

JOELMA LIMA VIDAL ESTRELA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE AMIDAS
ANÁLOGAS À PIPERINA EM LARVAS DE *Spodoptera frugiperda*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

JOELMA LIMA VIDAL ESTRELA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE AMIDAS
ANALÓGAS À PIPERINA EM LARVAS DE *Spodoptera frugiperda*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

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

APROVADA: 30 de março de 2001.

Prof^a Célia Regina Alvares Maltha
(Conselheiro)

Prof. José Eduardo Serrão
(Conselheiro)

Dr. Murilo Fazolin

Prof^a Terezinha Maria. C. Della Lucia

Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes
(Orientador)

Aprendi a transformar o medo em respeito, o respeito em confiança. Descobri como é bom chegar quando se tem paciência para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.

Amyr Klink

Ao meu esposo, Murilo.

Aos meus pais, Neir e Expedito.

Dedico.

Aos cientistas e aos brasileiros,

Ofereço.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, a Deus, pois: “O senhor é o meu pastor e nada me faltará. Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente às águas tranqüilas. Refrigera a minha alma; guia-me pelos veredos da justiça, por amor do seu nome.” (Salmo 23).

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao mestre e orientador, professor Raul Narciso Carvalho Guedes, pela amizade, pelos ensinamentos, pelo estímulo e pelas críticas e sugestões apresentadas na elaboração deste trabalho.

Aos meus conselheiros, professora Célia e professor Serrão, pela valiosa colaboração.

Aos professores que me acompanharam e me incentivaram e que foram os responsáveis pela minha formação e pelos valiosos conhecimentos adquiridos.

Aos colegas do curso, pela grande amizade e pelo companheirismo, em especial os do Laboratório de Toxicologia, pelo apoio nas avaliações.

Ao professor Eraldo, pelo fornecimento dos ovos da *S. frugiperda*, e ao Sr. Manoel e Tomé (Insetário), pela ajuda durante o desenvolvimento do experimento.

À minha amiga Célia Lopes, em especial, pela amizade, pelo carinho, pelo convívio e pelo companheirismo durante a minha estada em Viçosa.

Aos amigos, Berghem, Badji, Daniel, Mireille, Fátima, Conceição, Raimundo, Renato, Leonardo, Eugênio, Edmar e Pedro, pela amizade e pelo convívio durante este período em Viçosa.

Aos meus pais, Neir Lima Vidal e Expedito de Souza Vidal.

Ao meu esposo, Murilo Fazolin, que esteve presente em toda a minha caminhada, mesmo que distante, obrigada pelo apoio, pela atenção, pela amizade, pela compreensão, pelo amor e pelo carinho durante todos esses anos.

Ao meu amigo João Estrela, pela amizade, pelo carinho e pelo apoio durante grande parte de minha formação escolar.

À Embrapa-Acre, pelo incentivo e pela valiosa colaboração.

Aos funcionários do Setor de Entomologia Agrícola da UFV, Ana Paula, Francisco e José Evaristo, pela amizade, pela acolhida e pela atenção.

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

Aos componentes da banca de tese, pela cordialidade em aceitar o convite e pela forma como participaram.

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

BIOGRAFIA

JOELMA LIMA VIDAL ESTRELA, filha de Expedito de Souza Vidal e Neir Lima Vidal, nasceu em Brasiléia-AC, em 3 de junho de 1969. Cursou o 1º e o 2º graus em Rio Branco-AC.

No período de 1991 a 1997, cursou Agronomia na Universidade Federal do Acre (UFAC). Iniciou seus trabalhos na área de Entomologia no ano de 1995, na área de Manejo Integrado de Pragas, como estagiária da Embrapa-Acre.

De julho de 1997 a fevereiro de 1999, foi bolsista do CNPq/RHAE, desenvolvendo pesquisa na área de controle alternativo de pragas.

