

LEONARDO FRANCISCO DE SOUZA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA DE
DERIVADOS DO TIMOL E DA PIPERAZINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
MARÇO - 2000

LEONARDO FRANCISCO DE SOUZA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA DE
DERIVADOS DO TIMOL E DA PIPERAZINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”

APROVADA: 14 de julho de 1999.

Prof^ª Maria Amelia dos Santos
(Conselheira)

Prof^ª Célia Regina Alvares Maltha
(Conselheira)

Prof^ª Rosângela D'arc de Lima Barbosa

Prof. Elson Santiago de alvarenga

Prof. Antônio Jacinto Demuner
Orientador

À memória de
Agnaldo Luiz de Souza
(1937 - 1992).

AGRADECIMENTO

A Deus, por tudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Antônio Jacinto Demuner, que, com paciência, competência, humanidade e confiança, orientou meus trabalhos e estudos nas boas horas e nas adversidades.

À Professora Maria Amelia dos Santos (Universidade Federal de Uberlândia), que orientou e colaborou na realização dos ensaios biológicos.

À Professora Célia Regina A. Maltha, cuja revisão deste trabalho foi preciosa.

Aos estudantes de Iniciação Científica Leandro Coelho Dalvi e Luis Silvino, amigos cuja colaboração foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao técnico do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), Sr. Antônio, que, com muita paciência, dedicação e amizade, ensinou-me a trabalhar corretamente.

Aos amigos do LASA, Adilson, Fernando Barcelos, Almir, Larissa, Patrícia, Jeferson, Vanderlúcia, Maria Lúcia e Remilson, que, de uma forma ou outra, ajudaram-me na parte experimental deste trabalho.

Aos colegas da Comissão Nacional de Energia Nuclear - Distrito de Goiânia, em especial o gerente Dr. Paulo Ney, que muito ajudou na realização deste trabalho.

À Neusa Clara Teixeira, que sempre esteve ao meu lado e confiou em mim.

A toda a minha família, em especial minha mãe Leila, que sempre me deu forças durante esta jornada.

Aos amigos da Renovação Carismática Católica de Viçosa, que incessantemente intercederam por mim e por este trabalho, com muitas orações.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado a todos, e que Deus os abençoe.

BIOGRAFIA

LEONARDO FRANCISCO DE SOUZA, filho de Agnaldo Luiz de Souza e Leila Maria Leão Cotta de Souza, nasceu em Sete Lagoas, no interior de Minas Gerais, em 28 de março de 1974.

Em 1989, ingressou na Escola Técnica de Sete Lagoas, onde, em 1992, recebeu o título de Técnico em Química. No ano seguinte ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde, em fevereiro de 1997, recebeu o título de Bacharel em Química.

Em março de 1997, iniciou o curso de Pós-Graduação em Agroquímica, com área de concentração em Química de Produtos Naturais e Síntese de Agroquímicos, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 14 de julho de 1999.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
EXTRATO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1 - SÍNTESE DE DERIVADOS DO TIMOL E DA PIPERAZINA.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	4
1.1. Nematóides: aspectos gerais e sua importância econômica.....	5
1.2. O controle químico dos fitonematóides.....	8
1.3. Outras formas de controle de nematóides.....	9
1.4. O timol.....	10
1.5. A piperazina.....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.1. Generalidades metodológicas.....	17

	Página
2.2. Reação de formação do composto 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8].....	18
2.3. Reação de formação do composto 2-etoxi-1-isopropil-4-metilbenzeno[9].....	19
2.4. Reação de formação do composto 1-isopropil-4-metil-2-octiloxibenzeno [10].....	21
2.5. Reação de formação do 1-isopropil-4-metil-2-octadeciloxibenzeno [11].....	22
2.6. Reação de formação do 2-(2',3',4',5',6'-pentafluorobenziloxi)-1-isopropil-4-metilbenzeno [12].....	24
2.7. Reação de formação do 1-isopropil-4-metil-2-metoxibenzeno [13].	25
2.8. Tentativas de formação do composto 2-isopropil-5-metil-4-nitrofenol [14].....	27
2.9. Tentativas de formação do 2-isopropil-5-metil-1-metoxi-4-nitrobenzeno [16].....	30
2.10. Reação de formação dos sais de piperazina: cloreto [17], citrato [18], fosfato [19], oxalato [20] e sulfato [21].....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1. Síntese de compostos derivados do timol.....	33
3.2. Síntese de sais derivados da piperazina.....	35
3.3. Preparo do 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8].....	35
3.4. Preparo do 1-isopropil-2-etoxi-4-metilbenzeno [9].....	41
3.5. Preparo do 1-isopropil-4-metil-2-octiloxibenzeno [10].....	45
3.6. Preparo dos compostos 1-isopropil-4-metil-2-octadeciloxibenzeno [11], 2-(2',3',4',5',6'-pentafluorobenziloxi)-1-isopropil-4-metilbenzeno [12] e 1-isopropil-4-metil-2-metoxibenzeno [13].....	48
3.7. Tentativa de formação do composto 2-isopropil-5-metil-4-nitrofenol [14].....	52
3.8. Tentativas de formação do 3-isopropil-6-metil-4-metoxi-1-nitrobenzeno [16]	57

	Página
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	58
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA DOS DERIVADOS DO TIMOL.....	59
1. INTRODUÇÃO.....	59
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	73
CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA DOS SAIS DE PIPERAZINA.....	74
1. INTRODUÇÃO.....	74
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	76
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	86
RESUMO E CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

LISTA DE QUADROS

	Página
CAPÍTULO 1	
1 Perda de produção causada anualmente no mundo por nematóides fitoparasitas em diferentes culturas de expressão econômica (adaptado de SASSER e FREECKMAN, 1987).....	7
2 Dados de RMN de ^{13}C dos éteres [11], [12] e [13].....	51
3 Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto [15].....	54
CAPÍTULO 2	
1 Porcentagem de mortalidade de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> tratados com derivados do timol ($5\ \mu\text{g mL}^{-1}$)..	69
2 Porcentagem de mortalidade de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> tratados com derivados do timol ($50\ \mu\text{g mL}^{-1}$)	69
3 Porcentagem de mortalidade de juvenis de <i>Heterodera glycines</i> tratados com derivados do timol ($5\ \mu\text{g mL}^{-1}$).....	70
4 Porcentagem de mortalidade de juvenis de <i>Heterodera glycines</i> tratados com derivados do timol ($50\ \mu\text{g mL}^{-1}$).....	70

CAPÍTULO 3

1	Porcentagem de mortalidade de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> tratados com sais de piperazina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$)...	82
2	Porcentagem de mortalidade de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> tratados com sais de piperazina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$)..	82
3	Porcentagem de mortalidade de juvenis de <i>Heterodera glycines</i> tratados com sais de piperazina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$).....	83
4	Porcentagem de mortalidade de juvenis de <i>Heterodera glycines</i> tratados com sais de piperazina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).....	83

LISTA DE FIGURAS

	Página
1	Propostas de sínteses para os derivados do timol..... 2
2	Propostas de síntese de sais de piperazina..... 3

CAPÍTULO 1

1	Rota metabólica do timol no organismo de ratos..... 15
2	Etapas para a formação dos éteres derivados do timol..... 34
3	Síntese do 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8] a partir do timol..... 35
4	Espectro no IV (NaCl) do composto 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8]..... 38
5	Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8]..... 39
6	Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8]..... 40
7	Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135, 50 MHz, CDCl_3) do composto 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8]..... 40
8	Síntese do 1-isopropil-2-etoxi-4-metilbenzeno [9] a partir do timol..... 41

	Página
9	Espectro no IV (NaCl) do composto 1-isopropil-2-etoxi-4-metilbenzeno [9]..... 42
10	Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do 1-isopropil-2-etoxi-4-metilbenzeno [9]..... 43
11	Parte do espectro de RMN de ^1H (δ de 6,6 a 7,2; 200 MHz, CDCl_3 do composto 1-isopropil-2-etoxi-4-metilbenzeno [9]..... 44
12	Síntese do 1-isopropil-4-metil-2-octiloxibenzeno [10] a partir do timol..... 45
13	Parte do espectro de RMN de ^{13}C (δ de 14 a 32; DEPT 135, 50 MHz, CDCl_3) do composto 1-isopropil-4-metil-2-octiloxibenzeno [10]..... 47
14	Competição entre as reações de eliminação e substituição..... 49
15	Procedimento utilizado nas tentativas de obtenção do composto 2-isopropil-5-metil-4-nitrofenol [14]..... 52
16	Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da timoquinona [15]..... 55
17	Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da timoquinona [15]..... 56

CAPÍTULO 2

1	Estrutura dos compostos avaliados nesta etapa do trabalho..... 65
2	Porcentagem de mortalidade de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> tratados com derivados do timol (5 e $50\mu\text{g mL}^{-1}$)..... 71
3	Porcentagem de mortalidade de juvenis de <i>Heterodera glycines</i> tratados com derivados do timol (5 e $50\mu\text{g mL}^{-1}$)..... 72

CAPÍTULO 3

1	Estruturas dos compostos avaliados nesta etapa do trabalho..... 78
2	Porcentagem de mortalidade de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> tratados com sais de piperazina (5 e $50\mu\text{g mL}^{-1}$).. 84

	Página
3 Porcentagem de mortalidade de juvenis de <i>Heterodera glycines</i> tratados com sais de piperazina (5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$).....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	deslocamento químico
CCD	cromatografia em camada delgada
CD ₃ OD	metanol deuterado
CDCl ₃	deuteroclorofórmio
d	duplete
DCM	diclorometano
DEPT	Distortionless Enhanced Polarization Transfer
Hz	Hertz
IV	infravermelho
J	constante de acoplamento escalar (em Hertz)
m	multiplete
MHz	megahertz
NCS	nematóide do cisto da soja
R _f	fator de retenção
RMN de ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	simpleto
t	triplete
Te	temperatura de ebulição

Tf	temperatura de fusão
THF	tetraidrofurano
UV	ultravioleta

EXTRATO

SOUZA, Leonardo Francisco de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2000. **Síntese e avaliação da atividade nematicida de derivados do timol e da piperazina.** Orientador: Antônio Jacinto Demuner. Conselheiros: Maria Amelia dos Santos e Célia Regina Álvares Maltha.

Neste trabalho foram sintetizados a timoquinona [15] e os éteres derivados do timol, 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8; 35,8%], 2-etoxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [9; 18,8%], 1-isopropil-4-metil-2-octiloxibenzeno [10; 23,6%], 1-isopropil-4-metil-2-octadeciloxibenzeno [11; 33,0%], 2-(2',3',4',5',6'-pentafluorobenziloxi)-1-isopropil-4-metilbenzeno [12; 32,0%] e 1-isopropil-4-metil-2-metoxibenzeno [13; 75,8%]. Foram também sintetizados os sais derivados de piperazina: cloreto de piperazina [17], citrato de piperazina [18], fosfato de piperazina [19], oxalato de piperazina [20] e sulfato de piperazina [21]. Os éteres derivados do timol foram preparados através da síntese de Williamson, entre o timol e os compostos halogenados aromáticos e alifáticos. A timoquinona [15] foi obtida como produto da nitração do timol, utilizando ácido sulfúrico/nitrato de sódio. Os sais derivados da piperazina foram sintetizados mediante reação entre a piperazina e um ácido, apresentando rendimento quantitativo. Os ensaios biológicos dos produtos sintetizados e do timol foram realizados *in vitro*, com os nematóides *Meloidogyne incognita* raça 3 e

Heterodera glycines, utilizando-se doses de 5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos compostos sintetizados. Nestes bioensaios, os índices de mortalidade para o *Meloidogyne incognita* variaram de 1,8 a 81,8% na concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de 5,3 a 86,7% na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para *Heterodera glycines* estes índices variaram de 0 a 83% na concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de 0 a 88% na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estes resultados permitiram observar a influência dos diferentes grupos substituintes, dos ânions e da concentração dos compostos sintetizados sobre sua atividade nematicida. Observou-se também diferença entre os mecanismos de ação destes compostos nas espécies *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*, sugerindo que uma abordagem diferente deve ser feita para a síntese de nematicidas que visam ao controle de *Heterodera glycines*.

ABSTRACT

SOUZA, Leonardo Francisco de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March, 2000. **Synthesis and evaluation of nematicidal activity of the derivatives of thimol and piperazine.** Adviser: Antônio Jacinto Demuner. Committee members: Maria Amélia dos Santos and Célia Regina Álvares Maltha.

In this work were synthesized the thymoquinone [15] and the derivatives ethers of the thymol, 2-benzyloxy-1-isopropyl-4-methylbenzene [8; 35.8%], 2-ethoxy-1-isopropyl-4-methylbenzene [9; 18.8%], 1-isopropyl-4-methyl-2-octyloxybenzene [10; 23.6%], 1-isopropyl-4-methyl-2-octadecyloxybenzene [11; 33.0%], 2-(2',3',4',5',6'-pentafluorobenzyloxy)-1-isopropyl-4-methylbenzene [12; 32.0%] and 1-isopropyl-4-methyl-2-methoxybenzene [13; 75.8%]. they were also synthesized the derived salts of piperazine: piperazine chloride [17], piperazine citrate [18], piperazine phosphate [19], piperazine oxalate [20] and piperazine sulphate [21]. The derived ethers of the thymol were prepared through the Williamson synthesis, between the thymol and the halogenates compounds aromatics and aliphatics. The thymoquinone [15] was obtained as product of the nitration of the thymol, using sulfuric acid/sodium nitrate. The derived salts of the piperazine were synthesized by means of reaction between the piperazine and an acid, presenting quantitative yield. The biological assays of the synthesized products and of the thimol were carried *in vitro*, with the nematodes *Meloidogyne*

incognita strain 3 and *Heterodera glycines*, using doses of 5 and 50 mg mL⁻¹ of the synthesized compounds. In these bioassays, the mortality rate for *Meloidogyne incognita* varied from 1.8 to 81.8% at a 5 mg mL⁻¹ concentration and of 5.3 to 86.7% at a 50 mg mL⁻¹ concentration. For *Heterodera glycines* these rates varied from 0 to 83% at a 5 mg mL⁻¹ concentration and from 0 to 88% at a 50 mg mL⁻¹ concentration. These results allowed to observe the influence of the different substituents groups, of the anions and of the concentration of the synthesized compounds, on its nematicidal activity. It was also observed difference among the action mechanism of these compounds in *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines*, suggesting that a different approach should be made for the synthesis of nematicides that seek the control of *Heterodera glycines*.

INTRODUÇÃO

As perdas de produção causadas por nematóides fitoparasitas nas principais culturas agrárias são estimadas em cerca de 12% da produção ou em torno de 78 bilhões de dólares por ano, em todo o globo (SASANELLI, 1995). Estas perdas podem ser muito maiores do que esta estimativa, uma vez que os sintomas de ataque destes fitoparasitas não são específicos, podendo confundir-se com os de outras doenças, de tal maneira que o agricultor detecta anomalias e irregularidades nas culturas apenas quando o nível de infestação por nematóides já é bastante alto e de difícil controle (BAKER et al., 1994).

Para combater estes patógenos, faz-se necessário pesquisar e desenvolver novas formas de controle destes, bem como aperfeiçoar aquelas já existentes.

Uma das formas de controle de nematóides é o controle químico, ou seja, o uso de produtos químicos com atividade nematicida.

Com o intuito de obter compostos nematicidas mais eficazes e, concomitantemente, reduzir o impacto ambiental provocado pela introdução no meio ambiente de produtos tóxicos à fauna e à flora, este trabalho teve como objetivo a síntese de compostos derivados do timol e da piperazina.

A escolha do timol como estrutura básica para a síntese dos derivados deve-se ao fato de que este composto possui, além de propriedades antissépticas, antifúngicas e bactericidas, conhecida atividade anti-helmíntica em animais

(BENJILALI et al., 1986; MERCK INDEX, 1996), possibilitando a obtenção de derivados com alta especificidade e eficácia no controle de fitonematóides.

Apesar de a literatura reportar o uso do timol em diversas áreas, inclusive contra fitonematóides (SOLER et al., 1996), não há registros do seu uso e de seus derivados contra fitonematóides dos gêneros *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*. Este trabalho, portanto, teve como um de seus objetivos a síntese de derivados do timol, conforme o seguinte esquema (Figura 1).

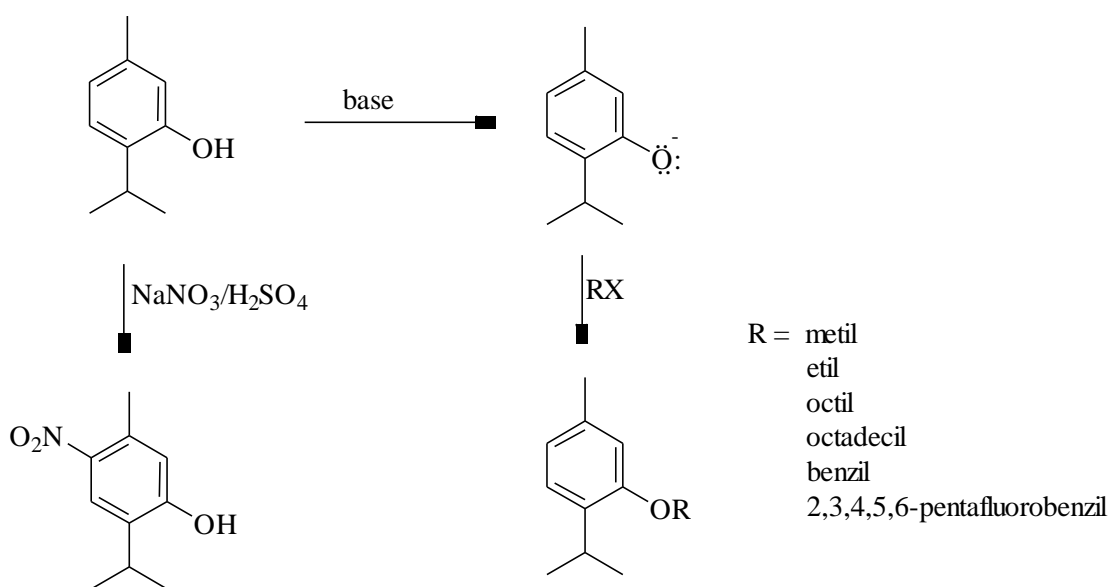


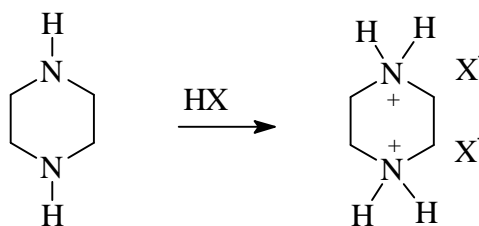
Figura 1 - Propostas de sínteses para os derivados do timol.

A formação desses derivados buscava avaliar a influência da extensão e do tipo de grupo inserido, obtendo, assim, parâmetros de comparação para a avaliação da influência do grupo hidroxila no timol.

A piperazina é um composto com amplo espectro de aplicações químicas e farmacêuticas comumente utilizado como anti-helmíntico em animais desde 1952 (ZANINI e OGA, 1989). É administrada sob a forma de sais, possuindo alta atividade e toxicidade virtualmente ausente em dosagens terapêuticas. Além

disso, seu custo é relativamente baixo (BHATT et al., 1990), tornando-a também potencialmente útil no controle de fitonematóides.

Assim, este trabalho também teve como objetivo a síntese de sais derivados da piperazina pela reação entre a piperazina e os ácidos, conforme o esquema a seguir (Figura 2).



X = citrato, cloreto, fosfato, oxalato e sulfato.

Figura 2 - Propostas de síntese de sais de piperazina.

As sínteses buscavam avaliar a influência do ânion ligado à piperazina sobre sua atividade contra os fitonematóides, permitindo dessa forma a obtenção de dados sobre o modo de ação desses compostos no organismo destes fitonematóides.

Os compostos sintetizados derivados do timol e da piperazina foram submetidos a testes biológicos para avaliação de sua atividade nematicida, através de ensaios *in vitro*, contra o nematóide de galhas (*Meloidogyne incognita*) e o de cisto (*Heterodera glycines*).

CAPÍTULO 1

SÍNTESE DE DERIVADOS DO TIMOL E DA PIPERAZINA

1. INTRODUÇÃO

Milhares de toneladas de alimentos são consumidas a cada dia pela população mundial, estimada atualmente em mais de 5 bilhões de habitantes. Considerando que a maioria desses alimentos são vegetais cultivados pelo homem, foi surgindo ao longo do tempo uma intensa necessidade de se melhorar cada vez mais o rendimento das colheitas, visando atender ao consumo mundial. Além disso, a produção de alimentos é uma fonte de divisas para muitos países de economia essencialmente agrícola, além daqueles em que os produtos agrícolas são a base de exportação, como é o caso do Brasil, cuja economia ficaria seriamente abalada se não fosse essa atividade.

Dentre os fatores que provocam substanciais perdas de colheitas, destacam-se o ataque de diversas pragas e a indução de doenças por diferentes patógenos, havendo a necessidade de controle imediato. Nesse sentido, o controle utilizando produtos químicos é ainda o método que produz resultados mais

imediatos e eficientes, sendo estes os maiores agentes de proteção de plantas contra insetos, plantas daninhas e patógenos de plantas (DUKE et al., 1992).

1.1. Nematóides: aspectos gerais e sua importância econômica

Um dos principais patógenos de plantas responsáveis por grandes perdas econômicas são os nematóides. Estes microrganismos, habitantes do solo e da água, que somam mais de 20.000 espécies conhecidas espalhadas por todo o planeta, são de dimensões reduzidas, mas podem deixar um rastro de prejuízo certamente descomunal, se medidas de controle não forem empregadas a tempo (MARTINS e CASTRO, 1997).

Medindo de 50 a 250 μm de largura por 500 a 4.000 μm de comprimento, milhões destes organismos podem viver em um metro quadrado de solo, porém somente cerca de 3% deles têm sido estudados e descritos (BAKER et al., 1994). Os fitonematóides dos gêneros *Meloidogyne* e *Heterodera* atacam quase todas as culturas, sendo considerados os grupos mais importantes devido à sua ampla distribuição, polifagia, diferenciação biológica ligada ao parasitismo entre populações de mesma espécie e alta capacidade de multiplicação durante a estação de crescimento da planta. A maioria deles ataca as raízes das plantas hospedeiras, interferindo na absorção de água e nutrientes do solo. Este ataque acentua-se a cada ano, até chegar a um ponto no qual as raízes ficam totalmente comprometidas. Como consequência, aparecem nas plantas infestadas sintomas como amarelamento de folha, redução de tamanho e murcha.

As perdas de produção causadas por nematóides fitoparasitas são estimadas em torno de 12% (SASANELLI, 1995), ou cerca de 78 bilhões de dólares por ano (BAKER et al., 1994). Entretanto, as perdas são provavelmente muito maiores do que o estimado, uma vez que os sintomas na planta de danos causados por fitonematóides não são específicos, podendo ser confundidos com os de outras doenças, resultando em perdas não-notificadas.

Nas regiões tropicais e subtropicais, fatores ambientais como temperatura, tipo de solo, vegetação e estações chuvosas favorecem o

desenvolvimento, a reprodução e a sobrevivência dos nematóides por vários anos (LUC et al., 1990).

O Quadro 1 mostra os prejuízos provocados anualmente pelo ataque de fitonematóides a diversos tipos de culturas em toda a extensão do globo terrestre.

Um exemplo substancial dos prejuízos causados por estes parasitas são as perdas causadas pelo nematóide do cisto da soja (NCS), *Heterodera glycines* Ichinohe, um dos mais importantes parasitas que atacam a soja. A infecção causa necrose da raiz, reduz a nodulação e provoca a supressão do crescimento de brotos, acompanhadas por severa clorose. De 1989 a 1991, as perdas de colheita devido ao NCS foram estimadas em aproximadamente 320 milhões de dólares por ano nos EUA (DOUONIK, 1993).

Na China estima-se que mais de 70% das plantações de soja estejam infectadas por este patógeno (LIU et al., 1996).

Este nematóide foi detectado pela primeira vez no Brasil na safra de 1991/92 e, atualmente, está presente em 69 municípios de sete estados brasileiros (Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul), onde tem-se observado rápida dispersão. Em 91/92, estimava-se que a área infestada fosse de 10.000 hectares. Mais recentemente, acredita-se que essa área esteja em torno de um milhão e setecentos mil hectares (SILVA et al., 1997). As perdas econômicas causadas, no Brasil, por este nematóide foram da ordem de 32,4 milhões de dólares em 1995 (ANDRADE e ASMUS, 1995).

