.77; 142.59; 148.18; 148.97; 165.97.

E.M. (intensidade relativa %): *m/z* = 247 (M<sup>+</sup>, 30); 218 (5); 176 (28); 175 (100); 145 (81); 117 (41); 89 (75).

I.V. (ν<sub>max</sub>, filme): 2963; 1643; 1492; 1445 cm<sup>-1</sup>.

p.f. (° C): 67-68

**N, N-(pirrolidina) -3-(3',4'-metilenodioxifenil)-2-(E)-propenamida (67)**

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz-CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.60 (d, J = 15.4 Hz, 1H); 7.01 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 6,79 (d, J = 7,8, 1H); 6.56 (d, J = 15,4 Hz, 1H); 6.99 (s, 2H); 3.61 (q, J = 6.1 Hz, 4H); 1.90 (m, 4H).

RMN <sup>13</sup>C (50 MHz-CDCl<sub>3</sub>) δ: 24.85; 46.45; 101.40; 106.34; 108.47; 116.23; 124.07; 129.54; 142.01; 148.14; 149.01; 164.93.

E.M. (intensidade relativa %): *m/z* = 246 (5); 245 (M<sup>+</sup>, 29); 176 (38); 175 (100); 145 (82); 117 (45); 89 (83).

I.V. (ν<sub>max</sub>, filme): 2979, 1650, 1454, 1424 cm<sup>-1</sup>.

p.f. (° C): 146-147

**N, N-(2-metil-butil) -3-(3',4'-metilenodioxifenil)-2-(E)-propenamida (68)**

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz-CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.53 (d, J = 15.5 Hz, 1H); 6.9 (d, J = 7,8 Hz, 1H); 6.78 (dd, J = 8,1 Hz, 1H); 6.25 (d, J = 15,5 Hz, 1H); 5.98 (s, 2H); 3.25 (m, 2H), 1,60 (m, 1H), 1,44 (m, 1H), 1,18 (m, 1H).

RMN <sup>13</sup>C (50 MHz-CDCl<sub>3</sub>) δ: 11.28; 17.17; 26.98; 34.98; 45.42; 101.40; 106.27; 108.48; 118.44; 123.90; 129.14; 140.89; 148.15; 149.01; 166.29.

E.M. (intensidade relativa %): *m/z* = 261 (M<sup>+</sup>, 18); 242 (0,9); 204 (3); 190 (63); 175 (100); 145 (63); 117 (34); 89 (68).

I.V. (ν<sub>max</sub>, filme): 3303; 2963; 1643; 1492; 1445 cm<sup>-1</sup>.

p.f. (° C): 96-97

**N, N-(morfolina) -3-(3',4'-metilenodioxifenil)-2-(E)-propenamida (69)**

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz-CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.62 (d, J = 15.3 Hz, 1H); 7.00 (d, J = 7,9 Hz, 2H); 6.80 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 6.67 (d, J = 15.3 Hz, 1H); 5.99 (s, 2H); 3.71 (m, 8H).

RMN <sup>13</sup>C (50 MHz-CDCl<sub>3</sub>) δ: 49.99; 66.83; 101.45; 106.24; 108.51; 114.26; 123.94; 129.44; 143.03; 148.20; 149.03; 165.64.

E.M. (intensidade relativa %): *m/z* = 261 (M<sup>+</sup>, 27); 231 (0,4); 203 (0,9); 176 (25); 175 (100); 148 (5); 145 (60); 117 (30); 89 (55).

I.V. (ν<sub>max</sub>, filme): 2974; 1643; 1492; 1449 cm<sup>-1</sup>.

p.f. (° C): 156-157

**N, N-(anilina) -3-(3',4'-metilenodioxifenil)-2-(E)-propenamida (70)**

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz-CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.66 (d, J = 15.4 Hz, 1H); 7.59-7.09 (m, 5H); 7.02-6.98 (m, 2H); 6.80 (d, J = 8.4 Hz, 1H); 6.38 (d, J = 15.4 Hz, 1H); 6.00 (s, 2H).

RMN <sup>13</sup>C (50 MHz-CDCl<sub>3</sub>) δ: 101.50; 106.35; 108.56; 118.70; 119.83; 124.28; 129.06; 142.14; 148.25; 163.

E.M. (intensidade relativa %): *m/z* = 267 (M<sup>+</sup>, 16); 208 (0,9); 176 (11); 175 (100); 145 (59); 117 (32); 89 (63).