Em abril de 1999, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Entomologia (nível de Mestrado) na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, sob a orientação do professor Raul Narciso Carvalho Guedes, defendendo tese em 30 de abril de 2001.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
2.1. Preparo e seleção das amidas testadas.....	7
2.1.1. Preparo das amidas.....	9
2.1.2. Seleção das amidas.....	10
2.2. Avaliação, a longo prazo, da atividade biológica das amidas selecionadas.....	12
3. RESULTADOS	14
4. DISCUSSÃO.....	28
5. CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

RESUMO

ESTRELA, Joelma Lima Vidal, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2001. **Avaliação da atividade inseticida de amidas análogas à piperina em larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**
Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Conselheiros: Célia Regina Alvares Maltha e José Eduardo Serrão.

Foram conduzidos testes para avaliar a atividade inseticida de amidas sintéticas análogas à piperina, utilizando a espécie *Spodoptera frugiperda* como inseto-modelo para estes estudos. A criação de *S. frugiperda* foi mantida à base de dieta artificial. Inicialmente foram realizados bioensaios que consistiram na aplicação tópica de 0,5 µL das seguintes amidas, pertencentes a dois grupos diferentes: 1) N-alkil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-(E)-prop-2-enamidas, que são as amidas: N-isopropil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-(E)-prop-2-enamida [1], N-isopentil-3(3,4-etilenodioxifenil)-(E)-prop-2-enamida [2], N-hexil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-(E)-prop-2-enamida [3], N-pentil-3-(3,4-metiledioxifenil)-(E)-prop-2-enamida [4] e N-dodecil-3(3,4-metilenodioxifenil)-(E)-prop-2-enamida [5]; e 2) N-alkil-(3,4-metilenodioxifenil)-amidas, que são as amidas N-isopropil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [6], N-isopentil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [7], N-hexil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [8], N-butil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [9], N-etil-(3,4-metilenodioxifenil)

amida [10] e N-pentil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [11]; além do butóxido de piperonila, com ampla faixa de concentrações de cada amida em larvas de 3^o instar para obtenção de faixas de respostas, que serviram de referencial na preparação dos bioensaios definitivos de dose-resposta. Após esses, um segundo bioensaio foi então realizado, a fim de verificar o efeito de doses mais baixas dos compostos mais promissores ao longo do desenvolvimento do inseto, avaliando os seguintes parâmetros: mortalidade larval (corrigida para a testemunha), ganho de peso em função do tempo, sobrevivência durante o período larval, duração do período larval e dieta assimilada (diferença entre a dieta consumida e fezes). A metodologia de aplicação foi a mesma descrita anteriormente, utilizando acetona como solvente e depositando 0,5 µL das amidas N-isopropil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida [6], N-isopentil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida [7] e N-hexil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida [8] e do butóxido de piperonila, aplicadas nas seguintes concentrações sobre os insetos, 5,0, 1,0, 0,5, 0,1 e 0,05 mg/mL, correspondentes às doses 1.344,0, 268,8, 134,4, 26,88 e 13,44 ppm, respectivamente. As amidas [6], [7] e [8], sintetizadas e avaliadas pelos ensaios de aplicação tópica, apresentaram efeito inseticida para a espécie *S. frugiperda*. O butóxido de piperonila apresentou baixa toxicidade, além de não comprometer significativamente a sobrevivência larval nas doses utilizadas, ao contrário do que foi observado para as outras amidas. Além da mortalidade das larvas, foram observadas também, quando aplicada a dose de 268,8 ppm, anomalias morfológicas, além de prolongamento dos instares de *S. frugiperda*. Em relação ao ganho de peso dos insetos expostos às três amidas e ao butóxido de piperonila, foram constatadas diferenças significativas entre os tratamentos. Os resultados dos testes com dieta assimilada apresentaram diferenças significativas com base nas superposições das barras de erro-padrão, sendo a amida [6] a que apresentou o menor valor do assimilado nas doses de 26,88 e 134,4 ppm e a amida [7], a que apresentou o menor valor do assimilado em relação às outras, na dose de 1.344,0 ppm.