Quadro 1 - Perda de produção causada anualmente no mundo por nematóides fitoparasitas em diferentes culturas de expressão econômica (adaptado de SASSER e FREECKMAN, 1987)

Cultura Agrária	Perda de produção (%)
Algodão	10,7
Arroz	10,0
Banana	19,7
Batata	12,2
Cacau	10,5
Café	15,0
Cana-de-açúcar	15,3
Fumo	14,7
Melancia	16,9
Melão	13,8
Milho	11,8
Soja	10,6
Sorgo	3,9
Tomate	20,6

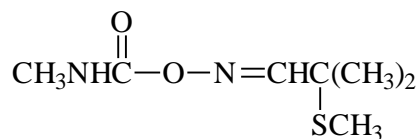
1.2. O controle químico dos fitonematóides

Muitas formas de controle de nematóides foram desenvolvidas, dentre elas a rotação de culturas, o controle biológico, o melhoramento genético das plantas, visando a criação de espécies vegetais resistentes aos nematóides, e o controle químico (BAKER et al., 1994).

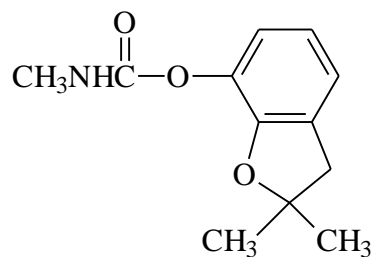
O controle químico, ou seja, o uso de nematicidas, é utilizado desde 1943 como um meio eficiente e econômico no controle dos fitonematóides no campo. Os agricultores utilizam nematicidas principalmente porque através deles conseguem reduzir de forma rápida o prejuízo econômico causado pelos fitonematóides. Logo, a primeira vantagem do controle químico sobre os outros métodos é reduzir, a curto prazo, a densidade dos nematóides em níveis tão baixos que não produzam danos econômicos, ao mesmo tempo que permite ao agricultor plantar imediatamente após a aplicação do nematicida (FRANCO, 1992).

Muitos pesticidas utilizados para o controle de insetos e nematóides são organofosforados ou carbamatos, que inibem a acetilcolinesterase (Corbett et al., 1984, citados por NOEL e MAYASICH, 1991). A acetilcolinesterase e as esterases não-específicas, que atacam as ligações carboxilester, possuem sítios ativos similares e são inibidas da mesma maneira por estes pesticidas (Kirsch, 1971, citado por NOEL e MAYASICH, 1991).

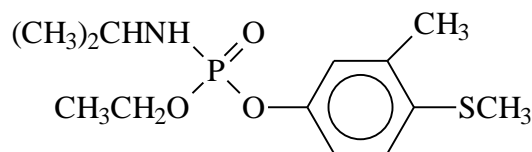
Atualmente, alguns nematicidas à base de carbamatos utilizam o carbofuran (1) como ingrediente ativo, e outros utilizam o aldicarb (2). Os organofosforados mais comumente recomendados utilizam o fenamifós (3) como ingrediente ativo (MARTINS e CASTRO, 1997).



(1)



(2)



(3)

1.3. Outras formas de controle de nematóides

A pesquisa sobre métodos alternativos de controle de doenças e pragas tem aumentado nos últimos anos, em virtude da preocupação da sociedade quanto aos efeitos dos pesticidas sobre a saúde do homem e o ambiente. Existe também a preocupação quanto ao surgimento de novas raças, em consequência da seleção de organismos resistentes aos pesticidas (Jatala, 1986, citado por CASTRO, 1998). Em decorrência disso, diversas formas alternativas de controle de fitonematóides têm surgido, como controle físico, práticas culturais, controle biológico, desenvolvimento de cultivares resistentes e uso de produtos naturais.

Diversos fatores físicos, como o calor, a inundação, a solarização, entre outros, podem exercer algum controle sobre fitonematóides, apresentando a vantagem de não deixar resíduos tóxicos no solo. No entanto, a aplicação desses métodos é dispendiosa, sendo necessária a avaliação do retorno econômico da cultura a ser conduzida no local (MAAS, 1987).

A rotação de culturas, a alteração de épocas de plantio e a eliminação de plantas infectadas, bem como medidas fitossanitárias na aquisição de mudas, têm

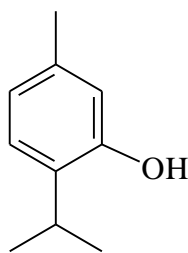
sido as principais práticas culturais para reduzir a infestação por fitonematóides (STIRLING, 1991; WAQUIN, 1997).

Os fungos nematófagos têm merecido especial atenção, pois o solo contém milhares de espécies de parasitas, predadores, competidores e antagonistas de nematóides, tornando a manipulação de inimigos naturais de nematóides um método de controle biológico bastante promissor (BAKER et al., 1994). CASTRO (1998) avaliou a predação de *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria*, *P. brachyurus* e *R. similis* pelo fungo *Arthrobotrys musiformis*, espécie bastante distribuída em solos brasileiros (SANTOS et al., 1991). A porcentagem de juvenis de segundo estágio de *M. javanica* predados foi significativamente maior que as das demais espécies avaliadas, e fatores como temperaturas de crescimento e idades das culturas do fungo influenciaram a predação. Este estudo mostrou que a compreensão dos fatores que regulam a competição entre organismos é essencial para aumentar a efetividade da introdução desses antagonistas no controle biológico.

Os constituintes de plantas também podem ter vários efeitos sobre nematóides, alterando seu comportamento, desenvolvimento e outros processos controlados por enzimas (BAKER et al., 1994). BARCELOS (1997) demonstrou a inibição da eclosão de ovos de *M. incognita* raça 3 por extratos a quente e a frio da raiz e das partes aéreas de mucuna preta (*Mucuna aterrima*) e por outros compostos isolados desta planta. Entretanto, a pesquisa de produtos naturais com atividades nematicidas e, ou, nematostáticas é um campo que ainda precisa ser bem desenvolvido.

1.4. O timol

Também chamado de 4-isopropil-3-hidroxi-1-metilbenzeno, o timol apresenta-se sob a forma de cristais brancos ($T_f = 51,5 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_e = 233 \text{ }^\circ\text{C}$), de odor característico e sabor cáustico.



[4]

Foi isolado pela primeira vez por Neumann em 1719. Em 1846, Arppe o obteve a partir dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* L. e *Monarda spicata* L, família Labiatae (MERCK INDEX, 1996). Também ocorre em outros óleos essenciais de plantas como *Thymus capitatus* (KANDIL et al., 1994); *Thymus serpylloides* subesp. *serpylloides* (família Labiatae), conhecida como “timo da serra” (ARREBOLA et al., 1994); *Origanum vulgare* subesp. *hirtum* (Link) Ietswaart; *Coridothymus capitatus* (L.) Reichenb e *Satureja thymbra*, conhecidas popularmente como “orégano” (MULLER-RIEBAU et al., 1997; KOKKINI et al., 1997); *Satureja hortensis* L.; e *Petroselinum sativum* L. (família Umbelliferae) (REGNAULT-ROGER et al., 1993).

O timol é um monoterpenóide biossintetizado em plantas através de uma rota diferente do ácido mevalônico, ao contrário do que é esperado para a maioria dos monoterpenos derivados de plantas. Estes últimos são formados por condensação do isopentenil pirofosfato (IPP) com o dimetilalilpirofosfato (DMAPP), fornecendo o geranil pirofosfato, que, através da ação de monoterpeno ciclases, forma vários esqueletos tipo-C₁₀ (Gershenzon e Croteau, 1991, citados por EINSENREICH et al., 1997).

EINSENREICH et al. (1997) mostraram, através da incorporação de glicose [1- ¹³C] em plantas jovens de *Thymus vulgaris*, *Pelargonium graveolens* e *Mentha pulegium*, que o timol, o geraniol e a pulegona são biossintetizados através de uma rota alternativa do tipo triose fosfato/piruvato.

A atividade biológica dos óleos essenciais de plantas que contêm timol muitas vezes é atribuída exclusivamente à sua presença ou ao sinergismo com outros constituintes desses óleos.

Os óleos essenciais são metabólitos secundários de plantas, constituídos principalmente de compostos terpenóides (KARPOUHTSIS et al., 1998), com ampla gama de aplicações farmacológicas e industriais. Os óleos essenciais do timo (*Thymus vulgaris* L.) possuem propriedades antioxidantes especificamente ligadas aos metabólitos fenólicos timol e carvacrol (Aeshbach et al., 1994, citados por SHETTY et al., 1996), sendo utilizados como flavorizantes e conservantes em alimentos (FENAROLI, 1975). Esses óleos também mostraram possuir propriedades bactericidas e antifúngicas (Deans et al., 1993, citados por REDDY et al., 1998).

A análise dos óleos essenciais de *T. vulgaris* L. que crescem no norte da Itália apresentou 44 compostos, dentre os quais o timol foi o mais efetivo contra amplo espectro de micróbios (REDDY et al., 1998). KANDIL et al. (1994) mostraram que óleos essenciais do *Thymus capitatus* são efetivos agentes antimicrobianos, podendo ser usados em baixas concentrações com o mínimo de efeitos colaterais, no tratamento de infecções bacterianas nos sistemas respiratório, urinário e gastrointestinal e na pele, além de possuir atividade anticandidíase associada à presença do timol (BENJILALI et al., 1986)

Em estudos prévios, HITOKO et al. (1980) mostraram que o timol inibe o crescimento de *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus flavus*. BUCHANAN e SHEPHERD (1981) constataram que concentrações maiores que 500 µg mL⁻¹ inibem completamente o crescimento de *Aspergillus parasiticus*, que produz aflatoxina, substância extremamente tóxica ao homem.

YEGEN et al. (1992) e MÜLLER-RIEBAU et al. (1997) registraram que os principais constituintes fenólicos (timol e carvacrol) dos óleos essenciais de *Tymbira spicata* e *Satureja thymbira* possuem notável atividade antifúngica na inibição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos de solo *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phytophthora*

capsici. Esses compostos têm grande efeito inibitório em concentração acima de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ sobre todos os fungos examinados em ágar-batata-dextrose.

O efeito do sinergismo entre os componentes do óleo essencial de *Thymus vulgaris* na redução da porcentagem de contaminação em grãos de milho por *Aspergillus flavus* foi mostrado por MONTES-BELMONT e CARVAJAL (1998): em grãos tratados com o óleo essencial, a porcentagem de redução de contaminação foi de 100%, ao passo que em grãos tratados com o timol puro (solução a 2% em hexano) este percentual caiu para 52,3%. Com dosagens maiores, a proteção pode ser melhorada.

A atividade inseticida do timol foi testada por ELLIS e BAXENDALE (1997) em ácaros parasitas *Acarapis woodi* (Rennie), que vivem na traquéia de abelhas *Apis mellifera*, bem como em suas hospedeiras. O estudo mostrou que o timol, quando fumigado sobre ácaros adultos, larvas e seus ovos, controla significativamente a população de adultos (85,4% de mortalidade) e larvas (64,7% de mortalidade), mas também é tóxico para abelhas, sendo necessário controle da temperatura durante a fumigação do composto sobre estas.

KARPOUHTSIS et al. (1998) avaliaram as atividades inseticida e genotóxica do timol e carvacrol em moscas *Drosophila melanogaster* através da exposição de suas larvas a várias quantidades de timol e carvacrol. As larvas expostas estavam em tubos de ensaio contendo meio de cultura levedo-glicose. A porcentagem de moscas que emergia dos tubos após a exposição foi calculada, encontrando-se os valores de dose letal (DL_{50}) iguais a $1,6 \mu\text{L}$ para o carvacrol e $2,6 \mu\text{L}$ para o timol. Este último mostrou ser um potente mutagênico, mas não um indutor recombinagênico.

SOLER et al. (1996) estudaram os efeitos do timol na microflora do solo em condições de casa de vegetação, tratando amostras de 6 kg de solo proveniente de um campo de algodão e contidas em potes com timol em doses de 0, 150 e 250 mg/kg de solo. As amostras foram deixadas 2, 4, 6, 10, 20 e 40 dias após o tratamento. Populações de fungos actinomicetos e nematóides, bem como biomassa total, estimadas a cada tempo de amostragem, foram significativamente

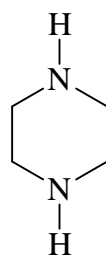
reduzidas. Em amostras deixadas por 20 e 40 dias depois do tratamento, populações de bactérias foram maiores.

Muito pouco é conhecido sobre o metabolismo do timol em animais. Os primeiros estudos foram feitos por WILLIAMS (1959), que notou que ele era excretado na urina de coelhos, cães e do homem sob a forma de conjugados de glucoronídeos e sulfatos e que pequenas quantidades do composto oxidavam, originando o timoquinol. ROBBINS (1934) notificou que cerca de um terço de uma dose de 1 g é excretada sem qualquer alteração na urina de cães, utilizando técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

AUSTGULEN et al. (1987) realizaram estudos do metabolismo em ratos através da análise de amostras de urina em intervalos de 24 horas, propondo a rota metabólica ilustrada na Figura 1.

Pode-se observar que a metabolização do timol no organismo de ratos forneceu diversos produtos de oxidação ocorrida tanto no anel aromático como nos grupamentos alifáticos, havendo monoidroxilações, diidroxilações e formação de derivados monocarboxilados.

1.5. A piperazina



[5]

A piperazina [5], uma etilenoamina que se apresenta sob a forma de sólido branco, higroscópico, com odor cáustico, foi primeiramente utilizada como anti-helmíntico por volta de 1952, ganhando aceitação rápida, sendo comumente utilizada no tratamento de oxiúriase e ascaridíase em humanos e

animais domésticos. Outras aplicações farmacêuticas envolvem o uso de seus derivados, como analgésicos, anti-hipertensivos, sedativos, contra doenças hemorrágicas, antiespasmódicos, anticonvulsivos, anestésicos, antiestamínicos, antimaláricos e, ainda, contra doenças neoplásicas (BHATT et al., 1990).

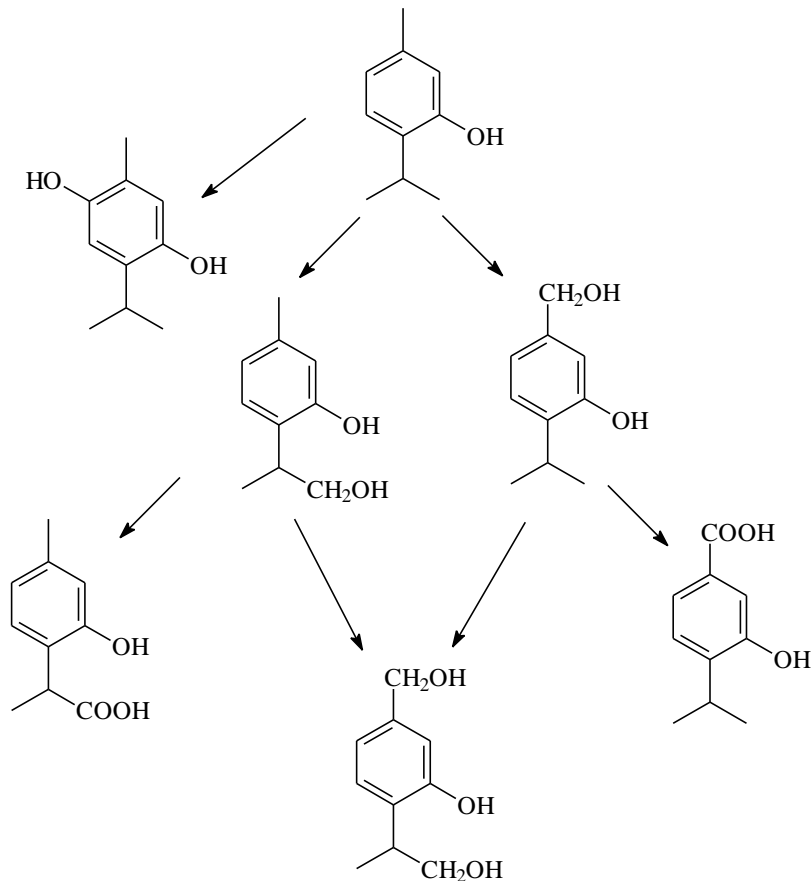
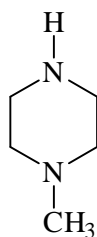


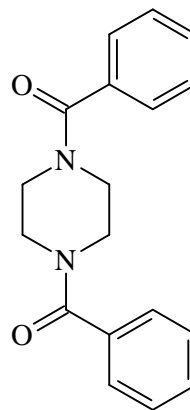
Figura 1 - Rota metabólica do timol no organismo de ratos.

A piperazina é normalmente administrada sob a forma de vários sais, sendo o citrato, fosfato, monoidrocloreto, diidrocloreto e sulfato de piperazina os mais comumente utilizados em diferentes dosagens, devido à quantidade de piperazina presente em cada tipo de sal.

Embora o uso da piperazina e de seus derivados como anti-helmíntico em animais e no homem seja amplamente conhecido, existem poucos estudos sobre a atividade de alguns de seus derivados contra fitonematóides. LONGUE (1998) reportou que a 1-metilpiperazina [6], quando testada *in vitro* sobre o fitonematóide *Meloidogyne incognita*, provocou índice de 73% de mortalidade. A 1,4-dibenzoilpiperazina [7] causou 58% de mortalidade quando testada sobre o fitonematóide *Heterodera glycines*. Ambos os compostos foram testados a uma concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LONGUE, 1998).



[6]



[7]

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Generalidades metodológicas

Todas as reações foram realizadas com reagentes de grau P.A. O éter dietílico e o hexano foram purificados através de destilação. O THF foi seco sob refluxo por adição de sódio metálico, tendo a benzofenona como indicador. Após a secagem, o THF foi destilado e armazenado em frasco âmbar contendo peneira molecular e sob atmosfera inerte.

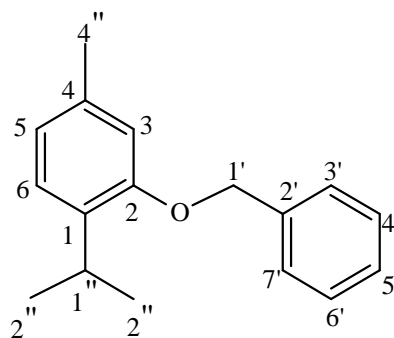
As análises em cromatografia em camada delgada foram realizadas com placas preparadas com sílica-gel Kieselgel 60 F₂₅₄, com indicador de fluorescência. A espessura da camada de sílica nas placas utilizadas foi de 0,25 mm. Todas as placas foram inicialmente visualizadas em luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm), sendo posteriormente reveladas com solução de ácido fosfomolibdico em etanol, preparada de acordo com CASEY et al. (1990).

Os espectros no infravermelho foram obtidos nos espectrômetros MATSON INSTRUMENTS FTIR, no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, e PERKIN ELMER SPECTRUM 1000, no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (200 MHz) e carbono-13 (50 MHz) foram obtidos nos espectrômetros BRUKER DPX 200,

no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os solventes utilizados foram o CDCl_3 e o D_2O , sendo o tetrametilsilano utilizado como padrão de referência ($\delta = 0$).

2.2. Reação de formação do composto 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8]



[8]

A uma solução de timol (600 mg; 4 mmol) em THF (15 mL), sob agitação magnética e em balão bitubulado (50 mL), foi adicionado hidreto de sódio (210 mg; 7 mmol), juntamente com imidazol (19,5 mg; 0,26 mmol). A mistura foi deixada sob refluxo a 70 °C, durante três horas. Após este tempo foi adicionado brometo de benzila (1.368 mg; 8 mmol) dissolvido em THF (10 mL).

A reação foi deixada sob refluxo por mais uma hora e, após este período, o aquecimento foi retirado, deixando-se a reação ocorrer por mais 12 horas. O THF foi então eliminado em evaporador rotatório. Ao concentrado foi adicionada água (30 mL). A mistura foi submetida à extração com éter dietílico (4 x 30 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio, seca com sulfato de magnésio e concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se aproximadamente 1,2 g de material bruto.

O material bruto foi submetido à cromatografia em placas preparativas eluídas com hexano/éter (10:1), obtendo-se 182,6 mg de um óleo que foi caracterizado como o éter [8] (0,76 mmol; 35,8 %).

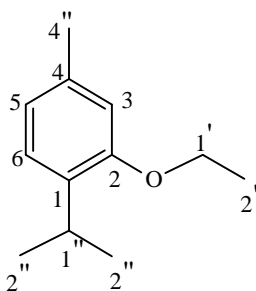
CCD: $R_f = 0,25$ (hexano), UV (+).

IV (filme em placas de NaCl, \bar{n}/cm^{-1}): 3.032, 2.960, 2.924, 2.868, 1.613, 1.597, 1.505, 1.346, 1.288, 945, 842 e 810.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) d: 1,22 (d, 6H, $J_{1'',2''} = 6,9$ Hz, H_2''); 2,31 (s, 3H, CH_3); 3,41 (m, 1H, $J_{1'',2''} = 6,9$ Hz, H_1''); 5,06 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$); 6,77 (d, 2H, $J_{5,6} = 7,6$ Hz, H_5 e H_3); 7,13 (d, 1H, $J_{6,5} = 7,6$ Hz, H_6); 7,23-7,48 (m, 5H, H_3' , H_4' , H_5' , H_6' e H_7').

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) d: 21,3 (CH_3); 22,8($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 26,6 ($\text{CH}(\text{CH}_3)$); 69,9 (C_1'); 112,7 (C_3); 121,5 (C_5); 126,0 (C_6); 127,1 (C_3' e C_7'); 127,7 (C_5'); 128,5 (C_4' e C_6'); 134,4 (C_1); 136,3 (C_5); 137,7 (C_2'); 155,8 (C_2).

2.3. Reação de formação do composto 2-etoxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [9]



[9]

Em um balão de fundo redondo bitubulado (50 mL), conectado a um condensador de refluxo, foram adicionados hidreto de sódio (120 mg; 4 mmol; 80% em óleo mineral) e imidazol (9,8 mg; 0,13 mmol). O sistema foi mantido sob atmosfera de nitrogênio e agitação magnética. Em seguida, por meio de seringa, foi acrescentada uma solução de timol (300 mg; 2 mmol) em THF anidro (10 mL). Houve imediata efervescência da solução, que foi colocada em banho de óleo sob refluxo a 70 °C por 3,5 horas. Após este tempo, o aquecimento foi retirado e a mistura resfriada em banho de gelo até 0 °C. A esta temperatura, através de seringa, adicionou-se brometo de etila (3 mL) diluído em THF (2 mL)

à mistura reacional. A reação foi deixada à temperatura ambiente durante 12 horas. Decorrido esse tempo, a reação foi elaborada, eliminando-se o excesso de THF em evaporador rotatório, seguindo-se a adição lenta de água (20 mL) e extração com éter dietílico (4 x 20 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl, separada com funil de decantação, seca com MgSO₄, filtrada e concentrada em evaporador rotatório.

O material concentrado foi submetido ao fracionamento em coluna de sílica-gel, utilizando-se hexano como eluente, o que resultou na obtenção do éter [9], que é um líquido incolor (36 mg, 0,20 mmol; 18,8%).

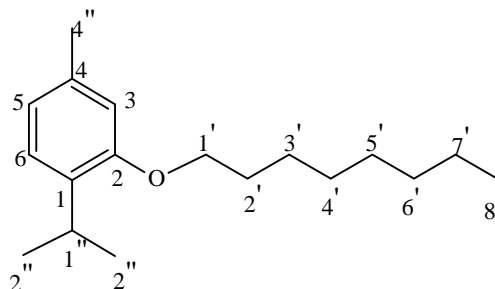
CCD: R_f = 0,6 (hexano/éter dietílico, 300:1), UV (+).