I.V. (ν<sub>max</sub>, filme): 3443, 2979, 1646, 1493, 1433 cm<sup>-1</sup>.

p.f. (° C): 149-150

**N, N-(diisopropil) -3-(3',4'-metilenodioxifenil)-2-(E)-propenamida (71)**

RMN <sup>1</sup>H (200MHz-CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.52 (d, J=15,3 Hz; 1H); 6,98 (d, J=8,0 Hz; 2H); 6.79 (d, J=7,9 Hz; 1H); 6.66 (d, J=15,3 Hz; 1H); 5.99 (s; 2H); 3,98 (m, 2H); 1,35 (m, 12H).

RMN <sup>13</sup>C (50 MHz-CDCl<sub>3</sub>) δ: 20.66; 21.60; 46.18; 101.40; 106.28; 108.52; 117.73; 123.71; 129.88; 141.59; 148.15; 148.83; 166.54.

E.M. (intensidade relativa %) *m/z* : 275 (M<sup>+</sup>, 9); 232 (0,7); 176 (18); 175 (100); 145 (39); 117 (22); 89 (49).

IV (ν<sub>max</sub>, filme): 2965; 1643; 1492; 1449 cm<sup>-1</sup>.

p.f. (° C): 136-137

**N, N-(benzil) -3-(3',4'-metilenodioxifenil)-2-(E)-propenamida (72)**

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz- $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.59 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H); 7.36-7.28 (m, 5H); 7.00-6.96 (m, 2H); 6.79 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H); 6.23 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H); 5.99 (s, 2H); 4.57 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz- $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 43.93; 101.47; 106.31; 188.56; 118.05; 124.06; 127.63; 127.96; 128.78; 129.05; 138.08; 141.48; 166.04.

E.M. (intensidade relativa %):  $m/z = 281$  ( $\text{M}^+$ , 40); 175 (100); 145 (69); 106 (64); 89 (77).

I.V. ( $\nu_{\text{max}}$ , filme): 3295; 3089; 2903; 2787; 1658; 1494; 1441  $\text{cm}^{-1}$ .

p.f. ( $^{\circ}\text{C}$ ): 157-158

**N, N-(diciclohexil) -3-(3',4'-metilenodioxifenil)-2-(E)-propenamida (73)**

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz- $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.54 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H); 7.02 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H); 6.98 (dd,  $J = 1.6; 8.1$  Hz, 1H); 6.80 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H); 6.66 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H); 6.00 (s, 2H); 3.58 (m, 2H); 1.82-1.18 (m, 20H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz- $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 25.34; 26.36; 30.26; 31.85; 56.05; 57.65; 101.36; 106.23; 108.48; 118.13; 123.62; 129.95; 141.30; 148.08; 148.73; 166.63.

E.M. (intensidade relativa %):  $m/z = 355$  ( $\text{M}^+$ , 12); 272 (10); 190 (9); 176 (20); 175 (100); 148 (19); 145 (54); 117 (27); 89 (43).

I.V. ( $\nu_{\text{max}}$ , filme): 2930; 1645; 1491; 1449  $\text{cm}^{-1}$ .

p.f. ( $^{\circ}\text{C}$ ): 142-143

**N, N-(ciclohexil) -3-(3',4'-metilenodioxifenil)-2-(E)-propenamida (74)**

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz- $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 7.55 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H); 6.99 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H); 6.95 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H); 6.80 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H); 6.24 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H); 5.96 (s, 2H); 3.90-3.81 (m, 2H); 2.04-1.22 (m, 10H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz- $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 24.8; 25.5; 33.1; 48.3; 101.3; 106.2; 108.4; 119.4; 123.6; 129.4; 140.1; 148.1; 148.8; 165.1.

E.M. (intensidade relativa %):  $m/z = 190$  (3); 176 (22); 175 (100); 145 (53); 117 (34); 89 (89).

I.V. ( $\nu_{\text{max}}$ , filme): 3422; 3077; 2933; 1650; 1500; 1444  $\text{cm}^{-1}$ .

p.f. ( $^{\circ}\text{C}$ ): 181-182

**N, N-(di-n-butil) -3-(3',4'-metilenodioxifenil)-2-(E)-propenamida (75)**

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz- $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 7.61 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H); 6.99 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H); 6.85 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H); 6.65 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H); 5.99 (s, 2H); 3.4 (q,  $J = 8.5$  Hz, 4H); 1.57 (m, 4H); 1.36 (m, 4H); 0.98 (q,  $J = 6.9$  Hz, 6H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz- $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 13.90; 20.90; 30,17; 47.86; 101.46; 106.31; 108.44; 115.92; 123.58; 129.96; 141.85; 148.25; 148.91; 166.04.