ABSTRACT

ESTRELA, Joelma L. Vidal, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2001. **Evaluation of the insecticidal activity of piperine analog amides in larvae of *Spodoptera frugiperda*.** Adviser: Raul Narciso Carvalho Guedes. Committee Members: Célia Regina Alvares Maltha and José Eduardo Serrão.

Tests were carried out to assess the insecticide activity of synthetic amides derived from piperine using the species *Spodoptera frugiperda* as insect model for these studies. *S. frugiperda* was mass reared in laboratory conditions using an artificial diet. At first, bioassays were carried out with topical application of 0.5 µL of each insecticide solution in 3rd instar larvae. We used a broad range of concentrations to be used for establishing dose-response bioassays. After these, a second bioassay was carried out to assess the subtle effects of the most promising insecticide compounds. The following parameters were evaluated in this study final larval mortality (corrected for the control), weight gain, survival during the larval period, duration the larval period and absorbed diet. The insecticides were also topically applied in this second experiment, as previously described, using acetone as solvent and the following concentrations of N-isopentyl-(3,4-methylenedioxyphenyl)-amide, N-isopropyl-(3,4-methylenedioxyphenyl)-amide, N-hexyl-(3,4-methylenedi-

oxiphenyl))-amide, besides piperonyl butoxide: 5.0, 1.0, 0.5, 0.1, and 0.05 mg/mL. These four were most toxic amides towards *S. frugiperda* observed in the first experiment. Among them, piperonyl butoxide was the less toxic compound while the others showed similar and lighter toxicity to this insect species. The toxic effect of these compounds followed the same trend observed for acute toxicity with piperonyl butoxide showing lower larval toxicity than the other three amides which resemble each other and showed greater insecticide effect. There were significant differences in weight gain when the different insecticides were used, but this does not seem to be related with their acute and sublethal. There was difference in absorbed diet per insect exposed to each compound, with piperonyl butoxide showing higher values and a peak of diet absorption seem to occur when insects are exposed to doses 26.88 and 134.4 ppm, showing lower in the dose de 1,344.0 ppm.

1. INTRODUÇÃO

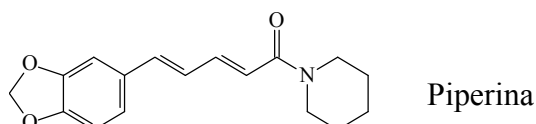
Diante das perdas de produção provocadas pelo ataque dos insetos, o produtor agrícola se depara com a necessidade de recorrer a diversos métodos de controle, como o controle por comportamento e os controles biológico, genético, cultural e químico. Este último, que se realiza mediante a aplicação dos inseticidas convencionais e específicos, é o que tem estabelecido maiores vantagens, em virtude de sua eficiência, seu baixo custo e sua facilidade de uso em relação aos demais (SODERLUND, 1995). Todavia, a contínua utilização do controle químico com praguicidas não-seletivos, sem a rotação de produtos, pode causar desequilíbrios, como a eliminação de insetos benéficos, as explosões populacionais da praga e, principalmente, a perda de eficácia de inseticidas mediante a seleção de populações resistentes a estes compostos químicos (MERVILLE, 1959; GRAVENA, 1984; KAY e COLLINS, 1987; CAMPANHOLA, 1990; GUEDES, 1999; GUEDES e FRAGOSO, 1999).

Os inseticidas podem ser produzidos a partir de um protótipo natural, como os piretróides sintéticos que foram introduzidos no mercado a partir da década de 70. Estes são análogos das piretrinas, encontradas no piretro, pó obtido de flores de algumas espécies do gênero *Chrysanthemum*

(*C. cinerariaefolium* e *C. coccineum*) (HIRATA,1995).