IV (filme em placas de NaCl, \bar{n}/cm^{-1}): 3.030, 2.960, 2.900, 2.860, 1.650, 1.600, 1.555 1.505, 1.325 1.280, 1.090 e 880.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) d: 1,20 (d, 6H, J_{2'', 1''} = 6,9 Hz, H_{2''}); 1,41 (t, 3H, J_{2', 1'} = 7,0 Hz, H_{2'}); 2,31 (s, 3H, H_{4''}); 3,29 (m, 1H, J_{1'', 2''} = 6,9 Hz, H_{1''}); 4,05 (q, 2H, J = 7,0, H_{1'}); 6,65 (s, 1H, H₃); 6,72 (d, 1H, J_{5,6} = 7,8 Hz, H₅); 7,08 (d, 1H, J_{6,5} = 7,8 Hz, H₆).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) d: 15,0 (CH₃CH₂-O-); 21,3 (CH₃-); 22,8 (-CH(CH₃)₂); 26,6 (-CH(CH₃)); 63,5 (CH₃CH₂-); 112,5 (C₃); 121,0 (C₅); 125,9 (C₆); 134,2 (C₁); 136,2 (C₄); 156,1 (C₂).

2.4. Reação de formação do composto 1-isopropil-4-metil-2-octiloxi-benzeno [10]



[10]

A um balão bitubulado (50 mL) conectado a um condensador de refluxo sob atmosfera de nitrogênio e agitação magnética foram adicionados hidreto de sódio (120 mg; 4 mmol; 80% em óleo mineral) e imidazol (9,8 mg; 0,13 mmol). Com auxílio de seringa, foi adicionada a esta mistura uma solução de timol (300 mg; 2 mmol) em THF (10 mL). Observou-se imediata efervescência da mistura reacional, que foi mantida sob refluxo a 70 °C em banho de óleo por 3,5 horas.

Após este tempo foi adicionado 1-bromooctano (482,3 mg; 2,5 mmol) diluído em THF (15 mL). Manteve-se a reação sob refluxo por mais 7,5 horas. A seguir, adicionou-se lentamente água (1 mL) à mistura reacional, tomando-se o cuidado de não provocar projeção da mistura devido à reação violenta entre o excesso de hidreto de sódio e a água. Eliminado o excesso de hidreto, a mistura reacional foi concentrada em evaporador rotatório, para retirada do THF.

Ao material concentrado foram adicionados 20 mL de água, e a fase orgânica foi extraída com éter dietílico (4 x 20 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl, separada com funil de decantação, seca com MgSO₄, filtrada e concentrada em evaporador rotatório.

O material concentrado foi submetido ao fracionamento em coluna de sílica-gel, utilizando-se hexano como eluente, o que resultou na obtenção de 65 mg de um líquido incolor, caracterizado como o éter [10] (0,25 mmol; 23,6%).

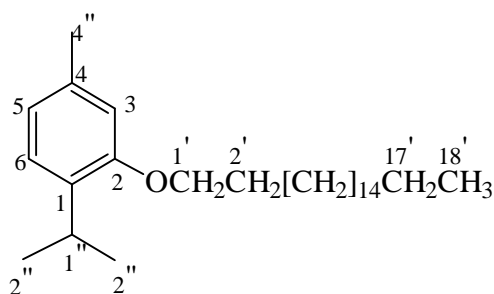
CCD: $R_f = 0,61$ (hexano), UV (+).

IV (filme em placas de NaCl, \bar{n}/cm^{-1}): 3.010, 2.950, 2.890, 1.600, 1.560, 1.500, 1.460, 1.275, 1.250, 1.160 e 825.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) d: 0,89 (t, 3H, $\text{H}_{8'}$); 1,15 (d, 6H, $J_{2'',1''} = 6,9$ Hz, $\text{H}_{2''}$); 1,29 - 1,54 (m, 10H, $\text{H}_{3'}$ a $\text{H}_{7'}$); 1,79 (m, 2H, $J_{2',1'} = 6,6$ Hz, $\text{H}_{2'}$); 2,31 (s, 3H, $\text{H}_{4''}$); 3,19 (m, 1H, $J_{1'',2''} = 6,9$ Hz, $\text{H}_{1''}$); 3,94 (t, 2H, $J_{1',2'} = 6,6$ Hz, $\text{H}_{1'}$) 6,65 (s, 1H, H_3); 6,72 (d, 1H, $J_{5,6} = 7,7$ Hz, H_5); 7,08 (d, 1H, $J_{6,5} = 7,7$ Hz, H_6).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) d: 15,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, $\text{C}_{8'}$); 21,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -); 22,7 ($\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$); 26,2 ($-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$); 26,6($\text{C}_{7'}$, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$); 29,3 - 31,8 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$, $\text{C}_{3'}$, $\text{C}_{4'}$, $\text{C}_{5'}$ e $\text{C}_{6'}$); 67,8 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$, $\text{C}_{1'}$); 112,5 (C_3); 120,8 (C_5); 125,8 (C_6); 134,2 (C_1); 136,2 (C_4); 156,1 (C_2).

2.5. Reação de formação do 1-isopropil-4-metil-2-octadeciloxibenzeno [11]



[11]

A um balão bitubulado (50 mL) conectado a um condensador de refluxo sob atmosfera de nitrogênio e agitação magnética foram adicionados hidreto de sódio (90 mg; 3 mmol) e imidazol (9,8 mg; 0,13 mmol). Com auxílio de seringa, foi adicionada à mistura uma solução de timol (300 mg; 2 mmol) em THF (10 mL). Esta mistura foi mantida sob refluxo a 70 °C em banho de óleo por 3,5 horas. Após este tempo foi adicionado 1-bromooctadecano (833,5 mg; 2,5 mmol) diluído em THF (15 mL). Manteve-se a reação sob refluxo por mais 7,5 horas. A seguir, adicionou-se lentamente água (1 mL) à mistura reacional, para eliminar o excesso de NaH.

A mistura reacional foi concentrada em evaporador rotatório, seguindo-se adição de 20 mL de água. A fase orgânica foi extraída com éter dietílico (4 x 20 mL), lavada com solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄, filtrada e concentrada em evaporador rotatório.

O material concentrado foi submetido ao fracionamento em coluna de sílica-gel, utilizando-se hexano como eluente, resultando na obtenção de 142,6 mg de um óleo incolor, caracterizado como o éter 1-isopropil-4-metil-2-octadeciloxibenzeno [11] (0,36 mmol; 33,0%).

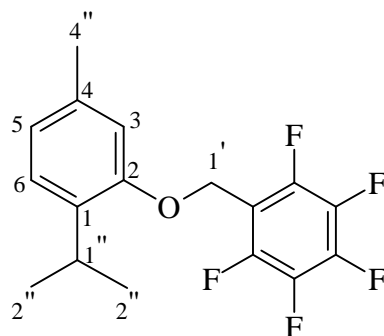
CCD: R_f = 0,56 (hexano), UV (+).

IV (filme em placas de NaCl, \bar{n}/cm^{-1}): 3.030, 2.990, 2.910, 2.875, 1.650, 1.575, 1.530, 1.475, 1.275, 1.200, 875 e 830.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) d: 0,88 (t, 3H, J_{18',17'} = 6,5 Hz, H_{18'}); 1,20 (d, 6H, J_{2'',1''} = 6,9 Hz, H_{2''}); 1,26 - 1,55 (m, 15H, CH₂[CH₂]₁₅CH₂CH₃); 1,79 (m, 2H, J_{17',18'} = 6,5 Hz, H_{17'}); 2,31 (s, 3H, H_{4''}); 3,28 (m, 1H, J_{1'',2''} = 6,9 Hz, H_{1''}); 3,93 (t, 2H, H_{1'}); 6,65 (s, 1H, H₃); 6,71 (d, 1H, J_{5,6} = 7,8 Hz, H₅); 7,08 (d, 1H, J_{6,5} = 7,8 Hz, H₆).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) d: 14,1 (CH₃, C_{18'}); 21,3 (CH₃-); 22,7 (-CH(CH₃)₂); 22,7 - 32,0 (-CH₂[CH₂]₁₆CH₃); 67,8 (-CH₂[CH₂]₁₅CH₂CH₃); 112,2 (C₃); 120,8 (C₅); 125,8 (C₆); 134,1 (C₁); 136,2 (C₄); 156,1 (C₂).

2.6. Reação de formação do 2-(2',3',4',5',6'-pentafluorobenziloxi)-1-isopropil-4-metilbenzeno [12]



[12]

A um balão bitubulado (50 mL) conectado a um condensador de refluxo sob atmosfera de nitrogênio e agitação magnética foram adicionados hidreto de sódio (120 mg; 4 mmol) e imidazol (9,8 mg; 0,13 mmol). Com auxílio de seringa, foi adicionada a esta mistura uma solução de timol (300 mg; 2 mmol) em THF (10 mL). Esta mistura foi mantida sob refluxo a 70 °C em banho de óleo por 3,5 horas. Após este tempo, foi adicionado brometo de 2,3,4,5,6-pentafluorobenzila (521,98 mg; 2 mmol) diluído em THF (15 mL). Manteve-se a reação sob refluxo por mais duas horas. A seguir, adicionou-se lentamente água (1 mL) à mistura reacional, para eliminar o excesso de NaH.

A mistura reacional foi então concentrada em evaporador rotatório, adicionando-se em seguida 20 mL de água e extraíndo-se a fase orgânica com éter dietílico (4 x 20 mL), que foi lavada com solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄, filtrada e concentrada em evaporador rotatório.

O material concentrado foi submetido ao fracionamento em coluna de sílica-gel, utilizando-se hexano como eluente, o que resultou na obtenção de 113,6 mg de um óleo incolor, caracterizado como o éter 2-(2',3',4',5',6'-pentafluorobenziloxi)-1-isopropil-4-metilbenzeno [12] (0,34 mmol; 32,0%).

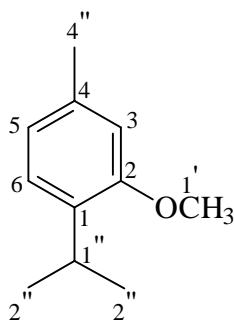
CCD: R_f = 0,62 (hexano), UV (+).

IV (filme em placas de NaCl, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3.050, 2.990, 2.950, 2.890, 2.100-1.850, 1.660, 1.630, 1.580, 1.540, 1.530, 1.420, 1.380, 1.250, 1.175, 1.140, 1.060, 1.040, 990, 950, 825 e 800.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) d: 1,14 (d, 6H, $J_{2'',1''} = 6,9$ Hz, $\text{H}_{2''}$); 2,39 (s, 3H, $\text{H}_{4'}$); 3,19 (m, 1H, $J_{1'',2''} = 6,9$ Hz, $\text{H}_{1''}$); 5,10 (s, $\text{H}_{1'}$); 6,80 (s, 1H, H_3); 6,83 (d, 1H, $J_{5,6} = 7,7$ Hz, H_5); 7,12 (d, 1H, $J_{6,5} = 7,7$ Hz, H_6).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) d: 21,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -); 22,8 ($-\underline{\text{C}}\text{H}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$ -); 26,6 ($-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)$); 56,7 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -); 112,9 (C_3); 122,5 (C_5); 126,3 (C_6); 134,8 (C_1); 136,5 (C_4); 156,1 (C_2).

2.7. Reação de formação do 1-isopropil-4-metil-2-metoxibenzeno [13]



[13]

Em um balão de fundo redondo bitubulado (100 mL), conectado a um condensador de refluxo, foram adicionados hidreto de sódio (1,2 mg; 40 mmol) e imidazol (97,5 mg; 1,3 mmol). O sistema foi mantido sob atmosfera de nitrogênio e agitação magnética. Em seguida, por meio de seringa, foi acrescentada uma solução de timol (3,0 g; 20 mmol) em THF anidro (30 mL). Houve imediata efervescência da solução, que foi colocada em banho de óleo sob refluxo a 70 °C por 3,5 horas.

A seguir, o aquecimento foi retirado e a mistura resfriada em banho de gelo até 0 °C. A esta temperatura, através de seringa, adicionou-se iodeto de metila (2,5 mL; 40 mmol) diluído em THF (2 mL) à mistura reacional. A reação

foi deixada à temperatura ambiente durante 12 horas. Após este tempo, a reação foi elaborada, eliminando-se o excesso de THF em evaporador rotatório, seguindo-se da adição lenta de água (20 mL) e extração com éter dietílico (4 x 30 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl, separada com funil de decantação, seca com MgSO₄, filtrada e concentrada em evaporador rotatório.

O material concentrado foi submetido ao fracionamento em coluna de sílica-gel, utilizando-se hexano como eluente, o que resultou na obtenção de 2,4883 g de um líquido incolor, caracterizado como o éter 1-isopropil-4-metil-2-metoxibenzeno [13] (15,15 mmol; 75,8%).

CCD: R_f = 0,49 (hexano), UV (+).

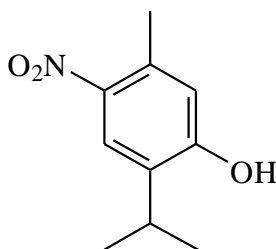
IV (filme em placas de NaCl, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 2.970, 2.950, 2.910, 1.640, 1.605, 1.500, 1.460, 1.400, 1.300, 1.260, 1.150, 1.050, 950, 850 e 810.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) d: 1,19 (d, 6H, J_{2'',1''} = 6,8 Hz, H_{2''}); 2,32 (s, 3H, H_{4''}); 3,27 (m, 1H, J_{1'',2''} = 6,8 Hz, H_{1''}); 3,81 (s, 3H, CH₃-); 6,67 (s, 1H, H₃); 6,74 (d, 1H, J_{5,6} = 7,8 Hz, H₅); 7,09 (d, 1H, J_{6,5} = 7,8 Hz, H₆).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) d: 21,3 (CH₃); 22,8(-CH(CH₃)₂); 26,4 (-CH(CH₃)₂); 55,3 (CH₃-); 111,4 (C₃); 121,1 (C₅); 125,8 (C₆); 134,0 (C₁); 136,3 (C₄); 156,7 (C₂).

2.8. Tentativas de formação do composto 2-isopropil-5-metil-4-nitrofenol [14]

a) Primeira tentativa



[14]

Em um balão de fundo redondo (25 mL) foi diluído cuidadosamente, sob agitação, H₂SO₄ concentrado (500 mg; 5,1 mmol) em água (1 mL). Adicionou-se a esta solução NaNO₃ (301 mg; 3,54 mmol), resfriando-a até 0 °C em banho de gelo e água. O timol sólido (300 mg; 2 mmol) foi então adicionado à mistura sob agitação e a reação foi mantida a 0 °C por duas horas.

A reação foi acompanhada por CCD, não sendo verificada a formação de produto no intervalo de tempo duas horas. O banho de gelo foi retirado e a reação deixada à temperatura ambiente por 12 horas. Após este tempo, o meio reacional assumiu coloração avermelhada. A mistura foi submetida à extração com éter dietílico (3 x 30 mL). A fase orgânica foi neutralizada com solução saturada de bicarbonato de sódio, separada com funil de decantação, seca com MgSO₄ e concentrada em evaporador rotatório.

O material obtido foi fracionado em coluna de sílica-gel, utilizando-se mistura de hexano/éter dietílico (20:1) como eluente. As frações obtidas não apresentaram quantidade significativa de material puro.

b) Segunda tentativa de formação do 2-isopropil-5-metil-4-nitrofenol [14]

O timol (3 g; 20 mmol), dissolvido em quantidade de THF mínima possível (1 mL), foi adicionado a uma solução contendo H₂SO₄ (5 g) e NaNO₃ diluídos em água (10 mL), sob constante agitação e em banho de gelo. A reação foi mantida a 0 °C durante duas horas; após este tempo, o banho de gelo foi retirado e a reação deixada sob agitação magnética por mais 12 horas à temperatura ambiente.

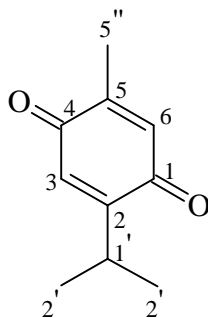
A reação foi então elaborada e extraída com éter dietílico (4 x 30 mL). À fase orgânica foi adicionada lentamente solução saturada de NaHCO₃, separada da fase aquosa por meio de funil de decantação, seca com MgSO₄, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. O material concentrado foi fracionado em coluna de sílica-gel, utilizando-se uma mistura de hexano/éter (20:1) como eluente.

Foram obtidas 74 frações de aproximadamente 9 mL cada, que foram reunidas de acordo com a análise cromatográfica (CCD) e agrupadas na ordem: 1 a 9, 10 a 25, 30 a 66, 67 a 73 e restante da coluna. As frações de 30 a 66, que se apresentaram como um único ponto na placa cromatográfica, foram concentradas, pesadas (1,2 g) e novamente fracionadas em coluna, utilizando-se mistura de hexano/éter dietílico (60:1) como eluente.

Obtiveram-se 148 frações de aproximadamente 3 mL cada, e novamente não se conseguiu obter o produto puro em nenhuma das frações. As frações foram então agrupadas de 1 a 15, 16 a 80, 81 a 90 e de 95 a 148. As frações de 95 a 148 foram reunidas, e o material obtido foi concentrado em evaporador rotatório, pesado (aproximadamente 900 mg) e fracionado em placas preparativas (quatro placas de 20 x 20 cm, sílica-gel com indicador de fluorescência, 0,8 mm de espessura cada). As placas foram eluídas utilizando-se mistura de hexano/éter dietílico (5:1) como eluente.

As frações da placa de R_f igual a 0,43 foram separadas e o composto puro extraído com diclorometano. Após concentração em evaporador rotatório, o

material apresentou coloração avermelhada. A análise dos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C revelou que o composto obtido era a timoquinona [15] (90 mg; 2,7%).



[15]

CCD: $R_f = 0,43$ (hexano/éter-etílico, 5:1).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) d: 1,123 (d, 6H, $J_{2'',1''} = 6,9$ Hz, $\text{H}_{2''}$); 2,04 (s, 3H, $\text{H}_{5''}$); 3,02 (m, 1H, $J_{1'',2''} = 6,8$ Hz, $\text{H}_{1''}$); 6,51 (s, 1H, H_3); 6,55 (s, 1H, H_6).

RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) d: 15,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -); 21,4(- $\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$); 26,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$); 130,4 (C_2); 133,4 (C_5); 145,2 (C_3); 155,0 (C_6); 187,5 ($\text{C}=\text{O}$); 188,7 ($\text{C}=\text{O}$).

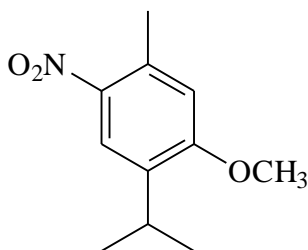
c) Terceira tentativa de formação do 2-isopropil-5-metil-4-nitrofenol [14]

Em um balão de fundo redondo (50 mL) imerso em banho de gelo foi adicionada uma solução de timol (300 mg; 2 mmol) em THF (10 mL). A esta solução adicionou-se lentamente, e sob agitação, uma mistura dos ácidos acético e nítrico (4:1 v/v; 2 mL de AcOH; 0,5 mL de HNO_3). O banho de gelo foi retirado e o sistema foi mantido a 50 °C durante quatro horas. A reação foi acompanhada por CCD, até se constatar o desaparecimento do timol. Decorridas quatro horas, o excesso de THF foi eliminado em evaporador rotatório, sendo a mistura neutralizada com solução saturada de NaHCO_3 . A mistura resultante foi extraída com éter dietílico (4 x 20 mL), seca com MgSO_4 e concentrada. Obteve-

se um óleo avermelhado que, ao ser submetido a CCD, revelou tratar-se do mesmo composto obtido na tentativa anterior de nitração do timol.

2.9.. Tentativas de formação do 2-isopropil-5-metil-1-metoxi-4-nitrobenzeno [16]

a) Primeira tentativa



[16]

Em um balão de fundo redondo (25 mL) foi diluído cuidadosamente, sob agitação, H₂SO₄ concentrado (0,5 mL) em água (1 mL). Adicionou-se a esta solução NaNO₃ (301 mg; 3,54 mmol), resfriando-a até 0 °C em banho de gelo. O 1-isopropil-4-metil-2-metoxibenzeno [13] (200 mg; 1,22 mmol) diluído em THF (1 mL) foi então adicionado a esta mistura sob agitação e a reação mantida a 0 °C por duas horas. A reação foi acompanhada por CCD, não sendo observada a formação de produto nesse intervalo de tempo. O aquecimento foi então retirado e a reação deixada por mais 72 horas à temperatura ambiente. O monitoramento da reação através de CCD mostrou que ainda havia o ponto correspondente ao material de partida, não havendo formação de produto.

b) Segunda tentativa de formação do 2-isopropil-5-metil-1-metoxi-4-nitrobenzeno [16]

Uma nova tentativa de nitração do composto [13] foi realizada nas mesmas condições anteriores, porém, após a adição de todos os reagentes, deixou-se a reação ocorrer à temperatura ambiente por duas horas; após este tempo, a reação foi resfriada a 0 °C, sendo adicionadas, com auxílio de pipeta de

Pasteur, gotas de H_2SO_4 concentrado. Observou-se reação violenta, com liberação de vapores de cor marrom (NO_2), e a mistura reacional assumiu imediatamente coloração verde-esmeralda, que foi evoluindo para vermelho intenso após 24 horas. A reação foi então elaborada e extraída com éter dietílico (4 x 30 mL). À fase orgânica foi adicionada lentamente solução saturada de bicarbonato de sódio, que foi separada da fase aquosa por meio de funil de decantação, seca com MgSO_4 , filtrada e concentrada em evaporador rotatório. O material concentrado foi fracionado em coluna de sílica-gel, utilizando-se uma mistura de hexano/éter (20:1) como eluente. Foram obtidas 200 frações de aproximadamente 3 mL cada, porém nenhuma delas forneceu quantidade significativa de produto puro para análises espectroscópicas.

c) Terceira tentativa de formação do 2-isopropil-5-metil-1-metoxi-4-nitrobenzeno [16]

A um balão de fundo redondo (50 mL) contendo o composto 1-isopropil-4-metil-2-metoxibenzeno [13] (400 mg, 2,44 mmol) diluído em THF (10 mL) foi adicionada, sob agitação a 0°C , uma mistura de (2:1v/v; 1 mL de HNO_3 conc.; 0,5 mL de CH_3COOH glacial). O banho de gelo foi retirado, sendo adaptado um condensador de refluxo ao balão, para evitar possíveis projeções de material. A reação foi então deixada à temperatura ambiente por uma hora. Decorrido este tempo, com auxílio de pipeta de Pasteur, foram adicionadas, de maneira lenta e cuidadosa, gotas da mistura $\text{HNO}_3/\text{CH}_3\text{COOH}$, até que se observasse a mudança de coloração da reação de incolor para verde-esmeralda. Ao se observar a liberação de vapores marrons, adicionaram-se gotas de solução saturada de NaHCO_3 para neutralizar os ácidos presentes. A reação foi elaborada e extraída com éter dietílico (4 x 30 mL). À fase orgânica foi adicionada solução saturada de NaCl , seguida de separação em funil de decantação, secagem com MgSO_4 , filtração e concentração. O material concentrado foi fracionado em coluna de sílica-gel, utilizando-se mistura de hexano/éter dietílico (20:1) como eluente, porém não se conseguiu isolar o composto desejado por fracionamento em coluna.

2.10. Reação de formação dos sais de piperazina: cloreto [17], citrato [18], fosfato [19], oxalato [20] e sulfato [21]

Todos os sais derivados da piperazina foram obtidos por meio de reação desta com um ácido contendo o ânion de interesse.

Os sais de piperazina contendo os ânions cloreto, sulfato e fosfato foram sintetizados por adição de solução 1:1 dos ácidos clorídrico, sulfúrico e fosfórico, respectivamente, a um béquer contendo piperazina (430 mg; 5 mmol) dissolvida em THF (10 mL), até que a formação de precipitado terminasse. A mistura foi então filtrada, e o precipitado obtido lavado com etanol, para eliminar o excesso de ácido. O cloreto, sulfato e fosfato de piperazina obtidos foram então recristalizados em etanol e colocados em dessecador.

O citrato e o oxalato de piperazina foram obtidos por meio de adição de solução saturada dos ácidos cítrico e oxálico a um béquer contendo piperazina (430 mg; 5 mmol) dissolvida em água destilada (10 mL), até que a formação de precipitado terminasse. A mistura foi filtrada e o precipitado obtido lavado com etanol. Os sais citrato e oxalato de piperazina obtidos foram então recristalizados em etanol e transferidos para dessecador.