E.M. (intensidade relativa %):  $m/z = 303$  ( $\text{M}^+$ , 15); 175 (100); 145 (63); 117 (40); 89 (72).

I.V. ( $\nu_{\text{max}}$ , filme): 2959; 2930; 2872; 1648; 1490; 1424  $\text{cm}^{-1}$ .

p.f. ( $^{\circ}\text{C}$ ): óleo viscoso

### **5.3 - Procedimento experimental referente à síntese das amidas via a metodologia da Síntese Orgânica Combinatória**

#### **5.3.1 - Preparação do ácido 3,4 – metilenodioxicinâmico**

Em um balão de fundo redondo foram dissolvidos os aldeídos adequados para cada ácido a ser obtido e o ácido malônico em uma mistura de piridina/piperidina (Tabela 40). Em seguida aqueceu-se o sistema até atingir o refluxo que foi mantido por aproximadamente uma hora e trinta minutos. Uma vez resfriado o sistema, foi adicionado ao mesmo HCl 38% (10 mL) e água destilada (25 mL). O produto desejado se apresentou na forma de um precipitado de cor branca que foi filtrado do meio reacional num funil de Buchner. Após ser lavado com água destilada (3 x 50 mL) , o precipitado foi transferido para uma placa de petri e colocado na estufa por 6 horas a 60<sup>0</sup>C.



**Tabela 40:** Quantidades dos reagentes utilizados na preparação dos ácidos

Aldeído	Ácido	Aldeído (g/mmol)	Ácido Malônico (g/mmol)	Piperidina (mL/mmol)	Piridina (mL/mmol)	Rend. (%)
Piperonal	A <sup>1</sup>	3,00/20,00	4,57/40,00	0,16/1,60	9,70/120	82
p-Anisaldeído	A <sup>10</sup>	1,50/11,00	2,52/24,20	0,08/0,88	5,25/64,90	93
3,4-Dimetoxi- benzaldeído	A <sup>2</sup>	1,00/6,00	1,37/13,20	0,048/0,48	2,86/35,4	87
4- Trifluorometoxi- benzaldeído	A <sup>9</sup>	0,50/2,63	0,60/5,78	0,02/0,21	1,26/15,52	Quanti- tativo

### 5.3.2 - Preparação dos cloretos dos ácidos

Em um balão de fundo redondo, sob atmosfera de nitrogênio, provido de agitação magnética e condensador de refluxo, o ácido correspondente ao cloreto de interesse foi colocado em SOCl<sub>2</sub> e em seguida aqueceu-se o sistema até aproximadamente 50°C (Tabela 41). Após 4 horas de reação adicionou-se hexano anidro e trocou-se o condensador de refluxo por um sistema de destilação a fim de retirar o excesso de SOCl<sub>2</sub>. O resíduo proveniente no balão ao final da destilação do solvente é o cloreto do ácido de interesse.

**Tabela 41:** Quantidades utilizadas nas reações de formação de cloreto de ácido

<b>Cloreto de Ácido</b>	<b>Ácido (g/mmol)</b>	<b>Cloreto de tionila (g/mmol)</b>
<b>A<sup>1</sup></b>	1,00/5,20	6,18/52,00
<b>A<sup>10</sup></b>	0,50/2,80	3,33/28,00
<b>A<sup>2</sup></b>	1,00/4,80	5,71/48,00
<b>A<sup>9</sup></b>	0,50/2,54	3,02/25,4

### 5.3.3 - Preparação das coleções combinatórias derivadas dos ácidos A<sup>1-10</sup>

Em tubo de ensaio grande (20 mL), sob atmosfera de nitrogênio, o cloreto de ácido correspondente foi diluído em diclorometano (3 mL). Adicionou-se as dez aminas a um balão de fundo redondo sob atmosfera de nitrogênio, e diluiu-se com diclorometano (3 mL) (Tabela 42). Transferiu-se a solução com as aminas, gota a gota, ao tubo de ensaio contendo a solução do cloreto de ácido. Deixou-se agitando por 12 horas a temperatura ambiente mantendo a atmosfera de nitrogênio. A finalização da reação foi feita adicionando-se uma solução de NaHCO<sub>3</sub> saturado (3 mL) e a extração feita com diclorometano (10 mL). A fase orgânica foi lavada com água destilada (5 mL) e solução saturada de NaCl (3 mL) e em seguida seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Tabela 42:** Volume de aminas utilizadas na preparação das coleções combinatórias derivadas dos ácidos A<sup>1-10</sup>