Mais recentemente, têm-se buscado novos compostos com ação inseticida que possuam características desejáveis. Os inseticidas botânicos são uma fonte promissora desses compostos. Muitos autores têm estudado a atividade de diversas plantas, como *Calceolaria andina*, *Persea americana*, *Rhododendron molle*, *Zanthoxylum kauanense*, *Z. dipetalum* e *Z. hawaiiense*, *Thujopsis dolabrata*, *Aglaia odorata*, *Azadiracta indica* e *Piper nigrum* (KLOCKE et al., 1991; MARR e TANG, 1992; WRBA et al., 1992; HU et al., 1993; JANPRASERT et al., 1993; AHN et al., 1998; OBERLIES et al., 1998; KHAMBAY et al., 1999). Alguns compostos de plantas são bem conhecidos, já existindo no mercado mundial suas formulações comerciais (YOSHIDA e TOSCANO 1994; HARE e MORSE 1997; ZANG et al., 1997).

Inseticidas naturais são também encontrados nas plantas das famílias Compositae e Rutaceae, que juntamente com as piperáceas constituem uma fonte de isobutilamidas insaturadas de cadeia longa, com propriedades inseticidas (STRUNZ e FINLAY, 1994). A piperina foi a primeira amida a ser isolada dos frutos das espécies de *Piper* (PARMAR et al., 1997).



A amida piperina, extraída da espécie *Piper nigrum* L., teve sua ação inseticida comprovada em 1924 (SU, 1977). O principal constituinte da pimenta-do-reino é um alcalóide, que demonstrou ser mais tóxico para a *Musca domestica* do que a toxicidade manifestada pelas piretrinas (SYNERHOLM et al., 1945; MIYAKADO et al., 1989). Estes extratos também são altamente tóxicos para o bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Coleóptera : Curculionidae); o caruncho-do-arroz, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera : Curculionidae); e caruncho-do-feijão, *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera : Bruchidae), além de serem repelentes para adultos da lagarta-da-

espiga do milho, *Helicoverpa zea* (Lepidoptera : Heliiothidae) (SU, 1977; SCOTT e MCKIBBEN, 1978). Mostraram-se tóxicos também para o gorgulho-do-feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera Bruchidae) (SU e HORWART, 1981), para o mosquito *Culex pipiens pallens* (Diptera : Culicidae) e para o gorgulho-do-feijão-de-corda (“adzuki”), *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera : Bruchidae).

Plantas da família Piperaceae, encontradas particularmente em regiões tropicais com vegetação herbácea (ATAL et al., 1975; SCHUTES e RAFFAUFF, 1990), são utilizadas como inseticidas. *Piper rotundistipulum* é usada na Amazônia, por sua toxicidade a peixes e a diversas pragas (SCHUTES e RAFFAUFF, 1990). Extratos de *P. guinense* e *P. nigrum*, usados na África do Sul, são molusquicidas e inseticidas (SU e HORWAT, 1981; IVBIJARO e BOLAJI, 1990). As espécies *P. longum*, *P. betle*, *P. peepuloides* e *P. cubeba*, que são plantas indianas, tiveram sua atividade inseticida demonstrada contra mosquitos e pernilongos (SRIVASTAVA, 1970; MIYAKADO et al., 1989), bem como repelência a pragas de grãos armazenados (KOKATE et al., 1980).

BERNARD et al. (1995) testaram 14 espécies de plantas da família Piperaceae, utilizando os mosquitos *Aedes atropalpus* (Diptera: Culicidae) e *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) para monitorar a toxicidade e o isolamento dos compostos das plantas. Três das espécies testadas apresentaram mortalidade ao mosquito: *P. aduncum*, *P. decurrens* e *P. tuberculatum*, tendo o dilapiol sido o composto de maior atividade do *P. aduncum*, ocasionando 92% de mortalidade ao mosquito quando utilizado à dose de 0,1 ppm. As larvas de *O. nubilalis* foram alimentadas com dieta artificial, contendo extrato de plantas de *P. aduncum*, *P. tuberculatum* e *P. guinense*. Dihidropiperlonguminine, um composto isolado da *P. tuberculatum*, e o conorpan, isolado de *P. decurrens*, também apresentaram mortalidade de 47% a *O. nubilalis*.