Após serem mantidos 24 horas no dessecador os sais foram pesados, obtendo-se em todos os casos rendimentos de 100% (rendimentos quantitativos).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sínteses desenvolvidas neste trabalho buscavam a produção de éteres derivados do timol contendo cadeias alquílicas e aromáticas, com o objetivo de avaliar a influência da extensão e do tipo de grupo inserido, obtendo-se, assim, parâmetros de comparação para a avaliação da influência do grupo hidroxila no timol.

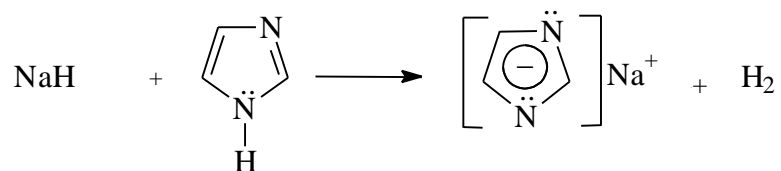
No caso dos sais de piperazina, as sínteses realizadas buscavam a obtenção de dados sobre a influência do ânion ligado à piperazina sobre sua atividade contra os fitonematóides submetidos aos ensaios biológicos.

3.1. Síntese de compostos derivados do timol

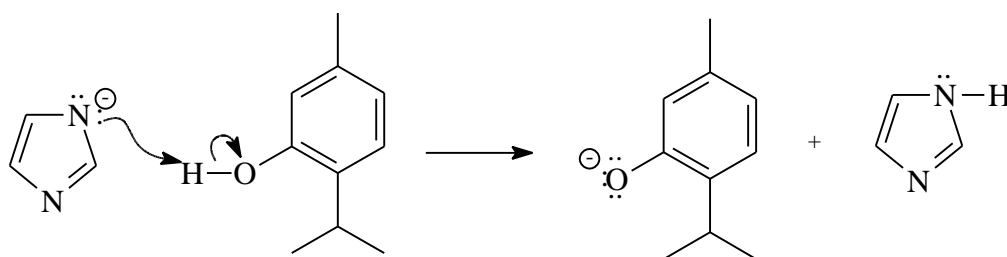
Os fenóis podem ser convertidos em éteres através da síntese de Williamson (SOLOMONS, 1996), que consiste em uma reação de substituição nucleofílica do tipo A_ND_N entre um fenóxido de sódio (nucleófilo) e um haleto de alquila ou benzila (nucleófilo: X^-).

As reações de formação dos éteres derivados do timol podem ser divididas em três etapas, apresentadas na Figura 2.

1ª etapa: formação do ânion imidazol



2ª etapa: desprotonação da hidroxila do timol pelo ânion imidazol



3ª etapa: formação do éter por substituição nucleofílica

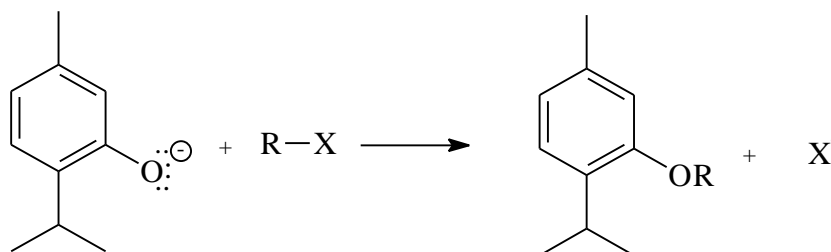


Figura 2 - Etapas para a formação dos éteres derivados do timol.

Observa-se que na 2^a etapa o imidazol é novamente formado, podendo ser utilizado para formação do ânion imidazol.

Foram feitas também diversas tentativas de nitração do timol, objetivando a redução do grupo nitro para grupo amino e posterior formação de aminas substituídas. As tentativas de nitração, no entanto, não levaram à produção dos derivados nitrados do timol.

Neste trabalho, foram produzidos seis éteres derivados do timol, além da timoquinona, obtida como produto das tentativas de nitração do timol.

3.2. Síntese de sais derivados da piperazina

Foram produzidos cinco sais derivados da piperazina, por meio de uma simples reação do tipo ácido-base entre o ácido que continha o ânion de interesse e a piperazina.

A reação de formação dos sais de piperazina foi praticamente instantânea, com formação imediata de precipitado. Todos os sais sintetizados apresentaram cor branca, e o rendimento das reações foi quantitativo.

3.3. Preparo do 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8]

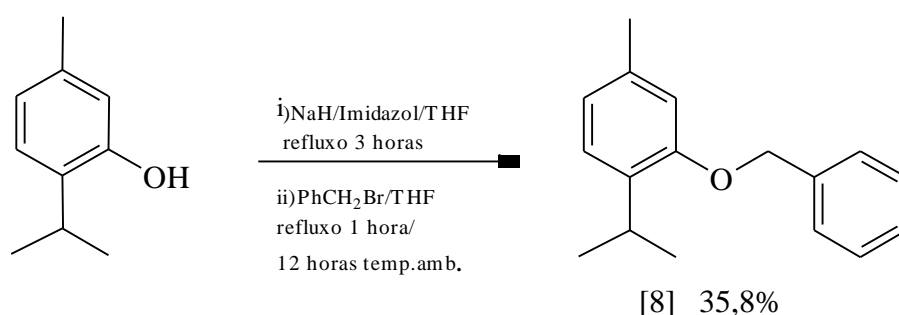


Figura 3 - Síntese do 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8] a partir do timol.

O composto 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8] foi sintetizado, reagindo-se o timol com hidreto de sódio para retirada do hidrogênio do grupo hidroxila catalisada por imidazol, formando o ânion 2-isopropil-5-metilfenóxido, que posteriormente reagiu com o brometo de benzila, através de substituição nucleofílica do ânion brometo por este.

Após a mistura do timol com o hidreto de sódio/imidazol, observou-se pronta efervescência da mistura, decorrente da liberação de hidrogênio gasoso, formado quando da reação entre o ânion hidreto com próton H^+ do imidazol e o do grupo hidroxila do timol, conforme descrito anteriormente.

Não se obteve êxito na recuperação do timol que não reagiu, talvez em virtude de reações colaterais deste, provocadas pelas condições de reação, e este fato contribuiu para a redução do rendimento da reação.

O espectro no infravermelho do composto obtido (Figura 4) mostra que as bandas de absorção na região de $3.650-3.584\text{ cm}^{-1}$, características da deformação axial do grupo hidroxila de fenóis (SILVERSTEIN et al., 1996), estão ausentes. Observa-se também uma intensa banda em 1.289 cm^{-1} , relativa à deformação axial assimétrica C-O-C, com a deformação simétrica em $1.115-1.094\text{ cm}^{-1}$, característica de éteres. A presença de anel aromático é evidenciada pela presença de bandas na região próxima a 3.032 cm^{-1} de deformação axial de C-H em aromáticos, e as harmônicas, na região de $2.000-1.660\text{ cm}^{-1}$.

Quando comparado ao espectro de RMN de 1H do timol, o espectro do composto [8] (Figura 5) mostra a ausência do sinal do hidrogênio hidroxílico do timol, que aparece em δ 4,7. Observaram-se um duplete integrado para 6H em δ 1,22 ($(\underline{CH}_3)_2CH-$), um simpleto integrado para três hidrogênios em δ 2,31 (\underline{CH}_3-) e um hepteto em δ 3,41 ($(CH_3)_2\underline{CH}-$). Estes dados são coerentes com os deslocamentos químicos para seus hidrogênios (PREETSCH et al., 1996).

A presença do grupo OCH_2 entre os anéis aromáticos é evidenciada pelo simpleto integrado para dois hidrogênios em δ 5,06, dado coerente com o deslocamento químico calculado (δ 5,31). Os três hidrogênios aromáticos do anel são evidenciados pelos sinais em δ 6,77 e 7,12, integrados para dois e um

hidrogênios, respectivamente. Os hidrogênios aromáticos do grupo benzila aparecem como um multiplete integrado para cinco hidrogênios em δ 7,23-7,48.

A confirmação da presença do grupo metileno é dada pela presença do sinal em δ 69,96 no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6), confirmada pelo sinal em δ correspondente no espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (Figura 7).

Encontram-se também um sinal em δ 21,00, correspondente ao grupo metila; dois sinais em δ 22,82 e 26,60, correspondentes ao grupo isopropila; e 11 sinais correspondentes aos carbonos dos anéis aromáticos.

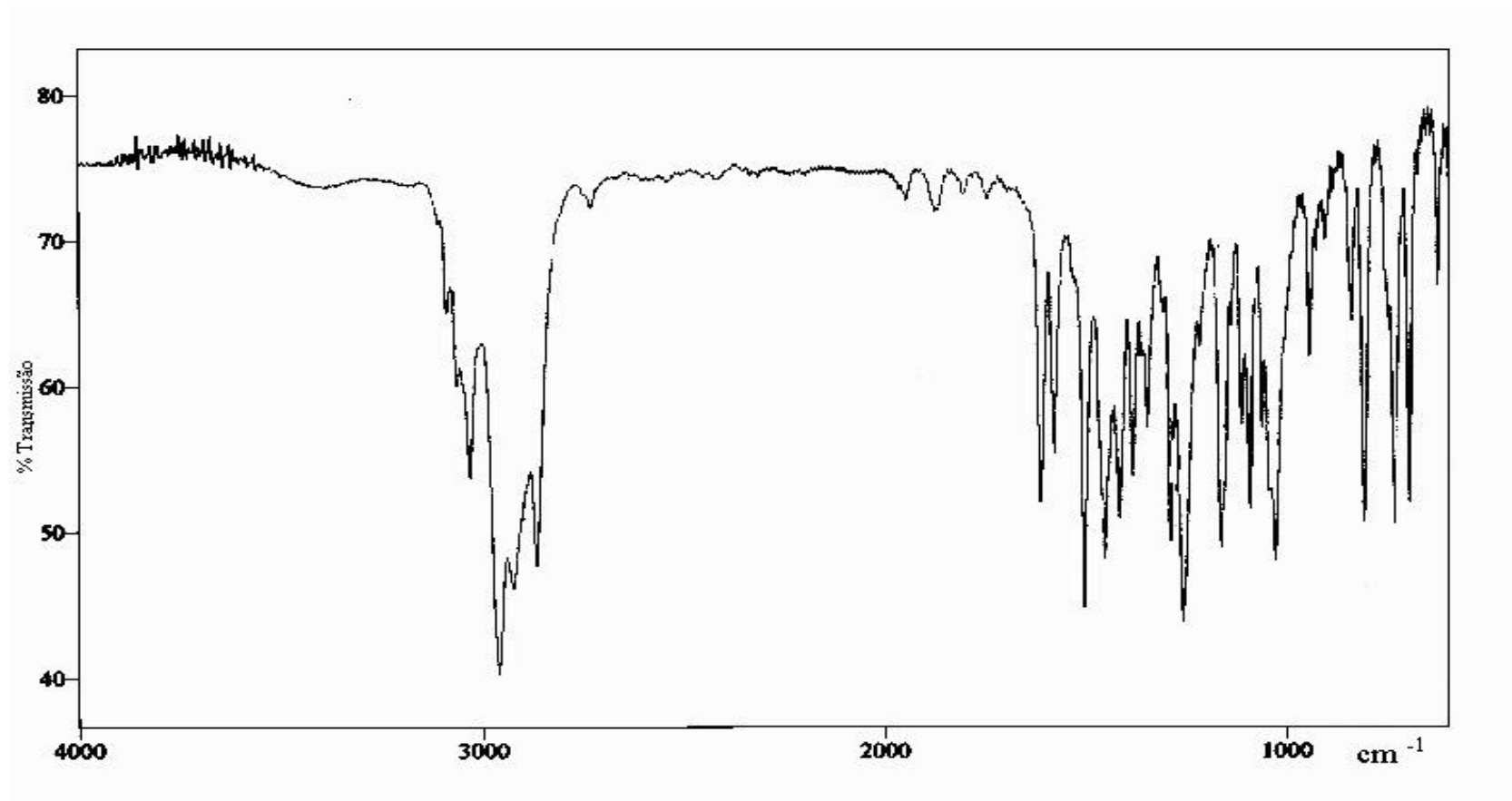


Figura 4 - Espectro no IV (NaCl) do composto 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8].

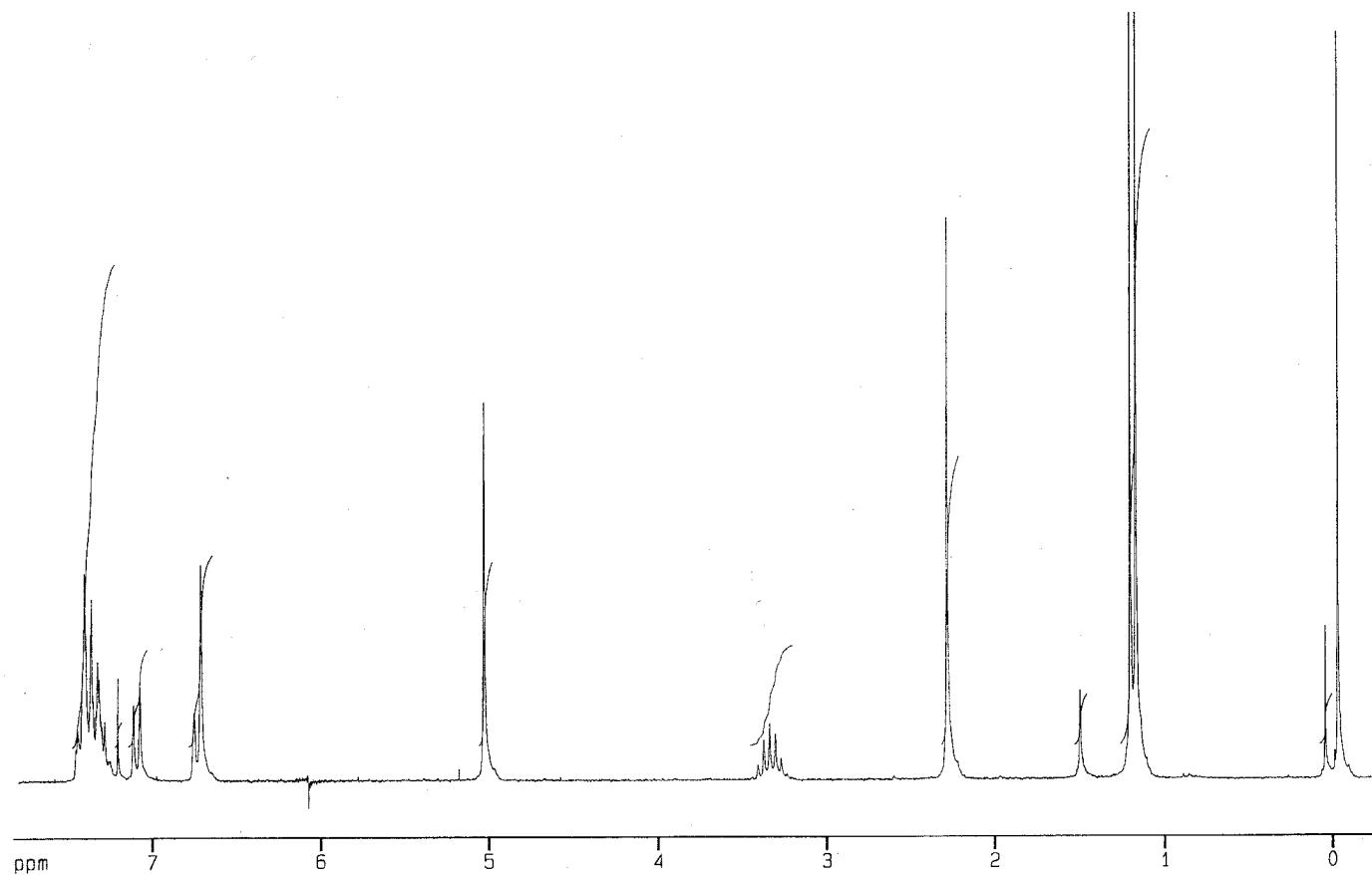


Figura 5 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8].

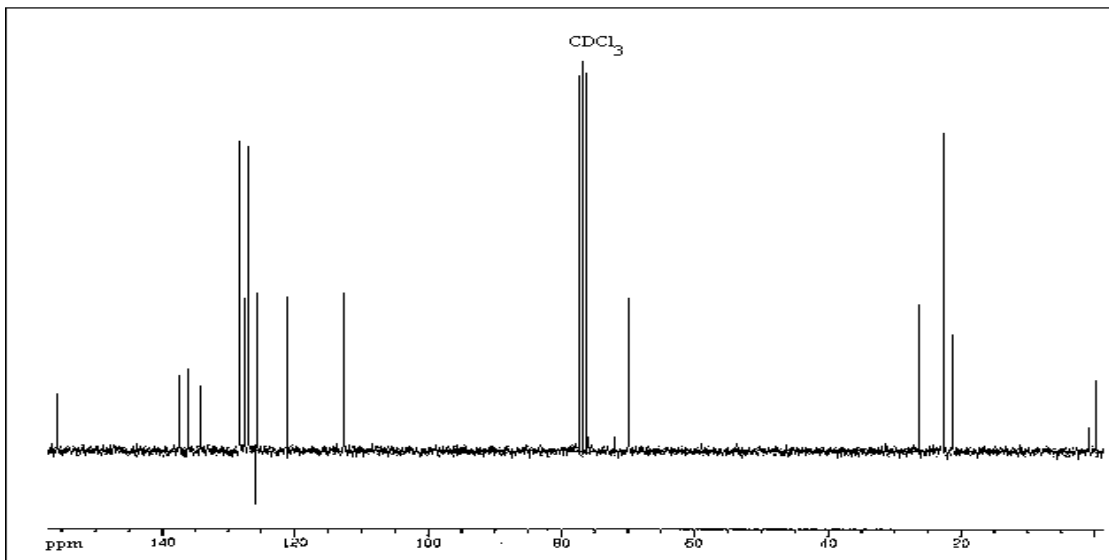


Figura 6 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 2-benziloxi 1-isopropil-4-metilbenzeno [8].

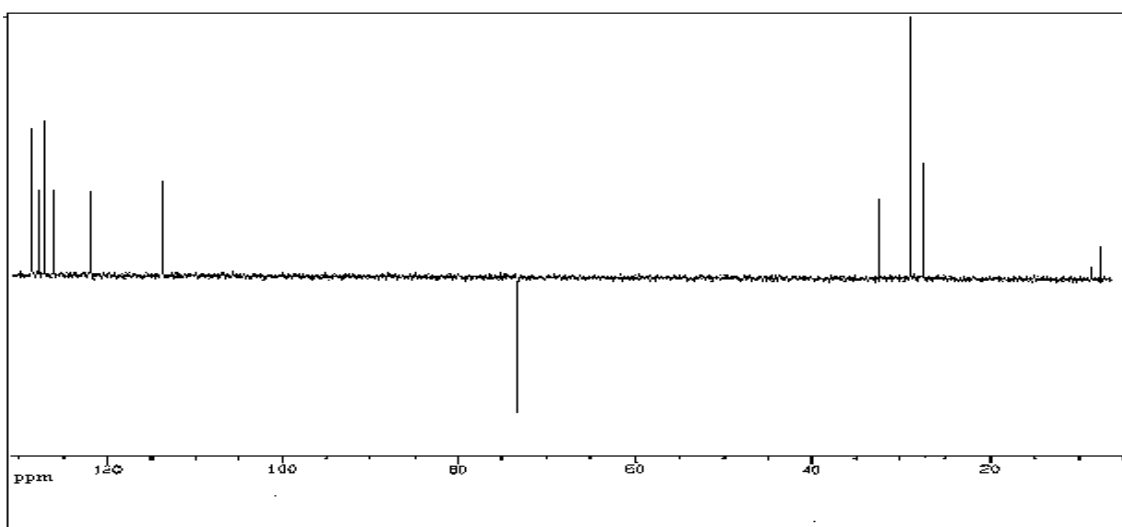


Figura 7 - Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135, 50 MHz, CDCl_3) do composto 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8].

3.4. Preparo do 1-isopropil-2-etoxi-4-metilbenzeno [9]

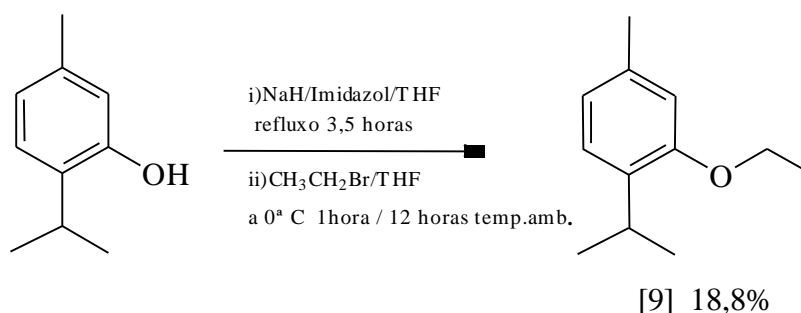


Figura 8 - Síntese do 1-isopropil-2-etoxi-4-metilbenzeno [9] a partir do timol.

Inicialmente procedeu-se à reação de formação do ânion 2-isopropil-5-metilfenóxido, por reação do timol com o NaH, catalisada por imidazol. A seguir, o brometo de etila foi adicionado, ocorrendo então a substituição nucleofílica do hidrogênio hidroxílico pelo grupo etila do brometo de etila. Obteve-se um líquido transparente, prontamente solúvel em CH₂Cl₂ e hexano.

O espectro no IV do composto [9] (Figura 9) apresentou uma banda intensa em 1.280 cm⁻¹ de deformação axial assimétrica de C-O-C e outra de deformação axial simétrica em 1.030 cm⁻¹, de intensidade bastante apreciável, característica de alquil-aril-éteres, além das bandas características de compostos aromáticos.

O espectro de RMN de ¹H (Figura 10) apresentou, além dos sinais característicos dos grupos metila (δ 2,31) e isopropila (δ 1,20 e 3,27), um tripleto integrado para três hidrogênios em δ 1,41 (CH₃CH₂-O) e um quarteto integrado para dois hidrogênios em δ 4,05 (CH₃CH₂-O). Observa-se ainda o acoplamento *spin-spin* entre dois hidrogênios *orto* do anel aromático (Figura 11), evidenciado pela presença de dois dupletos em δ 6,72 e 7,08 ($J_{5,6} = J_{6,5} = 7,8$ Hz) e um simpleto em δ 6,65 referente ao hidrogênio não-acoplado do anel aromático (H₃).

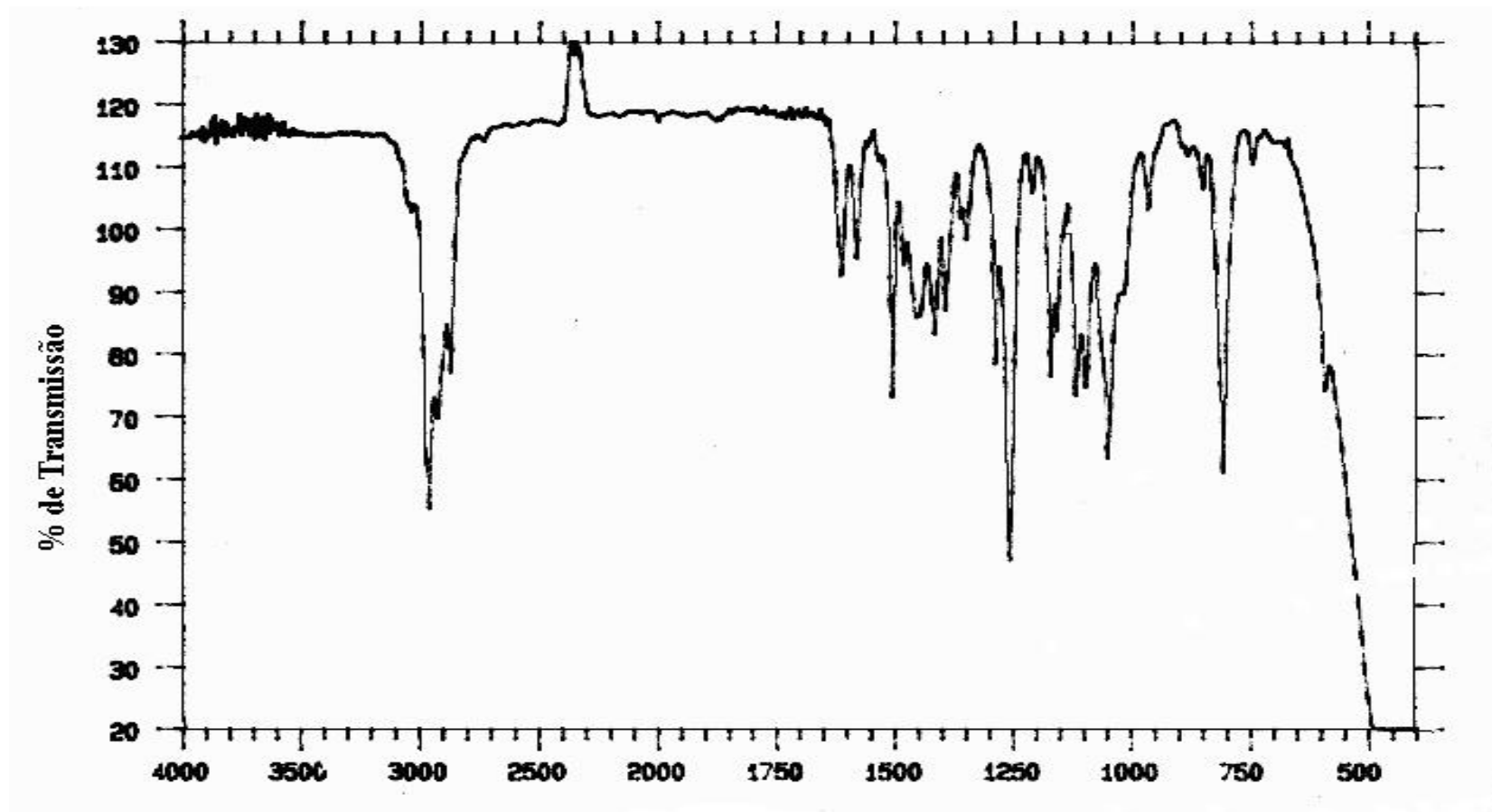


Figura 9 - Espectro no IV (NaCl) do composto 1-isopropil-2-etoxi-4-metilbenzeno[9].