<b>Cloreto de Ácido (mmol)</b>	<b>Amina</b>	<b>Volume de Amina (µL)</b>
<b>A<sup>10</sup> (2,8)</b>	Piperidina	30
	Pirrolidina	25
	Ciclohexilamina	35
	Di-n-butilamina	51
	Dietilamina	31
	Benzilamina	33
	Isobutilamina	30
	2-Metilbutilamina	36
	Morfolina	26
	Anilina	28
<b>A<sup>2</sup> (4,8)</b>	<b>Amina</b>	<b>Volume de Amina (µL)</b>
	Piperidina	47
	Pirrolidina	40
	Ciclohexilamina	55
	Di-n-butilamina	80
	Dietilamina	50
	Benzilamina	52
	Isobutilamina	48
	2-Metilbutilamina	56
	Morfolina	42
	Anilina	44

<b>A<sup>9</sup></b> (2,5)	<b>Amina</b>	<b>Volume de Amina (μL)</b>
	Piperidina	27
	Pirrolidina	22
	Ciclohexilamina	31
	Di-n-butilamina	45
	Dietilamina	28
	Benzilamina	29
	Isobutilamina	27
	2-Metilbutilamina	32
	Morfolina	23
	Anilina	25
<b>A<sup>1</sup></b> (5,2)	<b>Amina</b>	<b>Volume de Amina (μL)</b>
	Piperidina	56
	Pirrolidina	48
	Ciclohexilamina	64
	Di-n-butilamina	96
	Dietilamina	59
	Benzilamina	62
	Isobutilamina	57
	2-Metilbutilamina	67
	Morfolina	50
	Anilina	52

<b>A<sup>7</sup></b> (0,9)	<b>Amina</b>	<b>Volume de Amina (μL)</b>
	Piperidina	10
	Pirrolidina	8
	Ciclohexilamina	11
	Di-n-butilamina	16
	Dietilamina	10
	Benzilamina	11
	Isobutilamina	10
	2-Metilbutilamina	11
	Morfolina	9
	Anilina	9
<b>A<sup>3</sup>, A<sup>4</sup>, A<sup>5</sup> e A<sup>6</sup></b> (2,0)	<b>Amina</b>	<b>Volume de Amina (μL)</b>
	Piperidina	22
	Pirrolidina	18
	Ciclohexilamina	25
	Di-n-butilamina	37
	Dietilamina	23
	Benzilamina	24
	Isobutilamina	21
	2-Metilbutilamina	26
	Morfolina	19
	Anilina	20

A <sup>8</sup> (1,3)	Amina	Volume de Amina (μL)
	Piperidina	14
	Pirrolidina	12
	Ciclohexilamina	16
	Di-n-butilamina	24
	Dietilamina	15
	Benzilamina	15
	Isobutilamina	14
	2-Metilbutilamina	16
	Morfolina	12
	Anilina	13

#### 5.3.4 - Preparação das coleções combinatórias derivadas das aminas B<sup>1-10</sup>

Em tubo de ensaio grande (20 mL), sob atmosfera de nitrogênio, os dez cloretos de ácido foram dissolvidos em 3 mL de diclorometano. A amina correspondente foi anteriormente diluída em 3 mL de diclorometano em balão de fundo redondo sob atmosfera de nitrogênio. Transferiu-se a solução da amina, gota a gota ao tubo de ensaio contendo a misturas dos cloretos de ácido. Deixou-se agitando por 12 horas a temperatura ambiente mantendo a atmosfera de nitrogênio. A finalização da reação foi feita adicionando-se uma solução de NaHCO<sub>3</sub> saturado (3 mL) e a extração feita com diclorometano (10 mL). A fase orgânica foi lavada com água destilada (5 mL) e solução saturada de NaCl (3 mL) e em seguida seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. As quantidades para cada cloreto de ácido estão relacionadas na Tabela 43.

**Tabela 43:** Massa dos cloretos de ácido utilizados na preparação das coleções combinatórias derivadas das aminas B<sup>1-10</sup>

Amina	Quantidade (g;mmol)	Cloreto de Ácido	Quantidade (mg;mmol)
B <sup>1</sup>	12,5; 0,59	A <sup>1</sup>	12,5; 0,058
B <sup>2</sup>	13,0; 0,57	A <sup>2</sup>	13,0; 0,059
B <sup>3</sup>	8,0; 0,57	A <sup>3</sup>	8,0; 0,058
B <sup>4</sup>	9,0; 0,54	A <sup>4</sup>	9,5; 0,058
B <sup>5</sup>	10,0; 0,59	A <sup>5</sup>	10,0 0,058
B <sup>6</sup>	11,0; 0,55	A <sup>6</sup>	11,0; 0,058
B <sup>7</sup>	10,0; 0,54	A <sup>7</sup>	10,0; 0,058
B <sup>8</sup>	12,0; 0,57	A <sup>8</sup>	12,0; 0,058
B <sup>9</sup>	13,0; 0,55	A <sup>9</sup>	13,0; 0,058
B <sup>10</sup>	11,0; 0,56	A <sup>10</sup>	11,0; 0,058

### 5.3.5 - Obtenção da 1-[(4-(trifluormetoxi)benzoil]piperidina (A<sup>8</sup>B<sup>1</sup>)

Em um balão de fundo redondo, sob atmosfera de nitrogênio, provido de agitação magnética e condensador de refluxo, o ácido 4-trifluorometoxibenzóico (485,0 mg; 2,3 mmol) foi colocado em SOCl<sub>2</sub> (4 mL) e em seguida aqueceu-se o sistema até aproximadamente 50°C.

Após 4 horas de reação adicionou-se hexano anidro (10,0 mL) e trocou-se o condensador de refluxo por um sistema de destilação, a fim de se retirar o excesso de SOCl<sub>2</sub>. O resíduo obtido foi diluído em diclorometano (10 mL) e sob atmosfera de nitrogênio e banho de gelo a amina piperidina (213,0 mg; 2,5 mmol) foi

adicionada. Após 12 horas, adicionou-se uma solução de NaHCO<sub>3</sub> saturado (30 mL) e a extração foi feita com diclorometano (3 x 20 mL). A fase orgânica foi lavada com água destilada (3 x 20 mL) e solução saturada de NaCl (3 x 20 mL) e em seguida seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz-CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.44 (d, J = 8 Hz, 2H); 7.24 (d, J = 8.0 Hz, 2H); 3.70 (s, 2H), 3.35 (s, 2H), 1,68 (m, 6H).

## **5.4 - Procedimento experimental para os bioensaios das amidas 55-65 e A<sup>8</sup>B<sup>1</sup>**

### **5.4.1 - Bioensaio tópico (contato dorsal) frente a *S. frugiperda***

Um grupo de 10 larvas de segundo instar (5 dias de vida) foram transferidas para placas de Petri e o grupo de lagartas teve seu peso averiguado para assegurar a homogeneidade dos insetos no ensaio. A amida a ser testada foi dissolvida em acetona nas seguintes concentrações: 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-1</sup>, 1 e 10 mg/mL. A quantidade de 1,0 µL da solução foi gotejada no dorso de cada lagarta, individualmente. Para garantir que o inseto não morresse por inanição, foi adicionado na placa de petri por volta de 300 mg de dieta artificial. As lagartas do controle foram tratadas apenas com 1,0 µL de acetona. A mortalidade foi averiguada após 48 horas. Todos os experimentos foram realizados em cinco replicatas. O DL<sub>50</sub> foi determinado utilizando-se o programa Polo Software, o qual utiliza a transformação de Abbott para o controle da mortalidade e as faixas de dose-resposta foram calculadas de acordo com o processo descrito por Finney.



#### **5.4.2 – Bioensaio da amida 65 por ingestão frente a *S. frugiperda***

A amida **65** foi dissolvida em acetona, misturada ao ácido ascórbico, que faz parte da composição da dieta. Após o solvente ter sido evaporado sob vácuo, a mistura foi misturada aos outros componentes da dieta artificial. As concentrações testadas foram: 1, 10, 50 e 100 mg/kg. O controle foi preparado utilizando-se a dieta artificial sem o acréscimo de amida, apenas o solvente foi misturado com o ácido ascórbico. A dieta foi distribuída entre tubos de vidro esterelizados, e cada tubo recebeu uma única larva de *S. frugiperda*. Os tubos foram observados a cada dia e os seguintes parâmetros foram observados:

- a) duração da fase larval e fase pupal
- b) duração do ciclo de vida (da fase larval até a fase adulta)
- c) peso das pupas
- d) percentual de insetos mortos ao final de cada ciclo

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas aplicando-se o teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Cada tubo contendo um inseto, independente da fase de desenvolvimento, foi considerado uma replicata. No entanto, o número de replicatas foi diferente para cada tratamento. Para avaliação da mortalidade na fase larval, pupal e no ciclo total, a unidade experimental foi considerada 5 tubos, cada um contendo apenas 1 larva, com 10 replicatas por tratamento.