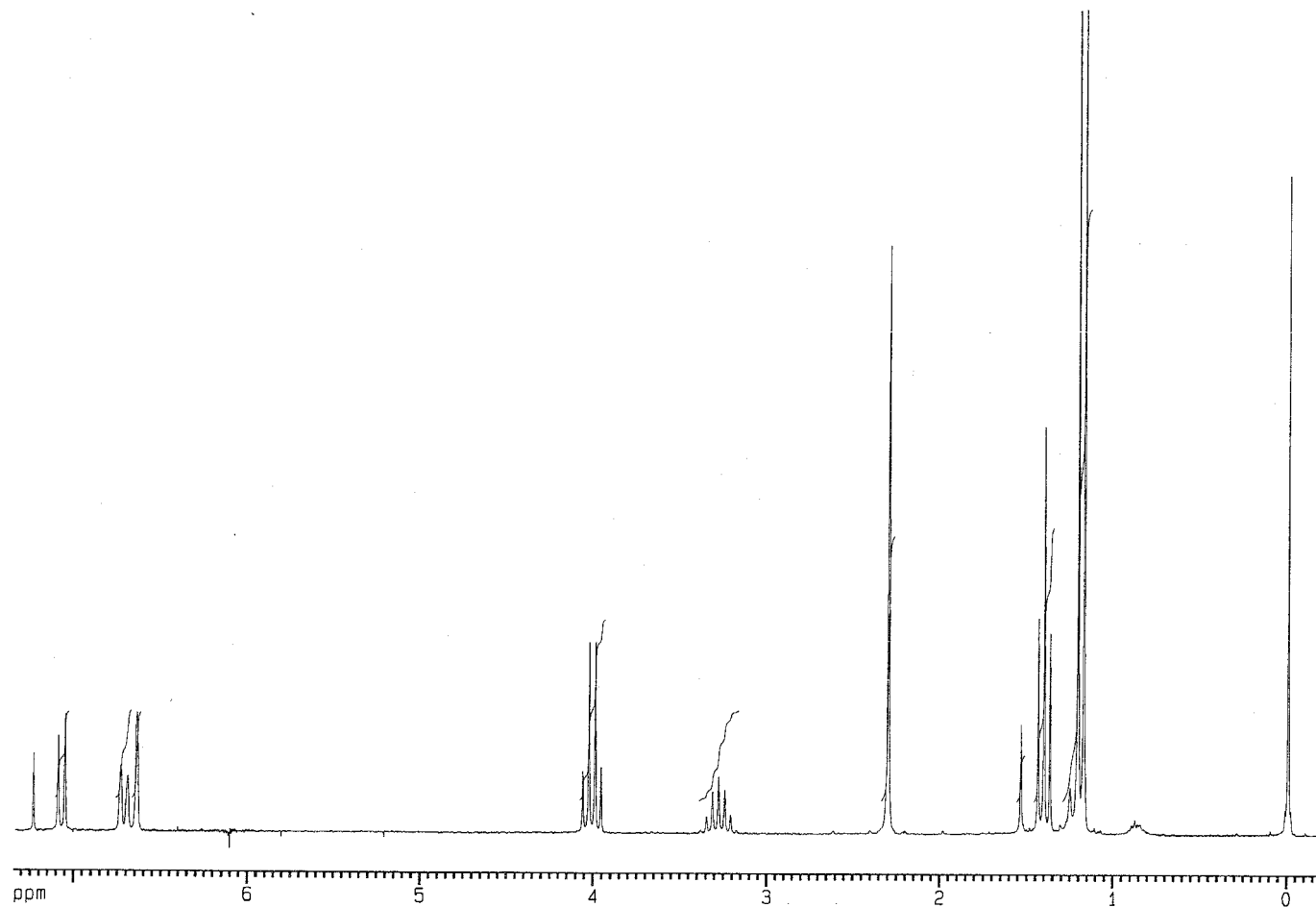


Figura 10 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do 1-isopropil-2-etoxi-4-metilbenzeno [9].

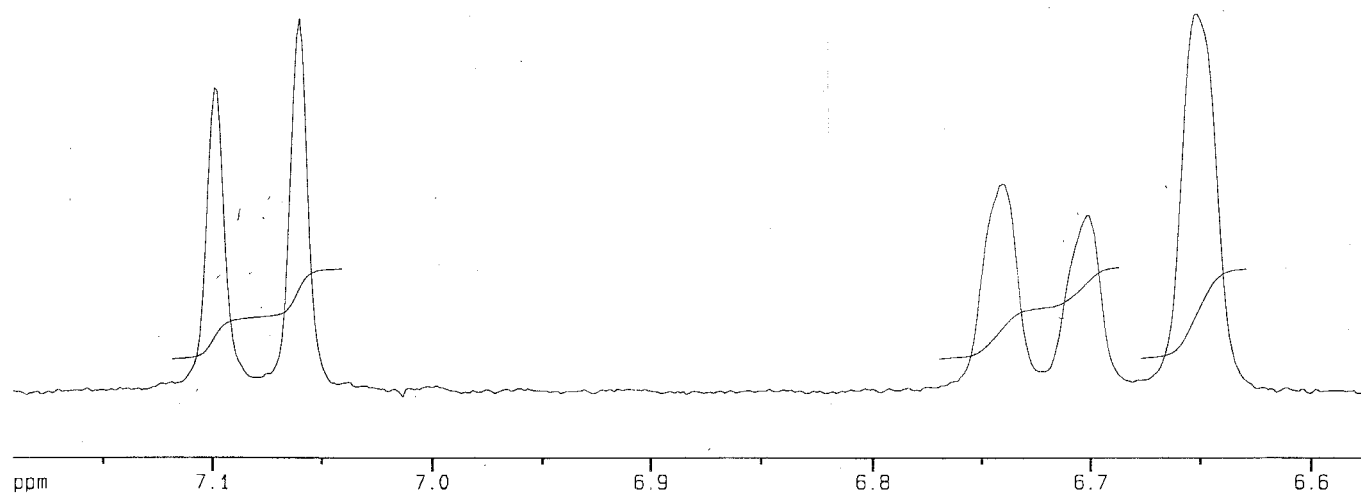


Figura 11 - Parte do espectro de RMN de ¹H (δ de 6,6 a 7,2; 200 MHz, CDCl₃) do composto 1-isopropil-2-etoxi-4-metilbenzeno [9].

3.5. Preparo do 1-isopropil-4-metil-2-octiloxibenzeno [10]

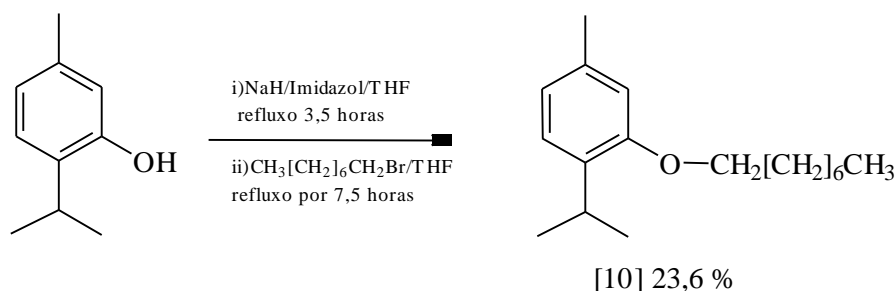


Figura 12 - Síntese do 1-isopropil-4-metil-2-octiloxibenzeno [10] a partir do timol.

A primeira etapa desta reação, a produção do ânion 2-isopropil-5-metilfenóxido, foi realizada conforme descrito para reações anteriores. A única alteração ocorrida foi durante a substituição nucleofílica do haleto, na qual o tempo de refluxo necessário para que a reação ocorresse foi maior (7,5 horas), evidenciando a necessidade de maior tempo de reação para haletos lineares de maior cadeia.

O espectro no IV do composto [10] apresentou as bandas características de alquil-aril-éteres, sendo as principais em 3.100 cm⁻¹ (deformação axial de CH aromático), 2.970 e 2.880 cm⁻¹ (deformação axial de CH alifático) e em 1.250 cm⁻¹ (deformação axial assimétrica de C-O-C).

O espectro de RMN de ¹H apresentou, além dos sinais correspondentes ao grupo aromático e seus substituintes isopropila e metila, um tripleto integrado para três hidrogênios em δ 0,89 (CH₃[CH₂]₆CH₂-O-), um multipletto integrado para 10 hidrogênios em δ 1,29-1,54 (CH₃[CH₂]₅CH₂CH₂-O-), um quinteto integrado para dois hidrogênios em δ 1,79 (CH₃[CH₂]₅CH₂CH₂-O-) e um tripleto integrado para dois hidrogênios em δ 3,94 (CH₃[CH₂]₅CH₂CH₂-O-).

O espectro de RMN de ¹³C do composto [10] mostrou os sinais referentes aos carbonos aromáticos e aos substituintes metil e isopropil, além dos sinais correspondentes ao substituinte octil, em δ 14,09 (CH₃[CH₂]₇O), e em δ

22,65; 26,20; 29,25; 29,31; 29,44; 31,82, correspondentes aos grupos metileno ($\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$) mais bem visualizados na região expandida de δ 14,00 a 32,00 do espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135) (Figura 13), confirmando a presença do grupo substituinte. O espectro apresenta ainda um sinal em δ 67,82, correspondente a um grupo metileno ligado ao átomo de oxigênio ($\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-O-}$).

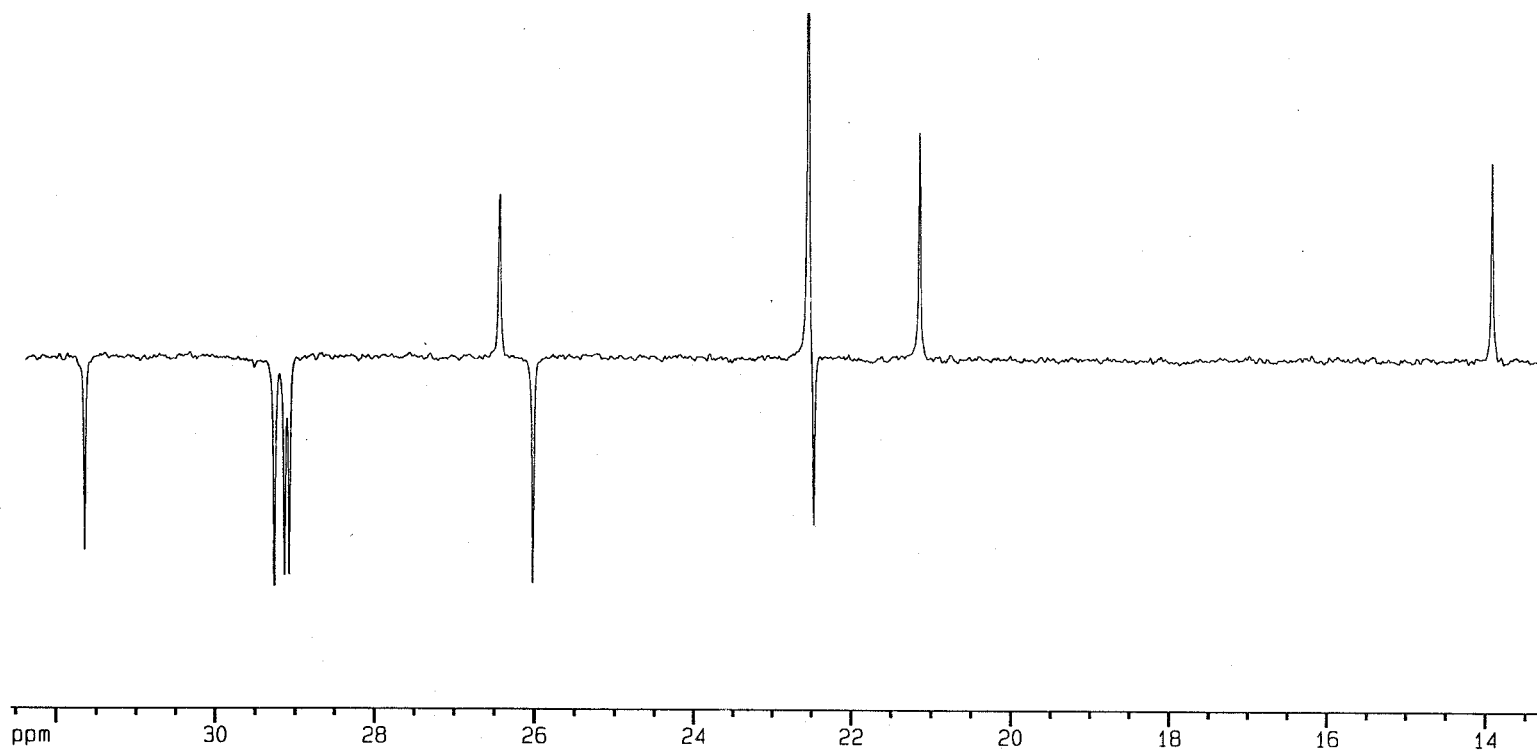
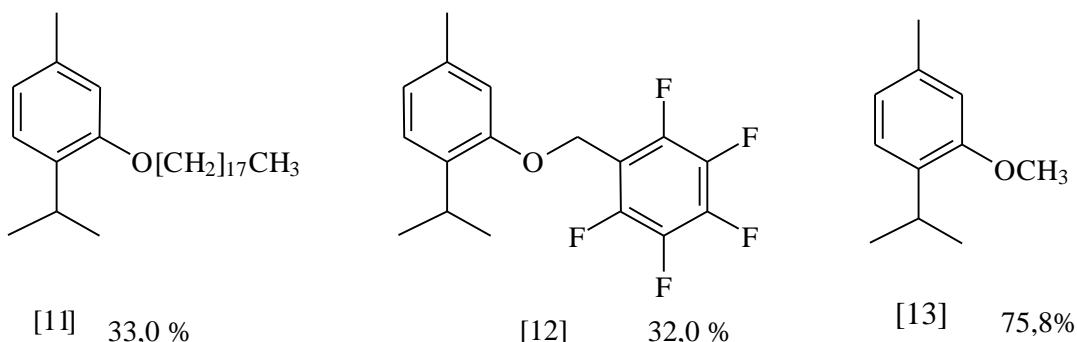


Figura 13 - Parte do espectro de RMN de ¹³C (δ de 14 a 32; DEPT 135, 50 MHz, CDCl₃) do composto 1-isopropil-4-metil-2-octilobenzeno[10].

3.6. Preparo dos compostos 1-isopropil-4-metil-2-octadeciloxibenzeno [11], 2-(2',3',4',5',6'-pentafluoroxibenzil)-1-isopropil-4-metilbenzeno [12] e 1-isopropil-4-metil-2-metoxibenzeno [13]



A metodologia utilizada nas sínteses dos compostos [11] e [12] foi realizada de acordo com o procedimento de obtenção do composto [10]. O composto [13] foi obtido utilizando metodologia semelhante à descrita para a obtenção do composto [9].

O composto [11] foi obtido após três tentativas, Na primeira e segunda tentativas, as reações foram mantidas sob refluxo durante três e oito horas, respectivamente, após a adição do haleto. Na terceira tentativa, o tempo de refluxo foi mantido em oito horas, obtendo-se o composto desejado com rendimento relativamente baixo. Na obtenção do composto [12], o tempo de refluxo após a adição de haleto foi de duas horas, e para obtenção do composto [13] não foi necessário refluxo, uma vez que o iodeto de metila é bastante volátil ($T_e = 43\text{ }^\circ\text{C}$). O aumento da temperatura iria volatilizar o haleto, impedindo o contato entre os reagentes.

Nota-se que o rendimento da reação de formação do composto [13] é consideravelmente maior que o das demais reações. As prováveis explicações para este fato podem ser:

1^a) O haleto de alquila utilizado para obtenção do composto [13] (CH_3I) possui o iodo como átomo de halogênio da molécula, que acomoda melhor a carga negativa após a substituição pelo ânion 2-isopropil-5-metilfenóxido, sendo

melhor grupo abandonador do que o bromo, átomo de halogênio presente nos demais haletos utilizados.

2^a) A competição entre as reações de eliminação e substituição pode ter contribuído bastante para a redução do rendimento das reações realizadas com brometos de alquila (Figura 14).

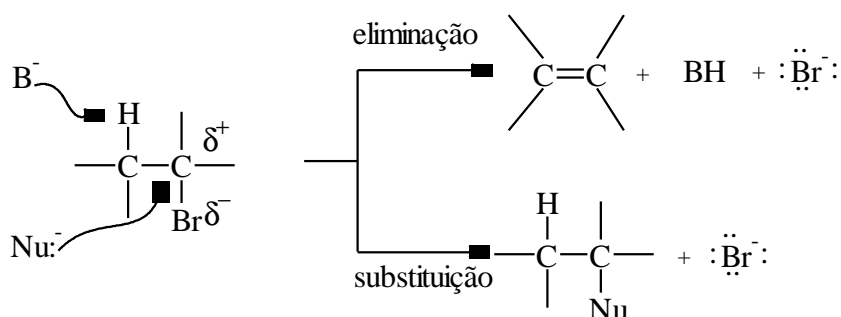


Figura 14 - Competição entre as reações de eliminação e substituição.

Reações de eliminação provavelmente ocorreram em virtude do excesso de hidreto de sódio (base forte, B⁻) adicionado e que não reagiu com o timol, apesar do fato de que, para haletos primários, os rendimentos do produto de eliminação normalmente são menores que os do produto de substituição (BARBOSA, 1998).

Como não é possível que o iodeto de metila sofra reação de eliminação, é formado exclusivamente o produto de substituição, contribuindo, assim, para o maior rendimento da reação de formação do composto [13]. O mesmo ocorre com os brometos de benzila e 2',3',4',5',6'-pentafluorbenzila, porém, apesar de não ter havido reações de eliminação com estes haletos, os rendimentos dos produtos das reações de substituição (compostos [8] e [12]) foram menores que o da reação de obtenção do composto [13]

Os espectros no IV dos compostos [11] e [13] apresentaram poucas diferenças entre si, possuindo as bandas correspondentes a alquil-aril-éteres. O composto [12] mostra bandas de absorção intensa em ampla faixa de frequência

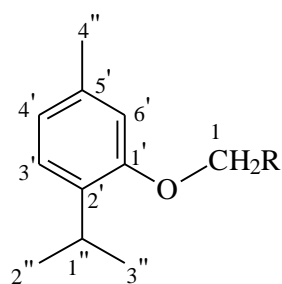
entre 1.250 e 1.100 cm^{-1} , devido aos diferentes modos de absorção axial C-F (SOLOMONS, 1996; PREETSCH et al., 1996).

O espectro de RMN de ^1H do composto [11] apresentou, além dos sinais referentes ao anel aromático e aos grupos substituintes metila e isopropila, um tripleto integrado para três hidrogênios em δ 0,88 ($\text{CH}_3[\text{CH}_2]_{17}\text{O}-$), um multiplete integrado para 30H em δ 1,26-1,55 ($\text{CH}_3\text{CH}_2[\text{CH}_2]_{15}\text{CH}_2\text{O}-$), um multiplete integrado para dois hidrogênios em δ 1,79 ($\text{CH}_3\text{CH}_2[\text{CH}_2]_{16}\text{O}-$) e um tripleto integrado para dois hidrogênios em δ 3,93 ($\text{CH}_3[\text{CH}_2]_{16}\text{CH}_2\text{O}-$). O espectro do composto [12] apresenta, além dos sinais citados, um simpleto integrado para dois hidrogênios em δ 5,11, correspondente ao grupo metileno entre os dois anéis aromáticos. O espectro do composto [13] apresenta um simpleto integrado para três hidrogênios em δ 3,81 ($\text{CH}_3\text{-O}-$).

A comparação dos espectros de RMN de ^{13}C dos compostos obtidos permite a confirmação da formação dos éteres, uma vez que existe coerência entre os dados obtidos e calculados para os principais deslocamentos químicos (Quadro 2).

Quadro 2 - Dados de RMN de ^{13}C dos éteres [11], [12] e [13]

δ_{C}	composto [11] (δ)	composto [12] (δ)	composto [13] (δ)	δ calculado
1	67,86	57,67	55,31	72,20 [11]; 54,10[13]
1'	156,24	155,02	156,65	156,70
2'	134,09	134,78	134,03	134,20
3'	125,78	126,29	125,81	127,40
4'	120,82	122,46	121,08	121,10
5'	136,20	136,46	136,30	136,20
6'	112,21	112,86	111,41	114,40
1''	26,26	26,36	26,41	----
2''	22,73	22,77	22,80	24,10
3''	21,36	21,27	22,80	24,10
4''	21,36	21,27	21,36	21,30



R = $[\text{CH}_2]_{16}\text{CH}_3$ [11]

C_6F_5 [12]

H [13]

3.7. Tentativa de formação do composto 2-isopropil-5-metil-4-nitrofenol [14]

A nitração de fenóis usando técnicas-padrão de nitração normalmente gera produtos com rendimentos bastante baixos, principalmente devido à oxidação competitiva do anel, que leva à formação de grande quantidade de produtos coloridos, com rendimentos muito baixos ou nenhum rendimento do produto desejado (DWYER e HOLZAPFEL, 1998).

O mecanismo de nitração do timol envolve a formação do íon nitrônio por ação do ácido sulfúrico sobre o nitrato de sódio (VOGEL, 1971). Em seguida, o íon nitrônio age como eletrófilo sobre o anel aromático, e a adição deste íon leva à formação de um íon arênio que posteriormente transfere um próton para uma base, formando o nitroderivado (SOLOMONS, 1996; BARBOSA, 1998).

Nas tentativas realizadas foi seguido o procedimento ilustrado na Figura 15.

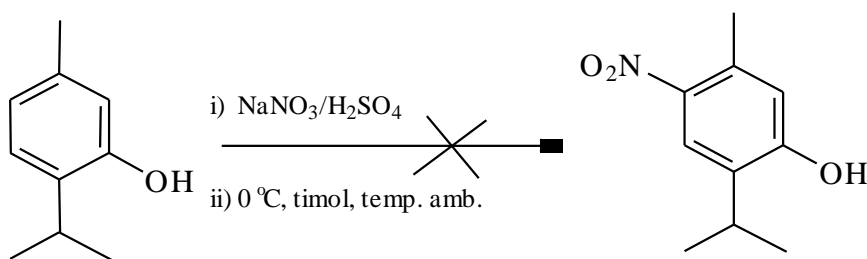


Figura 15 - Procedimento utilizado nas tentativas de obtenção do composto 2-isopropil-5-metil-4-nitrofenol [14].