#### **5.4.3 - Bioensaio realizado com o fungo simbiote das formigas cortadeiras**

O fungo foi coletado de ninho de formiga cortadeira mantido em laboratório. O meio de cultura utilizado era composto de peptona (5,0 g/L), cloreto de sódio (5,0 g/L), extrato de malte (10,0 g/L), glucose (10,0 g/L) e agar-agar (15,0 g/L). Após um mês, o fungo foi assepticamente transferido para um frasco contendo peptona estéril (1,0 g/L; 30 mL) e foi fragmentado. Posteriormente foi diluído com de solução salina estéril (120 mL) para se obter uma suspensão de micélio para ser inoculado. Para o ensaio, o composto teste foi diluído em diclorometano (1,0 mL) e adicionado em 9,0 mL de meio de cultura em tubos de ensaios tampados. A concentração final das amidas nos tubos testes foi de 25, 50 e 100 µg/mL. O material foi esterilizado a 121 ° C por 10 minutos. A suspensão miscelial foi espalhada em uma superfície de agar e incubada a 25 ± 1 ° C por 30 dias. O bioensaio foi realizado em duplicata e cada amida foi testada em quintuplicata. O controle foi realizado utilizando-se a mesma metodologia sem a presença do composto a ser testado.

#### **5.4.4 - Bioensaio realizado frente às formigas cortadeiras**

As formigas foram coletadas randomicamente de formigueiros mantidos na UNESP de Rio Claro no CEIS – Centro de Estudos de Insetos Sociais.

Durante o ensaio, as formigas foram mantidas em dieta artificial, preparada com glucose (50 g/L), bacto-peptona (10 g/L), extrato de fermento (1,0 g/L) e agar (15 g/L) em água destilada (100 mL) As formigas foram tratadas com dieta artificial contaminada com a amida a ser testada, sendo que o controle foi realizado com dieta sem contaminação.

A concentração final das amidas testadas foi de 25, 50 e 100 µg/mL. Durante o ensaio, as formigas foram mantidas em incubadora a  $25 \pm 1$  °C e com umidade de 70-80 %. O número de formigas mortas foi registrado diariamente. Observou-se a sobrevivência média igual a 50 % utilizando-se o log-rank test por meio do programa GRAPHPAD.

## **Referências Bibliográficas**

## 6 - Referências Bibliográficas

---

<sup>1</sup> WEBER, N.A. *Gardening ants, the attines*. Philadelphia: The American Philosophical Society, data. 146p.

<sup>2</sup> BUENO, O.C. “Formigas urbanas: comportamento das espécies que invadem as cidades brasileiras”. *Vetores e Pragmas*, v.1, n.12, p.13, 1998.

<sup>3</sup> TROPPEMAIR, R. H. *Estudo Zoogeográfico e Ecológico do Gênero Atta (Hymenoptera), com Ênfase sobre Atta laevigata Smith, no Estado de São Paulo*. 1858. 186p. Tese (Doutorado em Área de Concentração) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1858.

<sup>4</sup> WEBER, N.A. “Fungus growing ants”. *Science*, n.153, p.587, 1966.

<sup>5</sup> MARTIN, M.M. “The biochemical basis of the fungus Atinne ant symbiosis”. *Science*, **n.169, p.16, 1970**.

<sup>6</sup> QUINLAN, R.J.; CHERRETT, J.M. “The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*”. *Ecol. Entomol.*, **n.4, p.151, 1979**.

<sup>7</sup> FISHER, P.J.; STRADLING, D.J.; PEGLER, D.N. “Leaf-cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*”. *Mycologist*, **n.8, p.128, 1994**.

---

<sup>8</sup> FISHER, P.J.; STRADLING, D.J.; PEGLER, D.N. “*Leucoagaricus basidiomata* from a live nest of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*”. *Mycol. Res.*, **n.98**, p.884, 1994.

<sup>9</sup> COUTO, L. et al. “Avaliação de eficiência de controle de *Atta sexdens rubropilosa* através do sistema de termonebulização, na região de Aracruz, ES”. *Rev. Árvore*, **n.1**, p.9, 1977.

<sup>10</sup> SANTOS, G.P. et al. “Controle de saúvas pelo sistema de termonebulização na região de Timóteo, MG”. *Brasil Florestal*, **n.9**, p.18, 1979.

<sup>11</sup> ZANUNCIO, J.C., VILELA, E.F., NOGUEIRA, S.B. “Emprego de iscas granuladas e pós secos no controle de *Atta laevigata* no município de Curvelo, MG.” *Rev. Árvore*, **n.2**, p.221, 1980.