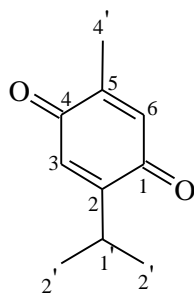
Em ambas as tentativas não foi obtido o produto desejado, porém na segunda tentativa conseguiu-se isolar por meio de cromatografia em placas preparativas uma pequena quantidade de sólido amarelo, para o qual foram obtidos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C.

A análise do espectro RMN de ^{13}C do composto obtido (Figura 16) mostrou que a síntese não foi bem sucedida. O espectro apresentou sinais em δ 15,36; 21,42; 26,00; e 56,00, correspondentes aos átomos de carbono dos grupos metil e isopropil ligados ao anel aromático e seis sinais com deslocamento químico 130,40; 133,45; 145,22; 155,00; 187,47; e 188,5. Estes dois últimos sinais apresentam-se muito distantes do TMS e não correspondem a sinais de átomos de carbono ligados ao grupo nitro (deslocamento químico calculado para $\text{C-NO}_2 = 141,4$), sendo mais evidente a formação de uma quinona cujo deslocamento químico tabelado para átomos de carbono ligados ao oxigênio é aproximadamente 187 (PREETSCH et al., 1996). Pela análise do espectro, não foi possível a distinção entre os deslocamentos químicos para os átomos de carbonos C_1 e C_4 , entretanto sabe-se que os sinais em δ 187,5 e 188,7 são relativos aos carbonos carbonílicos (C=O).

Os demais sinais também não correspondem aos valores calculados para o composto nitrado.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 17 e Quadro 3) mostrou, além dos sinais correspondentes aos grupos substituintes metil e isopropil, dois simpletos integrados para um hidrogênio cada em δ 6,52 e 6,55. Estes sinais reforçam a evidência de que o produto formado é uma quinona [15], uma vez que no nitrofenol estes sinais encontrariam-se mais distantes do TMS (δ calculado = 8,21 e 7,52).

Uma terceira tentativa foi realizada utilizando-se uma mistura de ácidos nítrico e acético (2:1 v/v) com o objetivo de aumentar a miscibilidade entre os reagentes e o timol dissolvido em THF. A reação, no entanto, não ocorreu, observando-se na placa de CCD os pontos com mesmo R_f que aqueles originados nas tentativas anteriores.



[15]

Quadro 3 - Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto [15]

d	mult.	n ^o de H	atrib.	J (Hz)
1,13	d	6	$\text{H}_{2'}$	$J_{2',1'} = 6,9$
2,04	s	3	$\text{H}_{4'}$	---
3,02	m	1	$\text{H}_{1'}$	$J_{1',2'} = 6,9$
6,52	s	1	H_2	---
6,55	s	1	H_3	---

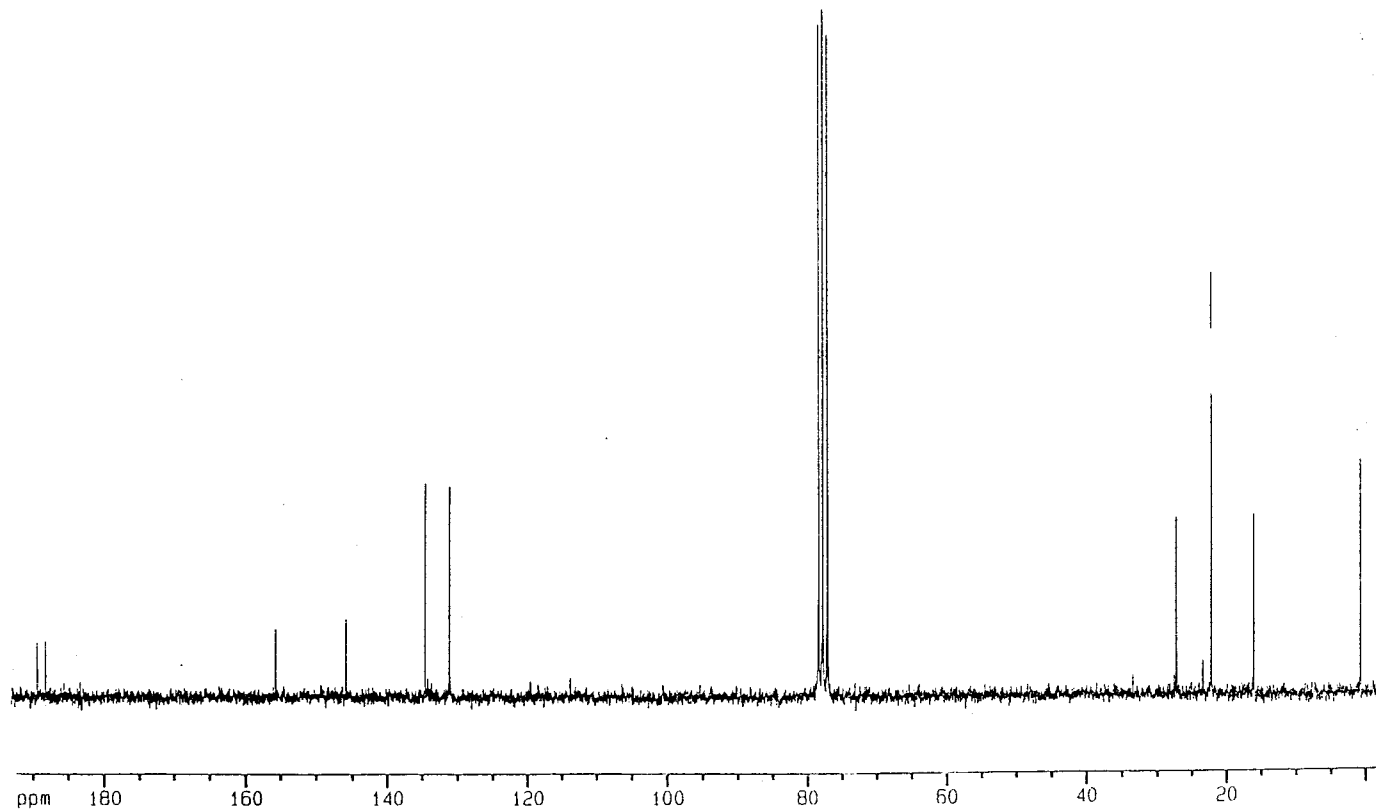


Figura 16 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da timoquinona [15].

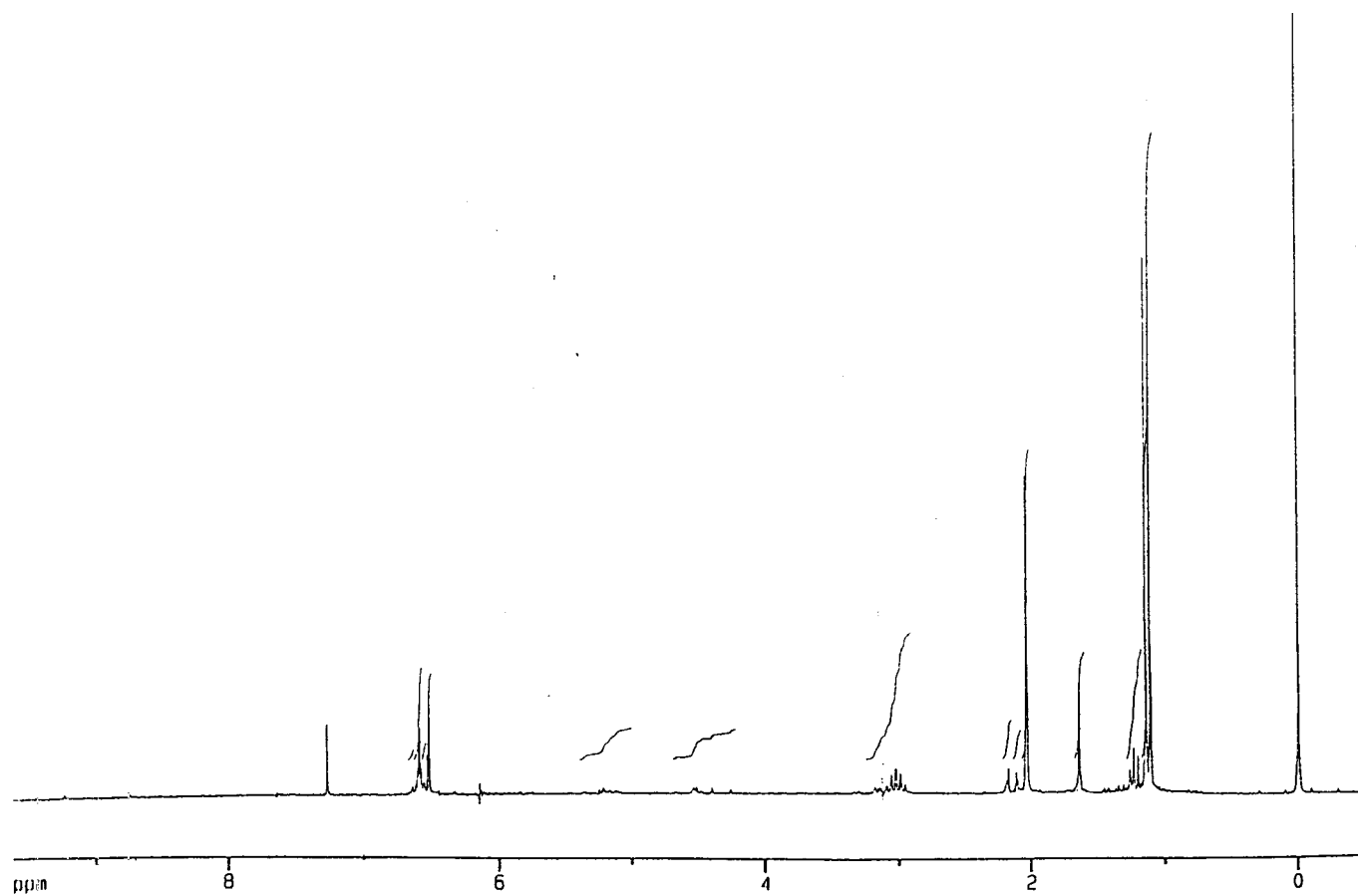


Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da timoquinona [15].

3.8. Tentativas de formação do 3-isopropil-6-metil-4-metoxi-1-nitrobenzeno [16]

Uma alternativa, no caso de fenóis, é a redução da densidade eletrônica do anel com a proteção do grupo hidroxila (Kametani e Ogasawara, 1966, citados por DWYER e HOLZAPFEL, 1998). Nesse sentido, tentou-se nitração do composto 1-isopropil-4-metil-2-metoxibenzeno [13], cujo grupo hidroxila do timol está protegido por um grupo metila. Pretendia-se, após a nitração, retirar o grupo protetor, obtendo-se derivado nitrado do timol.

Foram feitas três tentativas de reação, e nas duas primeiras utilizou-se ácido sulfúrico e nitrato de sódio, não se obtendo sucesso na síntese. A terceira tentativa foi feita adicionando-se uma mistura de ácidos acético e nítrico (1:2 v/v) sobre o 1-isopropil-4-metil-2-metoxibenzeno [13] a 0 °C. O material obtido foi submetido ao fracionamento em coluna. No entanto, não se conseguiu isolar quantidades significativas dos produtos.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Todas as reações propostas para sínteses de éteres foram realizadas, embora os rendimentos da maioria delas tenham sido relativamente baixos em virtude da competição entre reações de eliminação e substituição nucleofílica. O melhor rendimento foi obtido na reação de síntese do 1-isopropil-4-metil-2-metoxibenzeno (13; 75,8%). Foram obtidos seis éteres derivados do timol: dois com grupos substituintes aromáticos (compostos [8] e [12]) e quatro com grupos lineares (compostos [9], [10], [11] e [13]).

As reações de nitração do timol e do composto [13] não foram bem sucedidas, em virtude da oxidação dos anéis aromáticos pelos ácidos e, possivelmente, da formação de compostos solúveis na fase aquosa (como sulfonação do anel pelo ácido sulfúrico). Destas tentativas, foi obtida a timoquinona [15].

As reações de produção de sais derivados da piperazina foram todas bem sucedidas e apresentaram rendimentos quantitativos, sendo obtidos cinco sais contendo os ânions fosfato, sulfato, citrato, oxalato e cloreto.

Assim, foi de 12 o número total de compostos sintetizados, caracterizados e submetidos aos testes de avaliação da atividade nematicida sobre *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*, que serão apresentados nos capítulos 2 e 3.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA DOS DERIVADOS DO TIMOL

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento do modo de ação dos nematicidas convencionais sobre nematóides pode ser bastante útil no sentido de se planejar a síntese de novos nematicidas. Os mecanismos de interação entre o nematóide e o nematicida são o ponto fundamental para o direcionamento das sínteses. No entanto, o conhecimento da atividade específica dessas substâncias dentro do nematóide é ainda muito limitado, quando comparado com o que é conhecido a respeito de outras pragas e organismos patogênicos (TSAI et al., 1991).

Sabe-se que os nematóides são animais aquáticos e que necessitam de uma película de água ao redor dos seus corpos para permanecerem ativos. Dessa forma, qualquer nematicida com toxidez no contato deve passar através desta película para então encontrar a cutícula do nematóide, atravessar uma membrana de lipídeos e penetrar no seu organismo. Portanto, as barreiras físicas que podem impedir que substâncias tóxicas atinjam receptores-alvo ou sítios ativos dentro do nematóide incluem cutícula, membranas dos ovos e membranas internas.

Nem sempre a penetração é a rota de ação dos nematicidas. VAN GUNDY e McKENRY (1977) sugeriram que a relativa sensibilidade dos nematóides a haletos de alquila e, provavelmente, a nematicidas não-fumigantes se deve ao metabolismo do nematóide.

Com relação ao modo de ação dos nematicidas, CASTRO e BELSER (1978) sugeriram dois mecanismos de ação para o dibrometo de etila (EDB) em *Aphelenchus avenae*: oxidação dos centros de Fe^{2+} ou uma reação de alquilação nos sítios ativos de esterasas ou proteases. Os organocarbamatos e organofosforados agem primariamente, inibindo a acetilcolinesterase na sinapse colinérgica do sistema nervoso do nematóide, paralisando o seu sistema sensorial, o que resulta na incapacidade deste em encontrar alimento (Evans, 1973, citado por TSAI et al., 1991). Estes compostos possuem mais efeito nematostático do que nematotóxico (CASTRO e BELSER, 1978). Muitos dos organofosforados e organocarbamatos que têm atividade sistêmica na planta, movimentando-se das raízes para a folhagem, parecem ser mais protetores e nematostáticos do que nematotóxico (TSAI et al., 1991). Todavia, existem ainda poucas referências na literatura sobre o modo de ação dos nematicidas dentro do organismo de fitonematóides.

Para ser comercializado como nematicida, um determinado composto passa por diversos testes, na sua maioria direcionados para atividade de contato imediato, devido à velocidade e facilidade com as quais estes testes podem ser realizados (LONGUE, 1998; TSAI et al., 1991). A técnica básica para testar a toxidez de qualquer nematicida envolve testes *in vitro*, através da imersão dos nematóides diretamente numa solução do composto a ser testado em placas de Petri ou tubos de vidro, seguindo-se a avaliação do percentual de mortalidade desses organismos.

Os testes dos compostos sintetizados foram realizados com os fitonematóides *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*, bastante conhecidos por se tratar de organismos de ampla distribuição geográfica (LONGUE, 1998), de fácil cultivo em casas de vegetação e que atacam culturas de grande expressão econômica.

A atividade anti-helmíntica do timol foi verificada sobre a microbiota do solo (SOLER et al., 1996), não sendo investigada especificamente sobre fitonematóides no que se refere à influência de substituintes no grupo hidroxila e ao modo como estes afetam esta atividade. Portanto, os testes dos derivados do timol sintetizados tiveram como objetivo a avaliação da influência destes substituintes no grupo hidroxila e da maneira com que estes afetam a atividade do timol.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho, o teste para avaliação da atividade nematicida dos compostos sintetizados descritos no capítulo 1 foi desenvolvido por KIMURA et al. (1981) e consiste no uso de um tubo com uma suspensão de nematóides vivos e o composto a ser avaliado, selado com uma membrana. Este tubo é invertido em solução de estreptomicina, de maneira a permitir que os nematóides sobreviventes atravessem esta membrana e sejam contados. Este método foi denominado “método do tubo invertido”.

Os fitonematóides submetidos ao ensaio do tubo invertido foram multiplicados em condições de casa de vegetação. *Meloidogyne incognita* foi multiplicado em tomateiro; o sistema radicular foi separado da parte aérea e as raízes foram lavadas, fragmentadas e trituradas em liquidificador, juntamente com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, em quantidade suficiente para cobrir as raízes.

A suspensão obtida foi vertida em duas peneiras sobrepostas de 200 e 500 mesh. Os ovos dos fitonematóides que ficaram retidos na peneira de 500 mesh foram recolhidos em béquer.

A seguir, a suspensão contendo ovos foi vertida em tela de náilon forrada com papel-filtro Whatman, para a retenção dos ovos, sendo então colocada em funil de plástico com água, em cuja extremidade inferior estava

adaptada uma mangueira de látex e um tubo de vidro de anestesia acoplado a esta. Os juvenis que eclodiam dos ovos atravessavam este papel e depositavam-se no fundo do tubo de anestesia. Os juvenis de 2^o estágio obtidos até 48 horas foram descartados, e os obtidos nas próximas 24 horas foram utilizados para o ensaio.

O fitonematóide *Heterodera glycines* foi multiplicado em plantas de soja e as raízes coletadas foram lavadas com água, para remoção das fêmeas, sobre duas peneiras sobrepostas de 20 e 100 mesh. As fêmeas retidas na peneira de 100 mesh foram amassadas para liberação dos ovos, os quais, com o auxílio de jatos de água, foram transferidos para uma peneira de 500 mesh colocada abaixo da peneira de 100 mesh. Os ovos foram recolhidos e a suspensão resultante foi vertida em tela de náilon contendo papel-filtro do tipo Whatman, conforme descrito para *Meloidogyne incognita*.

Para a realização dos ensaios biológicos, os compostos sintetizados foram solubilizados em metanol, de maneira que as concentrações das soluções de cada composto fossem de 5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Destas soluções foram retiradas alíquotas de 0,1 mL, transferidas para tubos de ensaio que continham 1,9 mL de solução a 0,1% do detergente Tween 20, sendo em seguida adicionado a cada tubo 0,5 mL de suspensão aquosa contendo cerca de 400 nematóides.

Os tubos foram então selados com um lenço de papel facial e incubados em ausência de luz durante 48 horas a uma temperatura de 26 °C. Após este tempo, os tubos foram invertidos em placas de Petri contendo 5 mL de uma solução antibiótica de sulfato de estreptomicina (1000 $\mu\text{g L}^{-1}$) e novamente incubados por mais 48 horas a 26 °C em ausência de luz.

Ao final deste período, foram contados os nematóides existentes em cada placa, com o auxílio de microscópio estereoscópico, e a atividade nematicida de cada composto foi avaliada pela seguinte equação:

$$\% \text{ de mortalidade} = [(B-A)/B] \times 100$$

em que A é a média do número de nematóides vivos após o tratamento com cada composto e B o número médio de nematóides vivos na solução controle (branco), que neste caso foi metanol puro.

Foram avaliadas as atividades nematicidas dos éteres 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8], 2-etoxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [9], 1-isopropil-4-metil-2-octiloxibenzeno [10], 1-isopropil-4-metil-2-octadeciloxibenzeno [11], 2-(2', 3',4',5',6'-pentafluorbenziloxi)-1-isopropil-4-metilbenzeno [12], 1-isopropil-4-metil-2-metoxibenzeno [13], da timoquinona [15] e do timol [4].

As estruturas dos compostos avaliados encontram-se na Figura 1.

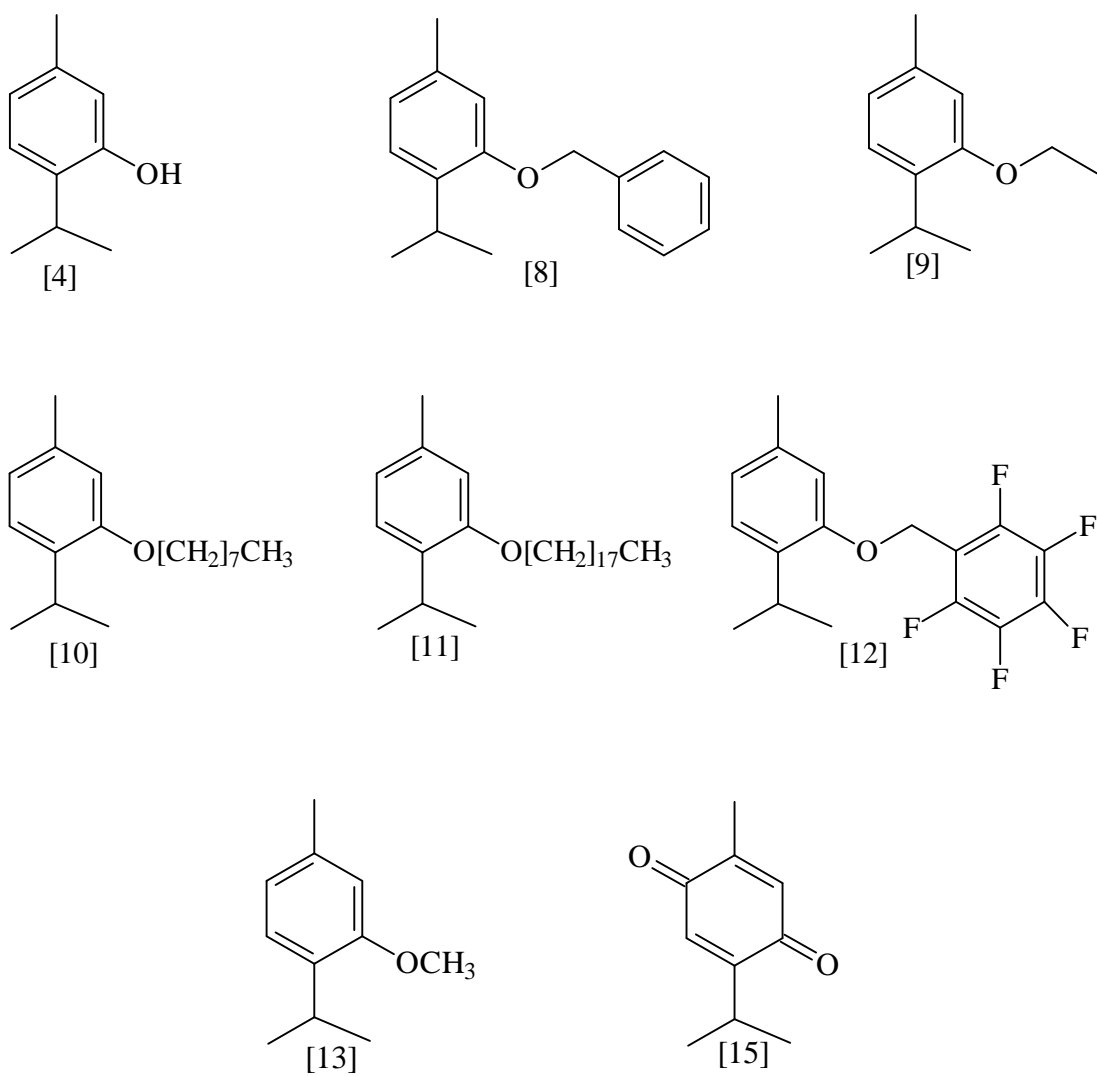


Figura 1 - Estrutura dos compostos avaliados nesta etapa do trabalho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os percentuais de mortalidade apresentados pelo timol e seus derivados sintetizados, na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ variaram de 1,8 a 81,8%, quando testados sobre *M. incognita* (Quadro 1 e Figura 2), e de 0 a 18%, quando testados sobre *H. glycines* (Quadro 3 e Figura 4). Na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ o percentual de mortalidade variou de 5,3 a 87,1%, quando os compostos foram testados sobre *M. incognita* (Quadro 2 e Figura 3), e de 0 a 26,9%, quando testados sobre *H. glycines* (Quadro 4 e Figura 5).

Primeiramente, para a concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos compostos sintetizados, observou-se, através do teste de agrupamentos de médias de Scott-Knott, que a substituição do hidrogênio do grupo hidroxila do timol pelo grupo etila (composto [9]) aumentou significativamente a porcentagem de mortalidade em aproximadamente 27% com relação a *M. incognita* (Quadro 1).

Notou-se que, para os éteres sintetizados, o aumento do número de átomos de carbono na cadeia alquílica para mais de dois átomos, como é o caso dos compostos [10] (oito átomos de carbono) e [11] (18 átomos de carbono), resultou em acentuada diminuição da porcentagem de mortalidade desse nematóide. A diminuição do número de átomos de carbono para menos de dois também resultou em diminuição da mortalidade, como é o caso do composto [13], no qual o hidrogênio hidroxílico foi substituído pelo grupo metila.

Para uma concentração dez vezes maior dos éteres sintetizados ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) a substituição do hidrogênio do grupo hidroxila do timol pelo grupo etila resultou em diminuição pouco significativa da porcentagem de mortalidade (Quadro 2). A diminuição do percentual de mortalidade com diminuição ou aumento da cadeia alquílica para mais ou menos de dois átomos de carbono também é observada nesta concentração. Todos os éteres apresentaram maior porcentagem de mortalidade quando testados a uma concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os compostos [8] e [12], que possuem substituintes aromáticos, e a timoquinona [15] apresentaram baixos percentuais de mortalidade nas concentrações de 5 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *M. incognita*, não diferindo significativamente da testemunha, quando comparados pelo teste de agrupamento de médias de Scott-Knott (Quadros 1 e 2).

Os resultados descritos mostraram que: 1) o composto [9] foi eficiente na redução *in vitro* da população de *M. incognita* na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, quando comparado ao timol; 2) o aumento da concentração dos demais éteres não resultou em aumento substancial do percentual de mortalidade; 3) fatores espaciais influenciaram o mecanismo de ação nematicida dos derivados do timol, uma vez que substituintes alquílicos com cadeias maiores e menores que dois átomos de carbono apresentaram significativa redução na porcentagem de mortalidade dos J_2 , quando comparados ao timol e ao composto [9], além do fato de que os derivados com substituintes aromáticos ([8] e [12]) e a timoquinona [15] também apresentaram esta redução; e 4) tornou-se possível inferir que o mecanismo de ação do composto [9] sobre *M. incognita* pode envolver a sua ligação a um receptor específico ou a um sítio ativo dentro do nematóide, uma vez que o tamanho da cadeia e o tipo de substituinte interferem bastante na porcentagem de mortalidade.

Essas observações permitem melhor direcionamento das sínteses de novos derivados do timol com atividade nematicida, uma vez que se chegou à conclusão de que o éter [19] é o mais promissor para se trabalhar no sentido de se realizar adição de novos grupos a este composto com o intuito de aumentar sua atividade nematicida, seja no substituinte alquílica ou no anel aromático.

Para o nematóide *Heterodera glycines* nenhum dos éteres sintetizados apresentou porcentagem de inibição maior que 30% nas concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Quadros 3 e 4). A timoquinona [15] apresentou a maior porcentagem em ambas as concentrações, porém a diferença não foi significativa quando comparada ao timol [4]. Os compostos [9], [13] e o timol [4], que apresentaram os maiores índices de mortalidade contra *M. incognita*, não produziram o mesmo efeito quando testados sobre *H. glycines*.

As observações feitas permitem concluir que os mecanismos de ação dos compostos testados não são os mesmos para as duas espécies de nematóides submetidas aos ensaios biológicos.

Quadro 1 - Porcentagem de mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* tratados com derivados do timol ($5\mu\text{g mL}^{-1}$)

Tratamento	% de Mortalidade	Média de Nematóides Sobreviventes *	Comparações das Médias de Nematóides Sobreviventes**
Testemunha	0	375,50	A
[8]	1,8	368,67	A
[10]	8,7	342,67	A
[11]	18,1	307,33	A
[12]	7,6	346,83	A
[15]	2,1	367,33	A
[13]	40,6	223,00	B
Timol	56,1	164,67	C
[9]	81,8	68,33	D

* - Média de seis repetições.

** - As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de significância.

Quadro 2 - Porcentagem de mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* tratados com derivados do timol ($50\mu\text{g mL}^{-1}$)

Tratamento	% de Mortalidade	Média de Nematóides Sobreviventes *	Comparações das Médias de Nematóides Sobreviventes**
Testemunha	0	377,33	A
[8]	5,3	357,33	A
[12]	9,4	342,00	A
[15]	14,2	323,67	A
[10]	27,1	275,00	B
[11]	28,9	268,33	B
[13]	58,8	155,33	C
Timol	87,1	48,67	D
[9]	86,7	50,33	D

* - Média de seis repetições.

** - As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de significância.

Quadro 3 - Porcentagem de mortalidade de juvenis de *Heterodera glycines* tratados com derivados do timol ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Tratamento	% de Mortalidade	Média de Nematóides Sobreviventes *	Comparações das Médias de Nematóides Sobreviventes* *
Testemunha	0	365,50	A
Timol	1,3	360,67	A
[8]	7,5	338,00	A
[9]	3,3	353,33	A
[10]	3,6	352,50	A
[11]	8,1	336,00	A
[12]	0	371,33	A
[13]	3,2	353,67	A
[15]	18,0	299,67	A

* - Média de seis repetições.

** - As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5 % de significância.

Quadro 4 - Porcentagem de mortalidade de juvenis de *Heterodera glycines* tratados com derivados do timol ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Tratamento	% de Mortalidade	Média de Nematóides Sobreviventes *	Comparações das Médias de Nematóides Sobreviventes**
Testemunha	0	335,33	A
Timol	11,0	298,33	A
[8]	1,6	329,83	A
[9]	0	336,00	A
[10]	0,3	334,33	A
[11]	0,2	334,67	A
[12]	3,5	323,67	A
[13]	15,0	285,00	A
[15]	26,9	245,17	A

* - Média de seis repetições.

** - As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5 % de significância.

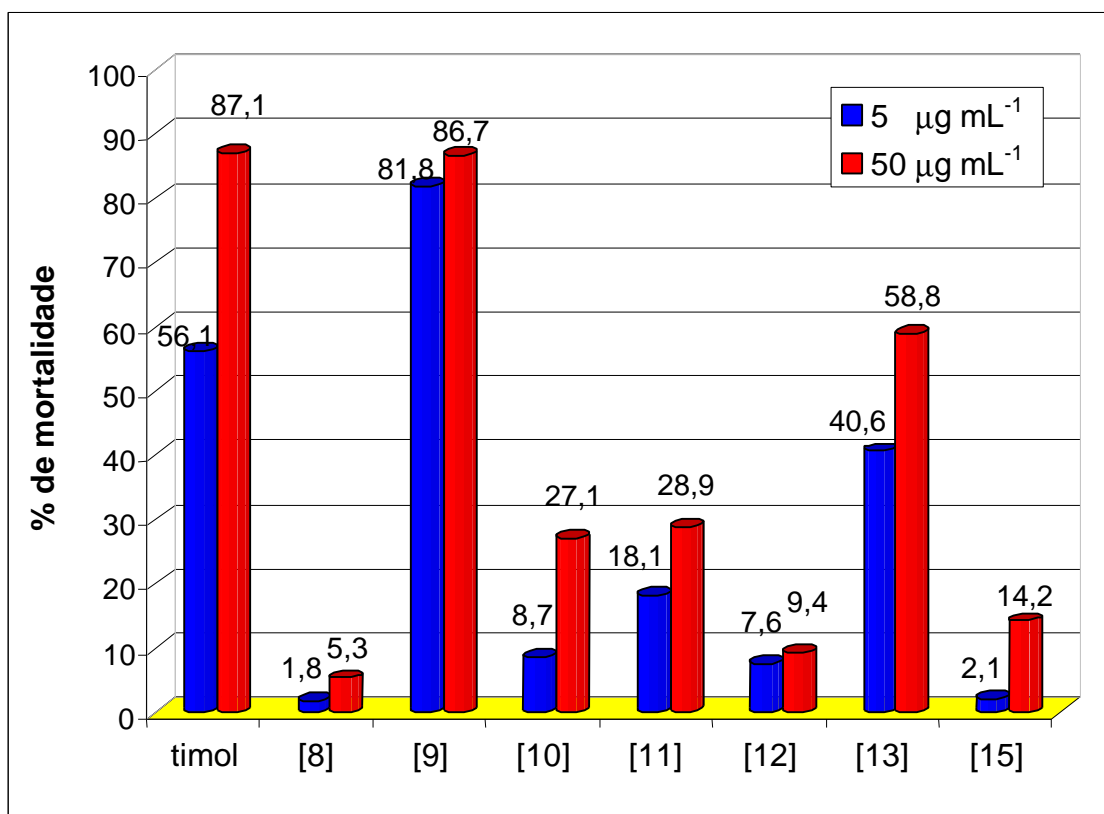


Figura 2 - Porcentagem de mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* tratados com derivados do timol (5 e 50 µg mL⁻¹).

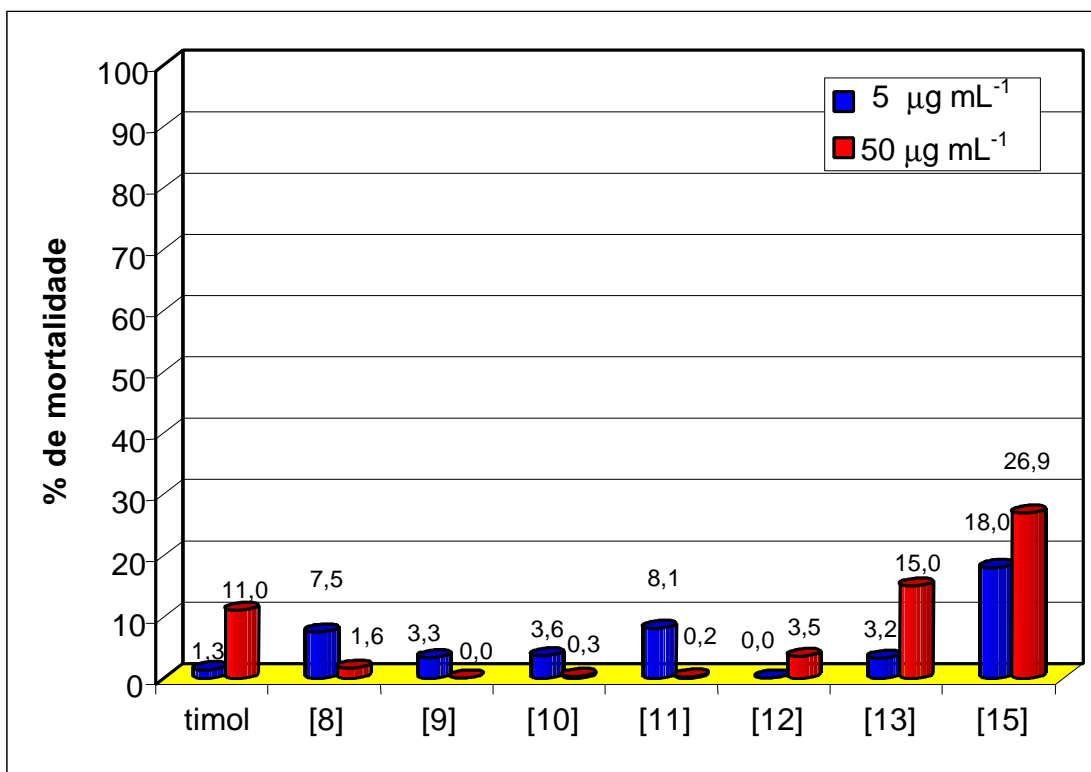


Figura 3 - Porcentagem de mortalidade de juvenis de *Heterodera glycines* tratados com derivados do timol (5 e 50 µg mL⁻¹).

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Os testes da atividade dos éteres derivados do timol e da timoquinona realizados permitiram observar a influência dos efeitos estéricos e da concentração sobre a atividade nematicida destes compostos quando testados sobre *Meloidogyne incognita*. Este fato permite melhor direcionamento das sínteses de futuros derivados com relação ao tipo do grupo substituinte a ser adicionado na molécula de timol.

Outra conclusão deste trabalho refere-se à diferença existente entre os mecanismos de ação destes compostos sobre as espécies *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*, sugerindo que uma abordagem diferente deve ser feita para a síntese de nematicidas que visam o controle de *Heterodera glycines*, uma vez que os derivados do timol sintetizados foram pouco eficazes nos ensaios *in vitro* sobre estes.

Dos compostos sintetizados, o éter [9] foi o que apresentou a maior taxa de mortalidade de J₂ de *Meloidogyne incognita* (81,8% a 5 µg mL⁻¹ e 86,7% a 50 µg mL⁻¹) pelo teste do tubo invertido. Para os ensaios realizados com *Heterodera glycines*, a maior taxa foi apresentada pela timoquinona [15] (18,0% a 5 µg mL⁻¹ e 26,9% a 50 µg mL⁻¹).

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA DOS SAIS DE PIPERAZINA

1. INTRODUÇÃO

A atividade anti-helmíntica clínica e experimental da piperazina tem sido amplamente revista (BHATT et al., 1990). Vários de seus sais, como citrato e fosfato, têm sido preparados e utilizados em terapia juntamente com hexabiidrato (Goodwin e Standen, 1958, citados por BHATT et al., 1990). Estes sais são frequentemente utilizados em animais e no homem, apresentando-se na forma sólida, com exceção do monoídrocloreto de piperazina e do sulfato de dipiperazina, que são líquidos.

O mecanismo de ação dos sais de piperazina sobre o parasita animal *Ascaris lumbricoides* é bastante conhecido. Neste organismo os sais agem através da paralisação da musculatura, facilitando sua expulsão pelo organismo hospedeiro. A paralisação induzida pela piperazina é atribuída a dois mecanismos: 1) estabilização da membrana do parasita, tornando-a inexcitável, através da hiperpolarização da membrana, portanto, contrária à ação da

acetilcolina; e 2) inibição da reação redutiva do fumarato, que resulta na formação do ácido succínico. Esta reação fornece energia de contração muscular e ocorre provavelmente nas mitocôndrias (ZANINI e OGA, 1989).

Apesar das informações acerca do modo de ação dos sais de piperazina sobre *A. lumbricoides*, o mecanismo de ação sobre fitonematóides é ainda desconhecido.

Com o objetivo de avaliar a ação dos sais de piperazina sobre fitonematóides, no que se refere à influência do tipo de ânion ligado a esta, foram realizados ensaios com os sais de piperazina que continham ânions derivados de ácidos clorídrico, cítrico, fosfórico, oxálico e sulfúrico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A mesma metodologia utilizada para a avaliação da atividade nematicida dos derivados do timol, descrita no capítulo anterior, também foi utilizada para a avaliação da atividade dos sais derivados da piperazina.

O fitonematóide *Meloidogyne incognita* foi multiplicado em tomateiro, em condições de casa de vegetação; o sistema radicular foi separado da parte aérea e as raízes foram fragmentadas e trituradas em liquidificador, com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% em quantidade suficiente para cobrir as raízes.

A suspensão obtida foi vertida em duas peneiras sobrepostas de 200 e 500 mesh. Os ovos dos fitonematóides ficaram retidos na peneira de 500 mesh e foram recolhidos em béquer.

A seguir, a suspensão contendo ovos foi vertida em tela de náilon com papel-filtro Whatman, para a retenção dos ovos, sendo então colocada em funil de plástico com água, em cuja extremidade inferior estava adaptada uma mangueira de látex e um tubo de vidro de anestesia acoplado a esta. Os juvenis que eclodiam dos ovos atravessavam este papel e depositavam-se no fundo do tubo de anestesia.

Os juvenis de 2^o estágio obtidos até 48 horas foram descartados, e os obtidos nas próximas 24 horas foram utilizados para o ensaio.

O fitonematóide *Heterodera glycines* foi multiplicado em plantas de soja e as raízes coletadas foram lavadas com águas para a remoção das fêmeas, as quais ficaram retidas na peneira de 100 mesh após passarem pela de 20 mesh. As fêmeas retidas na peneira de 100 mesh foram esmagadas para a liberação dos ovos, que, com auxílio de jatos de água, foram transferidos para uma peneira de 500 mesh e colocados abaixo da peneira de 100 mesh. Os ovos foram recolhidos e a suspensão resultante foi vertida em tela de náilon contendo papel-filtro do tipo Whatman, conforme descrito para *Meloidogyne incognita*.

Para a realização dos ensaios biológicos, os compostos sintetizados foram solubilizados em metanol, de maneira que as concentrações das soluções de cada composto fossem de 5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Destas soluções foram retiradas alíquotas de 0,1 mL, que foram transferidas para tubos de ensaio que continham 1,9 mL de solução do detergente Tween 20 a 0,1%. Em seguida, foi adicionado a cada tubo 0,5 mL de suspensão aquosa, contendo cerca de 400 nematóides.

Os tubos foram então selados com um lenço de papel facial e incubados em ausência de luz durante 48 horas a uma temperatura de 26 °C. Após este tempo, os tubos foram invertidos em placas de Petri contendo 5 mL de uma solução antibiótica de sulfato de estreptomicina (1000 $\mu\text{g L}^{-1}$) e, novamente, incubados por mais 48 horas a 26 °C em ausência de luz.

Ao final desse período foram contados os nematóides existentes em cada placa com auxílio de microscópio estereoscópico, e a atividade nematicida dos compostos cloreto de piperazina [17], citrato de piperazina [18], fosfato de piperazina [19], oxalato de piperazina [20] e sulfato de piperazina [21], cujas estruturas são apresentadas na Figura 1, foi avaliada.

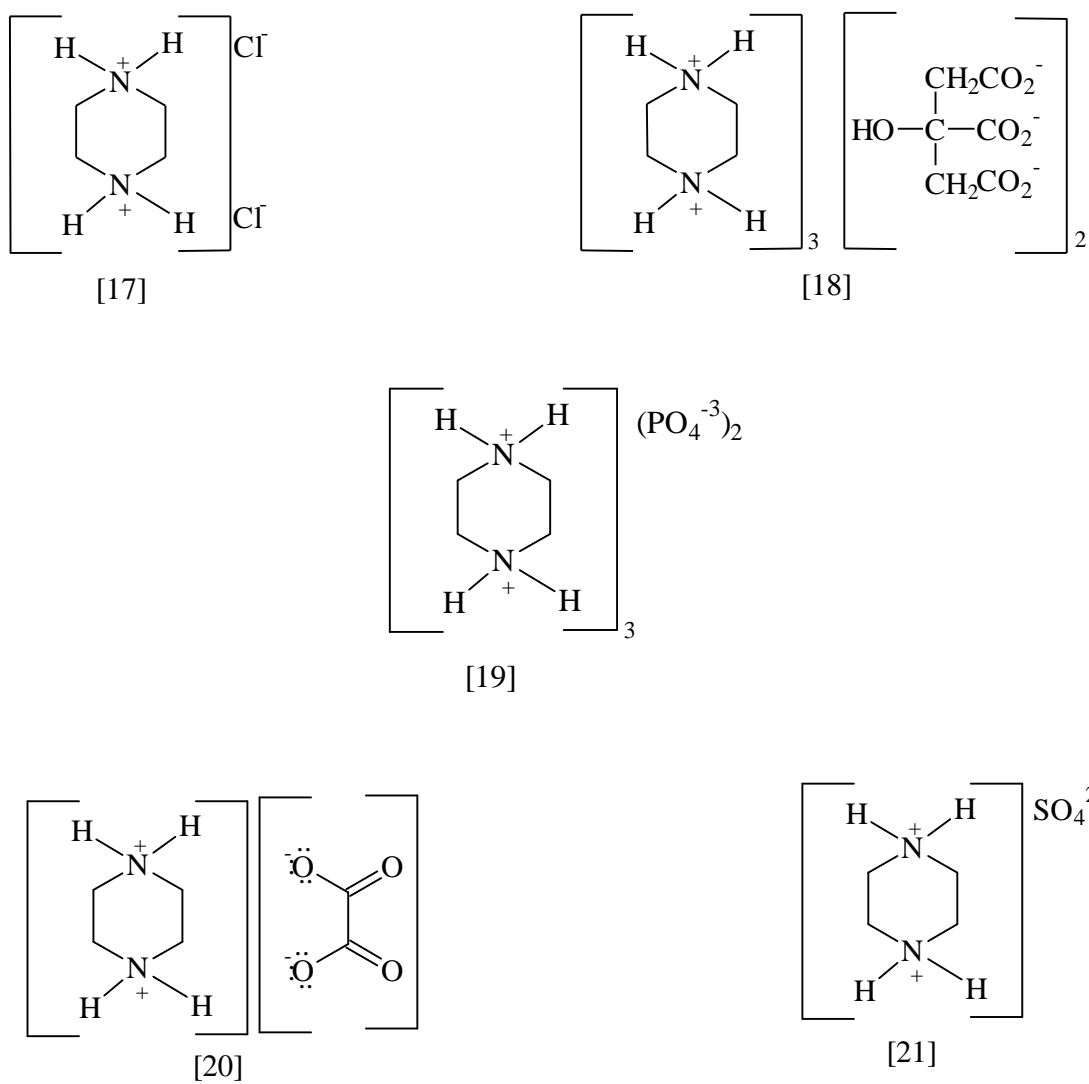


Figura 1 - Estruturas dos compostos avaliados nesta etapa do trabalho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação aos sais derivados da piperazina, as porcentagens de inibição em *M. incognita* variaram de 3,6 a 75,6%, na concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de 11,7 a 81,8%, na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em ambas as concentrações os sais que apresentaram maior porcentagem de mortalidade foram o citrato de piperazina e o oxalato de piperazina. O fosfato de piperazina apresentou menor taxa de mortalidade em relação ao sais oxalato e citrato de piperazina (Quadros 1 e 2).

Nota-se que os sais derivados de ácidos orgânicos (citrato [18] e oxalato [20]) apresentaram maiores taxas de mortalidade para *M. incognita* em relação àqueles derivados de ácidos inorgânicos. Provavelmente a ação destes compostos estaria envolvendo a inibição da acetilcolinesterase na sinapse colinérgica do sistema nervoso do nematóide, impedindo a atividade neuromuscular deste (TSAI et al., 1991), sendo, portanto semelhante à ação dos nematicidas organocarbamatos.

As colinesterases possuem dois sítios ativos: um sítio aniônico, ao qual o grupo trimetilamônio da acetilcolina liga-se através de forças de Coulomb, e o sítio esterásico, que possui uma hidroxila pertencente à serina e que se liga ao carbono carboxílico da acetilcolina (SCIVOLETTO, 1982).

Os compostos organocarbamatos ligam-se de maneira semelhante a acetilcolina nos sítios ativos da enzima, diferindo na velocidade de hidrólise, que é bem mais lenta, o que resulta em inibição (ZANINI e OGA, 1989).

Assim, os compostos [18] e [20] possivelmente se ligem aos sítios ativos da acetilcolinesterase de maneira semelhante aos organocarbamatos: o grupo amino da piperazina liga-se ao sítio aniônico da enzima e os ânions citrato e oxalato contendo grupos carboxila ligam-se ao sítio esterásico desta enzima.

Como os demais sais de piperazina são derivados de ácidos inorgânicos que não possuem o grupo carboxila, estes compostos ligam-se à enzima apenas no sítio aniônico, o que não é suficiente para inativá-la.

Para *H. glycines*, os sais citrato, oxalato, sulfato e fosfato de piperazina não apresentaram diferença significativa de taxa de mortalidade quando comparados à testemunha, em ambas as concentrações (Quadros 3 e 4, Figura 2). O cloreto de piperazina, no entanto, apresentou elevadas porcentagens de mortalidade em ambas as concentrações em que foi testado: 83 e 88% para as concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

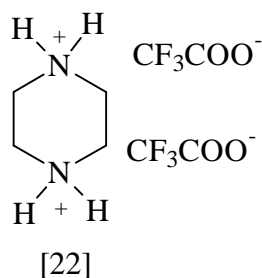
Outra observação é a do efeito da concentração de cloreto de piperazina sobre o índice de mortalidade. Notou-se que um aumento da concentração do sal em dez vezes não alterou significativamente este índice, demonstrando que este sal foi bastante ativo em baixa concentração (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

O inverso do que foi observado para *M. incognita* ocorreu nos ensaios realizados com *H. glycines*: o sal contendo um ânion inorgânico [17] apresentou maior percentual de inibição sobre este último nematóide do que os sais contendo ânions orgânicos. Nota-se, portanto, que a ação dos sais de piperazina sobre *H. glycines* é diferente da observada sobre *M. incognita*, envolvendo um receptor-alvo ou sítio ativo diferente da acetilcolinesterase.