<sup>12</sup> CROCOMO, W.B., PARRA, J.R.P. “Consumo e utilização de milho, trigo e sorgo por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae)”. *Rev. Bras. Entomol.*, **n.29**, p.225, 1985.

<sup>13</sup> PARRA J.R.P. “Criação de insetos para estudos com patógenos”.In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. São Paulo:Manole, 1986. p. 348-373.

<sup>14</sup> CRUZ, I.; TURPIN, F.T. “Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estágios de crescimento da cultura do milho”. *Pesq. Agropec. Bras.*, **n.17**,p. 355, 1982.

---

<sup>15</sup> COELHO, A.M.; FRANÇA, G.E. “Seja o doutor do seu milho – nutrição e adubação”. *Potafos, Arquivo do Agrônomo*, n. 2, p.1-25, 1995.

<sup>16</sup> DÁMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. “DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão” *Quim. Nova*, n.25, p.995, 2002.

<sup>17</sup> JACOBSON, M. Botanical Pesticides: past, present, and future. In: ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; MORAND. **Insecticides of Plant Origin., ACS Symp.** Washington: Ser. P. (Eds.), 1989, p. 1-10.

<sup>18</sup> PARMAR, V.S. et al. “Phytochemistry of the genus *Piper*”. *Phytochemistry*, n.46, p.597, 1997.

<sup>19</sup> LEE, E.B., SHIN, K.H., WOO, W.S. “Pharmacological study on piperine.” *Arch. Pharm. Res.*, n.7, p.127, 1984.

<sup>20</sup> KIUCHI, F. et al. “Synthesis and nematocidal activity of aralkyl- and aralkenylamides related to piperamide on second-stage larvae of *Toxocara canis*”. *Chem. Pharm. Bull.*, n.45, p.685, 1997.

<sup>21</sup> EWETE, F.K. et al. “Toxicity of gedunin, piperine and crude extracts of their natural products on growth and development of *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lepidoptera : Pyralidae)”. *Discov. Innovat.*, n.12, p.67, 2000.

---

<sup>22</sup> SCOTT I.M. et al. “Botanical insecticides for controlling agricultural pests: Piperamides and the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* say (Coleoptera : Chrysomelidae)”. *Arch. Insect Biochem.*, **n.54, p.212, 2003.**

<sup>23</sup> MIRANDA J.E. et al. “Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera : Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae)”. *Apidologie*, **n.34, p.409, 2003.**

<sup>24</sup> SCOTT, I.M. et al. “Efficacy of *Piper* (Piperaceae) extracts for control of common home and garden insect pests”. *J. Econ. Entomol.*, **n.97, p.1390, 2004.**

<sup>25</sup> SCOTT, I.M. et al. “Efficacy of botanical insecticides from *Piper* species (Piperaceae) extracts for control of *European chafer* (Coleoptera: Scarabaeidae)”. *J. Econ. Entomol.*, **n.98, p.845, 2005.**

<sup>26</sup> CHAITHONG, U. et al. “Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera : Culicidae)”. *J. Vector Ecol.*, **n.31, p.138, 2006.**

<sup>27</sup> ESTRELA, J.L.V. et al. “Toxicity of essential oils of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* against *Sitophilus zeamais*”. *Pesq. Agropec. Bras.*, **n.41, p.217, 2006.**

<sup>28</sup> SIDDIQUI, B.S. et al. “Two new insecticidal amide dimmers from fruits of *Piper nigrum* Linn”. *Helv. Chim. Acta*, **n.87, p.660, 2004.**



- 
- <sup>29</sup> PARK, I-K. et al. “Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species”. *J. Agric. Food. Chem.*, **n.50**, p.1866, **2002**.
- <sup>30</sup> ESTRELA, J.L.V. et al. “Toxicidade de amidas, análogas à piperina a larvas de *Ascia monuste orseis* Godart (Lepidoptera: Pieridae) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Nuctuidae)”. *Neotrop. Entomol.*, **n.32**, p.343, **2003**.
- <sup>31</sup> MIYAKADO, M., NAKAYAMA, I., OHNO, N. Insecticidal unsaturated isobutylamides: from natural products to agrochemical leads. In: ARNASON, J.T., PHILOGÈNE; B.J.R., MORAND. **Insecticides of Plant Origin.**, ACS Symp. Washington: Ser P. (Eds.), 1989, p. 173-187.
- <sup>32</sup> DA SILVA, R.V. et al. “Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*”. *Phytochemistry*, **n.59**, p.521, **2002**.
- <sup>33</sup> HOMANS, A.L.; FUCHS, A., “Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances”. *J. Chromatogr.*, **n.51**, p.327, **1970**.
- <sup>34</sup> DYER, L.A. et al “Synergistic effects of three piper amides on generalist and specialist herbivores” *J. Chem. Ecol.*, **n.29**, p.2499, **2003**.
- <sup>35</sup> PAULA, V.F. et al. “Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine”. *Pest. Manag. Sci.*, **n.56**, p.68, **2000**.