Os mecanismos de ação deste sal sobre *H. glycines* podem ser semelhantes ao da ação de sais de piperazina sobre *A. lumbricoides* citados anteriormente.

LONGUE (1998) reportou que o sal de piperazina contendo o ânion trifluoroacetato [22] apresentou porcentagem de inibição sobre *H. glycines* de

57% a uma concentração de 20 mg mL^{-1} , ao passo que esta porcentagem foi de apenas 29% para *M. incognita*. Para a piperazina, esta porcentagem foi de 59% para *M. incognita* e de 53% para *H. glycines* na concentração de $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.



Com base nessas observações, pode-se concluir que a adição dos ânions citrato e oxalato aumentou a atividade nematicida da piperazina diante de *M. incognita* raça 3. Em *H. glycines*, a adição do ânion cloreto também provocou aumento nesta atividade. Deve-se lembrar ainda que este aumento ocorreu para as duas concentrações em que os compostos foram testados (5 e $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$).

Quadro 1 - Porcentagem de mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* tratados com sais de piperazina ($5\mu\text{g mL}^{-1}$)

Tratamento	% de Mortalidade	Média de Nematóides Sobreviventes *	Comparações das Médias de Nematóides Sobreviventes**
Testemunha	0,0	375,50	A
Piperazina	23,3	288,03	B
[17]	6,6	350,67	A
[21]	3,6	362,00	A
[19]	37,4	235,17	C
[18]	75,6	91,50	D
[20]	72,6	103,00	D

* - Média de seis repetições.

** - As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5 % de significância.

Quadro 2 - Porcentagem de mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* tratados com sais de piperazina ($50\mu\text{g mL}^{-1}$)

Tratamento	% de Mortalidade	Média de Nematóides Sobreviventes *	Comparações das Médias de Nematóides Sobreviventes**
Testemunha	0,0	377,33	A
Piperazina	58,8	155,43	D
[17]	16,5	315,17	B
[21]	11,7	333,33	B
[19]	43,3	214,00	C
[18]	81,8	68,83	E
[20]	80,5	73,67	E

* - Média de seis repetições.

** - As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5 % de significância.

Quadro 3 - Porcentagem de mortalidade de juvenis de *Heterodera glycines* tratados com sais de piperazina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Tratamento	% de Mortalidade	Média de Nematóides Sobreviventes *	Comparações das Médias de Nematóides Sobreviventes**
Testemunha	0,0	365,50	A
Piperazina	12,9	318,42	B
[18]	11,1	325,00	B
[19]	0,0	365,50	A
[20]	1,4	360,33	A
[21]	0,0	380,00	A
[17]	83,0	62,17	C

* - Média de seis repetições.

** - As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5 % de significância.

Quadro 4 - Porcentagem de mortalidade de juvenis de *Heterodera glycines* tratados com sais de piperazina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Tratamento	% de Mortalidade	Média de Nematóides Sobreviventes *	Comparações das Médias de Nematóides Sobreviventes**
Testemunha	0	335,33	A
Piperazina	56,5	145,78	B
[18]	7,7	309,50	A
[19]	0	348,00	A
[20]	0	337,00	A
[21]	3,4	323,83	A
[17]	88,0	40,33	C

* - Média de seis repetições.

** - As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5 % de significância.

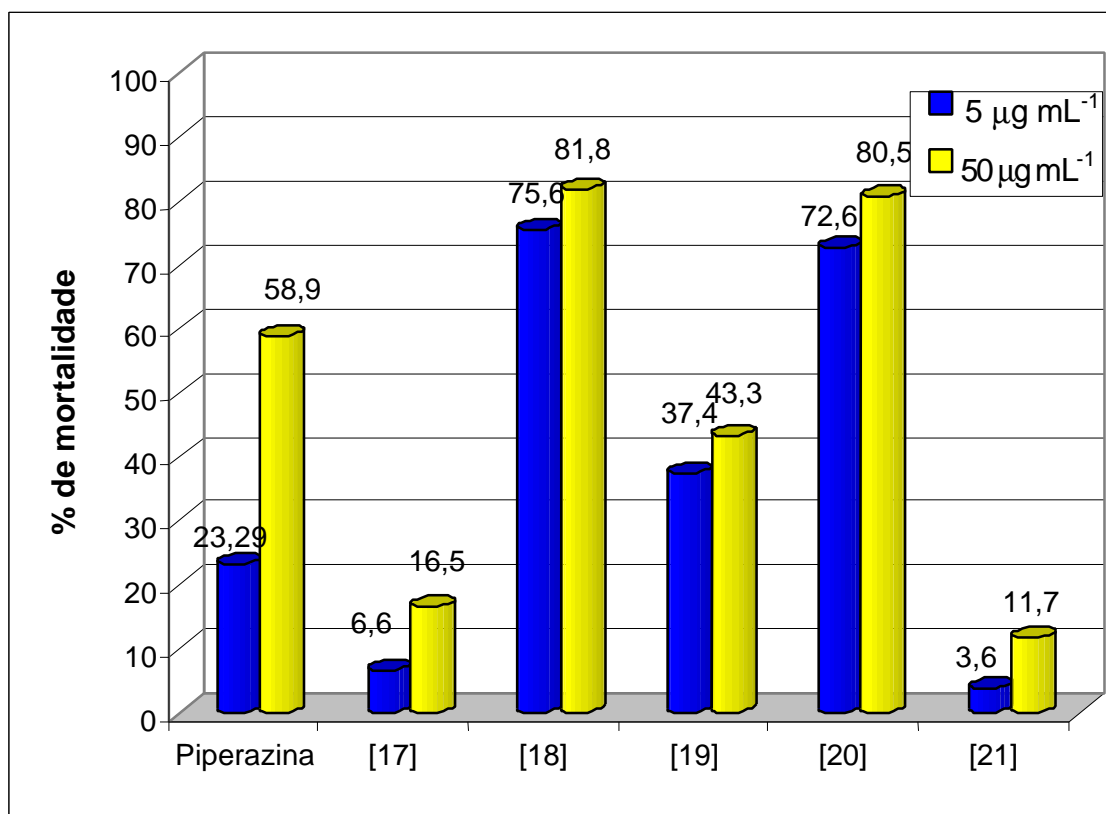


Figura 2 - Porcentagem de mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* tratados com sais de piperazina (5 e 50 µg mL⁻¹).

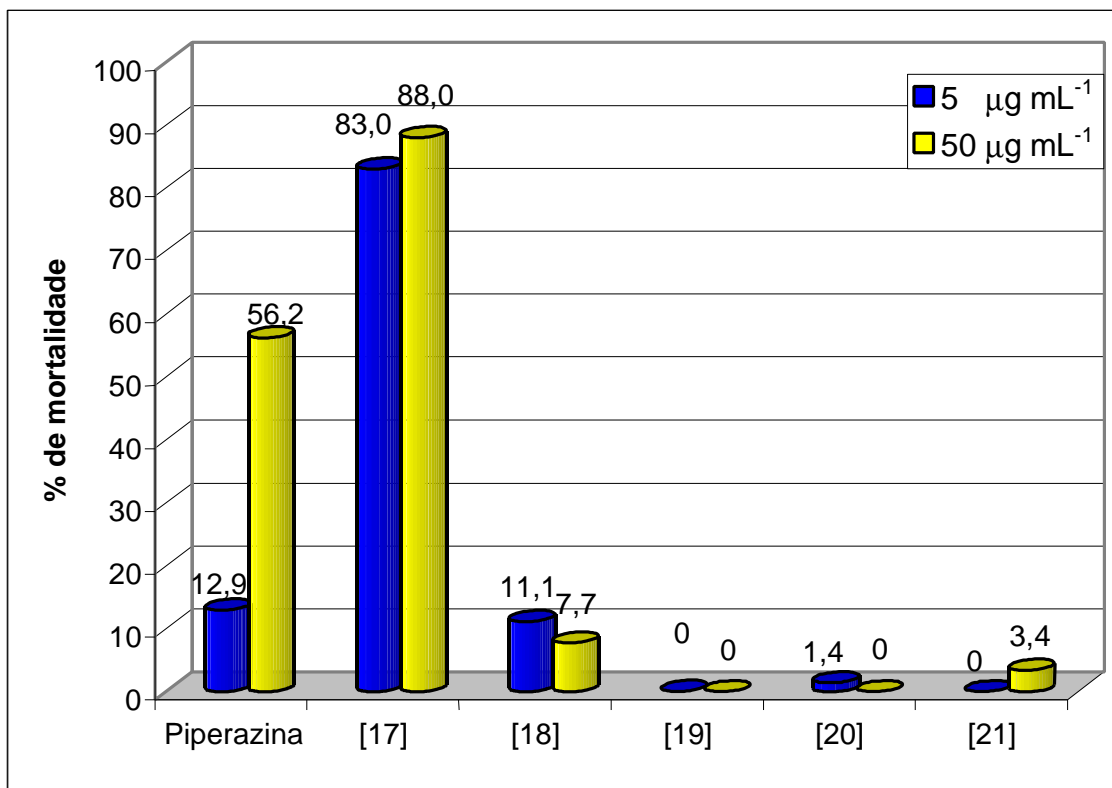


Figura 3 - Porcentagem de mortalidade de juvenis de *Heterodera glycines* tratados com sais de piperazina (5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Nos ensaios com *M. incognita* os sais de piperazina que apresentaram os melhores índices de mortalidade foram o citrato de piperazina [18] (75,6% a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 81,8% a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o oxalato de piperazina [20] (72,6 a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 80,5% a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Com *H. glycines*, o cloreto de piperazina [17] apresentou os melhores índices de mortalidade (83% de mortalidade a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 88,0% a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Observou-se que este percentual é maior quando sais contendo os ânions orgânicos citrato [18] e oxalato [20] foram testados sobre *M. incognita* e que, possivelmente, o mecanismo de ação destes compostos seja semelhante ao dos nematicidas organocarbamatos. Para *H. glycines*, o sal contendo o ânion cloreto [17] apresentou maior porcentagem de mortalidade, e o seu modo de ação pode ser semelhante à ação dos sais de piperazina sobre *A. lumbricoides*.

Essas diferenças observadas nas porcentagens de inibição de *H. glycines* e *M. incognita* pelos sais sintetizados neste trabalho reforçam a observação feita anteriormente (capítulo 2), de que os mecanismos de ação dos compostos são diferentes para as duas espécies de nematóides submetidas aos ensaios.

RESUMO E CONCLUSÕES

O timol é um monoterpênóide constituinte dos óleos essenciais de diversos tipos de plantas e que possui, além de outras, propriedades bactericida e antifúngica. Já foi testado contra fitonematóides, não havendo, porém, registro do seu uso e de seus derivados contra fitonematóides dos gêneros *Meloidogyne* e *Heterodera*.

A piperazina é um membro da família das etilenoaminas com ampla gama de atividades farmacológicas, sendo mais comumente utilizada no tratamento de oxiuríase e ascaridíase em humanos e animais domésticos.

Embora já tenha sido utilizada contra parasitas animais, pouco se sabe a respeito do uso de seus sais contra fitonematóides e da influência dos diferentes ânions que constituem estes sais sobre a atividade nematicida da piperazina.

Neste trabalho foram sintetizados os éteres 2-benziloxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [8; 35,8%], 2-etoxi-1-isopropil-4-metilbenzeno [9; 18,8%], 1-isopropil-4-metil-2-octiloxibenzeno [10; 23,6%], 1-isopropil-4-metil-2-octadeciloxibenzeno [11; 33,0%], 2-(2',3',4',5',6'-pentafluoroxibenzil)-1-isopropil-4-metilbenzeno [12; 32,0%] e 1-isopropil-4-metil-2-metoxibenzeno [13; 75,8%]. Todas as reações propostas para sínteses de éteres foram realizadas, apesar do baixo rendimento da maioria delas, em virtude da competição entre as reações de eliminação e substituição nucleofílica.

As tentativas de nitração do timol não foram bem sucedidas, por causa da oxidação do anel aromático pelos ácidos utilizados nas sínteses. Destas tentativas foi obtida uma quinona, a timoquinona [15; 2,7%].

A avaliação da atividade nematicida desses compostos e dos sais de piperazina que continham os ânions cloreto [17], citrato [18], fosfato [19], oxalato [20] e sulfato [21] foi feita utilizando o teste do tubo invertido com os nematóides *Meloidogyne incognita* raça 3 e *Heterodera glycines*, nas doses de 5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Nestes bioensaios, os índices de mortalidade para *M. incognita* variaram de 1,8 a 81,8%, com concentração de $5\mu\text{g.mL}^{-1}$, e de 5,3 a 86,7%, com concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para *H. glycines* estes índices variaram de 0 a 83%, com concentração de $5\mu\text{g mL}^{-1}$, e de 0 a 88%, com concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Observou-se a influência dos efeitos estéricos, dos tipos de ânions e da concentração sobre a atividade nematicida dos compostos quando testados sobre *M. incognita*, além da existência de diferença nos mecanismos de ação destes compostos entre as espécies *M. incognita* e *Heterodera glycines*, sugerindo que uma abordagem individualizada deva ser feita para a síntese de nematicidas que visam combater estes nematóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, P.J.M., ASMUS, G.L. Levantamento da ocorrência do nematóide do cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe) no Mato Grosso do Sul: 1994/1995. Pesquisa em Andamento. **EMBRAPA-CPAO**, p.1-3, 1995.
- ARREBOLA, M.L., NAVARRO, M.C., JIMÉNEZ, J., OCAÑA, F.A. Yield and composition of essential oil of *Thymus serpylloides* subsp. *Serpylloides*. **Phytochemistry**, v.13, n.1, p.67-72, 1994.
- AUSTGULEN, L.T., SOLHEIM, E., SCHELIN R.R. Metabolism in rats of *p*-cymene derivatives: carvacrol and thymol. **Pharmacology & Toxicology**, v.61, p.98-102, 1987.
- BAKER, K.R., HUSSEY, R.S., KRUSBERG, L.R. Plant and soil nematodes: social impacts and focus for the future. **Journal of Nematology**, v.26, n.2, p.127-137, 1994.
- BARBOSA, L.C. **Química Orgânica: uma introdução para ciências agrárias e biológicas**. Viçosa: Editora UFV, 1ª ed., 1998. 354p.
- BARCELOS, F.F. **Isolamento e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos de *Mucuna aterrima***. Viçosa, MG: UFV, 1997. 93p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) Universidade Federal de Viçosa, 1997.

- BENJILALI, B., TANTAOUI-ELARAK, A., ISMAILI ALAOI, M., AYADI, A. A method of studying the antimicrobial properties of essential oils by direct contact in agar medium. **Plantas medicinales et phytoterapie**, v.20, n.2, p.155-167, 1986.
- BHATT, V., TRIVELDI, A.C., NARULA, R.C. Review on application of piperazine. **Chemical Engineering World**. v.25, n.3, p.75-82, 1990.
- BUCHANAN, R.L., SHEPHERD, A.J. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by timol. **Journal of Food Science**. v.46, p.976-977, 1981.
- CASEY, M., LEONARD, J., LYGO, B., PROCTER, H. **Advanced practical organic chemistry**. 1^a ed., New York: Chapman & Hall, 1990. 264p.
- CASTRO, C.E., BELSER, N.O. Intoxication of *Aphelenchus avenae* by ethylene dibromide. **Nematologica**, v.24, p.37-41, 1978.
- CASTRO, J.M.C. **Influência de alguns fatores na predação de fitonematóides por um isolado de *Arthrobotrys musiformis***. Viçosa, MG: UFV, 1998. 87p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- DUKE, S.O., MENN, J.J., PLIMMER, J.R. Challenges of pest control with enhanced toxicological and environmental safety - an overview, p.1-13. In: DUKE, S.O., MENN, J.J., PLIMMER, J.R. (Eds.) **Pest control with enhanced environmental safety**. ACS symposium series 524, 1992.
- DOUONIK, B. Soybean production and diseases loss estimatives for north central United States from 1989 to 1991. **Plant Disease**, v.77, p.1170-1171, 1993.
- DWYER, C.L., HOLZAPFEL, C.W. The nitration of electron-rich aromatics. **Tetrahedron**, v.54, n.27, p.7843-7848, 1998.
- EINSENREICH, W., SAGNER, S., ZENK, M.H., BACHER, A. Monoterpenoid essential oils are not mevalonoid origin. **Tetrahedron Letters**, v.38, n.22, p.3889-3892, 1997.

- ELLIS, M.D., BAXENDALE, F.P. Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) and their honey bee (Hymenoptera: Apidae) hosts when applied as fumigants. **Journal of Economic Entomology**, v.90, n.5, p.1087-1091, 1997.
- FENAROLI, G. **Fenaroli's handbook of flavor ingredients**, v.2. In: FURIA, T.E., Bellanca, N. (Eds.), Cleveland: CRC Press, 1975. p.83 e p.536.
- FRANCO, J.F. Controle químico de fitonematóides. **Inf. Agropec.**, v.16, n.172, p.1-2/78-84, 1992.
- HITOKO, H., MOROZUMI, S., WAUKE, S., SAKAY, S., DURATA, H. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigeni fungi. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.39, p.818-823, 1980.
- KANDIL, O., RADWAN, N.M., HASSAN, A.B., AMER, A.M.M., EL-BANNA, H.A., AMER, W.M.M. Extracts and fractions of *thymus capitatus* exhibit antimicrobial activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.44, p.19-24, 1994.
- KARPOUHTSIS, I., PARDALI, E., FEGGOU, E., KOKKINI, S., SCOURAS, Z., MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. **J. Agric. Food Chem.**, v.46, p.1111-1115, 1998.
- KIMURA, Y., MORI, M., HYEON, S., SUZUKI, A., MITSUI, Y. A rapid and simple method for assay of nematicidal activity and its application to measuring the activities of dicarboxylic esters. **Agric. Biol. Chem.**, v.45, p.249-252, 1981.
- KOCIENSKI, P.J. **Protecting groups**, New York: Thieme. 1994. 279p.
- KOKKINI, S., KAROUSOU, R., DARDIOTI, A., KRIGAS, N., LANARAS, T. Autumn essential oils of greek oregano. **Phytochemistry**, v.44, n.5, p.883-886, 1997.
- LONGUE, M. **Síntese e caracterização de compostos do tipo 1-acil e 1,4-diacilpiperazina com potencial atividade nematicida**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 91p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) Universidade Federal de Viçosa, 1998.

- LIU, X.Z., SUN, M.H., GUO, R.J., ZHANG, X.D., XIE, Y.Q., QIU, W.F. History and status of soybean cyst nematoid in china. **Nematological Abstract**, v.65, n.3, 1996.
- LUC, M., SIKORA, R.A., BRIDGE, J. **Plant nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Oxford: CAB International of Parasitology, 1990. 629p
- MAAS, P.W.Th. Physical methods and quarantine. In: BROWN, R.H., KERRY, B.R. (Eds.), **Principles and practice of nematode control in crops**. Sidney: Academic, 1987. p.265-288.
- MARTINS, J.F., CASTRO, P. Acaricidas e nematicidas: o fim dos inimigos invisíveis. **A Granja**, n.586, p.23-27. 1997.
- MERCK INDEX, In: BUDAVARI, S. (Ed.), New Jersey: Merck & Co., Inc., 1996, 1741p.
- MONTES-BELMONT, R., CARVAJAL, M. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. **Journal of Food Protection**, v.61, n.5, p.616-619, 1998.
- MÜLLER-RIEBAU, F.J., BERGER, B.M., YEGEN, O., CAKIR, C. Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in turkey. **J. Agric. Food Chem.**, v.45, p.4821-4825, 1997.
- NOEL, G.R., MAYASICH, S.O. Partial caracterizacion of soluble estearase from *Heterodera glycines* and inhibition by aldicarb and phenamiphos. **Comp Biochem. Physiol.**, v. 99, n.3, p.537-540, 1991.
- PREETSCH, E., CLERC, T., SEIBL, J., SIMON, W. **Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos**. Madri: Editora Alhambra Longman S.A., 1996.
- REGNAULT-ROGER, C., HAMRAOUI, A., HOLEMAN, M., THERON, E., PINEL, R. Inseticidal effect of essential oils from mediterranean plants upon *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera, Bruchidae), a pest of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L). **Journal of Chemical Ecology**, v.19, n.6, p.788-793, 1993.

- REDDY, M.V., ANGERS, P., GOSSELIN, A., ARUL, J. Characterization and use of essential oil from *Thimus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. **Phytochemistry**, v.47, n.8, p.1515-1520, 1998.
- ROBBINS, B.H. Quantitative studies on absorption and excretion of certain resorcinols and cresols in dogs and man. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v.52, p.54-60, 1934.
- SANTOS, M.A., FERRAZ, S., MUCHOVEJ, J.J. Detection and ecology of nematophagous fungi from brazilian soils. **Nematologia Brasileira**, v.15, n.2, p.121-134, 1991.
- SASANELLI, N. Importanza economica di nematodi fitoparassiti e valutazione delle perdite di produzione. **Supp. Nematol. Medit.**, v.23, p.5-13, 1995.
- SASSER, J.N., FREECKEMAN, D.W. A world perspective on nematology: the role of society. In: WECH, J.A., DICKSON, D.W. (Eds.), **Vistas on nematology**. Florida: E.O. Painter Printing Co., 1987. p.7-14.
- SILVA, J.F.V., GARCIA, A., SILVA, E.A., DIAS, V.P. Situação atual do nematóide do cisto da soja (ncs) no Brasil. **XX Congresso Brasileiro de Nematologia**. Gramado, RS. 1997. Resumos.
- SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 5^a ed., São Paulo: Guanabara-Koogan, 1996. 387p.
- SCIUMBATO, G.L. Soybean disease loss estimates for the southern United States during 1988-1991. **Plant Disease**, v.77, p.1170-1171, 1993.
- SCIVOLETTO, R. Drogas adrenérgicas, bloqueadores de neurônios adrenérgicos, bloqueadores de receptores adrenérgicos. In: CORBETT, C.E. **Farmacodinâmica**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1982. p.64-103.
- SHETTY, K., CARPENTER, T.L., KWOK, D., CURTIS, O.F., POTTER, T.L. Selection of high phenolics-containing clones of thyme (*Thymus vulgaris* L.) using *Pseudomonas sp.* **J. Agric. Food Chem.**, v.44, p.3408-3411, 1996.

- SOLER, A., RODRÍGUES-KABANA, R., MORGAN-JONES, G., McINROY, J.A. Effects of thymol, a naturally occurring nematicide on soil microflora. **Phytopathology**, v.2, p.486-490, 1996.
- SOLOMONS, T.W.G. **Organic Chemistry**. 5^a ed., New York: Jonh Wiley & Sons, 1996. 419p.
- STIRLING, G.R. **Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects**. Wallingford: CAB International, 1991. 282p.
- TSAI, B.Y., WEST, J., VAN GUNDY, S.D. Screening plants for nematicidal agents. In: KUBU, I., JACOBSON, M. (Eds.), **Phytochemical pesticides**. Oxford: CRC Press, 1991. v.11, p.1-26.
- VAN GUNDY, S.D., McKENRY, M.V. Action of nematicides. In: HORSFAL, J.G., COWLING, E.B. (Eds.). **Plant Disease**. New York: Academic Press, 1977. v.1, cap.14.
- VOGEL, A.I. **Química orgânica - análise orgânica qualitativa**, v.2, Rio de Janeiro: Ed. Ao Livro Técnico S.A., 1971. 1074p.
- WAQUIN, J.S. A problemática dos fitonematóides para o mercosul, **XX Congresso Brasileiro de Nematologia**. Gramado, RS. 1997. Resumos. p.19.
- WILLIAMS, R.T. **Detoxication mechanisms**, 2^a ed., London: Chapman and Hall, 1959, p.300-301.
- YEGEN, O., BERGER, B., HEITEFUSS, R. Untersuchungen zur fungitoxischen Wirkung der Extrakte sechs ausgewählter Pflanzen aus der Türkei auf phytopathogene Pilze (Investigations on the fungitoxicity of extracts of six selected plants from Turkey against phytopathogenic fungi). **Z. Pflanzenkrankh**, v.99, p.349-359, 1992.
- ZANINI, A.C., OGA, S. **Introdução à farmacologia**. 4^a ed., São Paulo: Atheneu Editora, 1989. 769p.