- 
- <sup>36</sup> DIAS, R.L.A.; CORRÊA, A.G. “Aplicações da química combinatória no desenvolvimento de fármacos”. *Quim. Nova*, **n.24**, p.236, 2001.
- <sup>37</sup> GRAEBIN, C.S.; EIFLER-LIMA, V.L. “O uso de microondas na síntese orgânica em fase sólida”. *Quim. Nova*, **n.28**, p.73, 2005.
- <sup>38</sup> KANG, K.H. et al. “Solution-phase combinatorial synthesis of isoxazolines and isoxazoles using [2+3] cycloaddition reaction of nitriles oxides”. *Tetrahedron Lett.*, **n.42**, p.1057, 2001.
- <sup>39</sup> BATISTA-PEREIRA, L. G. et al. “Insecticidal activity of synthetic amides on *Spodoptera frugiperda*”. *Z. Naturforsch.*, **n.61C**, p.196, 2006.
- <sup>40</sup> SCOTT, W.P.; MCKIBBEN, G.H. “Toxicity of black pepper extract to boll weevils”. *J. Econ. Entomol.*, **n.71**, p.343, 1978.
- <sup>41</sup> GBEWONYO, W.S.K.; CANDY, D.J.; ANDERSON, M. “Structure-activity relationships of insecticidal amides from *Piper guineense* root” *Pest. Sci.*, **n.37**, p.57, 1993.
- <sup>42</sup> TANZUBIL, P.B.; MCCAFFERY, A.R. “Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the African armyworm, *Spodoptera exempta*”. *Crop Prot.*, **n.9**, p.383, 1990.

---

<sup>43</sup> WHEELER, D.A. et al. "Screening of Costa Rica *Trichilia* species for biological activity against the larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)". *Biochem. Syst. Ecol.*, **n.29**, p.347, 2001.

<sup>44</sup> BATISTA-PEREIRA, L.G. et al. "Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* against *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*." *Pest. Manag. Sci.*, **n.58**, p.503, 2002.

<sup>45</sup> MIKOLAJCZAK, K.L.; ZILKOWSKI, B.W.; BARTELT, R.J. "Effect of Meliaceae seed extracts on growth and survival of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)". *J. Chem. Ecol.*, **n.15**, p.121, 1989.

<sup>46</sup> NEAL J.J. "Myristicin, safrole, and fagaramide as phytosynergists of xanthotoxin". *J. Chem. Ecol.*, **n.15**, p.309, 1989.

<sup>47</sup> PAGNOCCA, F.C. et al. "Synthetic amides toxic to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* L. and its symbiotic fungus". *Agric. Forest Entomol.*, **n.8**, p.17, 2006.

<sup>48</sup> SU, H.C.F.; HORVAT, R. "Isolation, identification, and insecticidal properties of *Piper nigrum* amides". *J. Agric. Food Chem.*, **n.29**, p.115, 1981.

<sup>49</sup> SCOTT, I.M. et al. "Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: Synergistic interaction of Piperamides". *Agric. Forest Entomol.*, **n.4**, p.137, 2002.  
of Piperamides". *Agric. Forest Entomol.*, **4**: 137, 2002.

---

<sup>50</sup> CAPRON, M.A.; WIEMER, D.F. “Piplaroxide an ant-repellent piperidine epoxide from *Piper tuberculatum*”. *J. Nat. Prod.*, **n.59**, p.794, 1996.

<sup>51</sup> HODGSON, E.; LEVI, P.E. Interactions of piperonyl butoxide with cytochrome P450. In: JONES, D.G. **Piperonyl Butoxide: The Insecticide Synergist**. London: Academic Press, 1998. p.41-53.

<sup>52</sup> VICTOR, S.R. et al. “Toxicity of synthetic piperonyl compounds to leaf-cutting ants and their symbiotic fungus”. *Pest Manag. Sci.*, **n.57**, p.603, 2001.

<sup>53</sup> SMITH, P.W. et al. “Synthesis and biological evaluation of a library containing potentially 1600 amides esters – A strategy for rapid compound generation and screening” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **n.4**, p.2821, 1994.