HARVILL et al. (1943) relataram que a piperina é o principal alcalóide desta planta, sendo muito tóxico para a *Musca domestica*.

Testes de laboratório com *P. nigrum*, *Azadiractha indica* e *Nigela sativa*, utilizando ovos e adultos do besouro *Callosobruchus chinensis*, mostraram a eficiência de extratos dessas plantas na redução do número de ovos e adultos emergidos (KUMARI e SINGH, 1998).

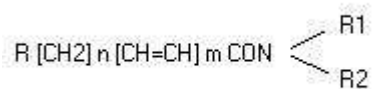
FERNANDES et al. (1996) observaram altos níveis de deterrência alimentar em *Anthonomus grandis* (Coleoptera : Curculionidae), utilizando extratos etanólicos de *Piper nigrum* (100%), *Melia azadirachta* e *Crocus sativus* (87%). A mortalidade dos adultos de *Anthonomus grandis* foi de 27% após 48 horas da aplicação do extrato de *P. nigrum*; o extrato de *C. sativus* resultou em 13% de mortalidade. Segundo PARMAR et al. (1997), em estudos realizados com seis amidas isoladas de *Piper guineense* verificou-se atividade fagoalimentar para larvas de quinto instar de *Chilo partellus* (Lepidoptera : Pyralidae). Piperina e (α,β)-diidropiperina foram as mais ativas; wisanina e (α,β)-dihidrowisanina e tricostaquina (= piperina) apresentaram atividades intermediárias e (2*E*,4*E*)-N-isobutilícosa-2,4-dienamida foi a menos ativa. Neste caso, a presença de um grupo metilenodioxifenil e de um grupo amida acíclico parece fundamental para a alta atividade fago-inibidora. Foi verificado também nesta amida o sinergismo a piretrinas (MIYAKADO et al., 1989). Os sinergistas são definidos como substâncias que, em doses subletais, aumentam a letalidade de inseticidas (BERNARD e PHILOGENE, 1993). O butóxido de piperonila é um sinergista comercial que também possui o grupo metilenodioxifenil em sua estrutura química.

DEVINE et al. (1998), em teste de campo realizado em Israel, com butóxido de piperonila em mistura com o inseticida buprofezin, nas concentrações de 2.000 e 5.000 ppm do butóxido, relataram ser este um sinergista bastante eficiente no controle de ninfas de *Bemisia tabaci* (Homoptera : Aleyrodidae). Doses semanais destas concentrações mostraram-se mais eficientes no controle dessa praga do que o óleo utilizado para tal finalidade.

Apesar do conhecimento da ação inseticida da piperina e de seus

análogos, pouco ainda se conhece sobre o modo de ação destas amidas no organismo dos insetos. Diante da necessidade de uma melhor compreensão e na tentativa de esclarecer os requerimentos estruturais para atividade inseticida dessas amidas, alguns trabalhos de síntese e avaliação da atividade inseticida foram desenvolvidos, utilizando as amidas N-isopropil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-(E)-prop-2-enamida, N-isobutil-3(3,4-metilenodioxifenil)-(E)-prop-2-enamida, N-isopentil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-(E)-prop-2-enamida, N-hexil-3-(3,4-metiledioxifenil)-(E)-prop-2-enamida, N-isobutil-3(3,4-metilenodioxifenil)-(E)-prop-2-enamida, N-isopropil-(3,4-metilenodioxifenil) amida, N-isobutil-(3,4-metilenodioxifenil) amida, N-isopentil-(3,4-metilenodioxifenil) amida e hexil-(3,4-metilenodioxifenil) amida nas seguintes espécies de insetos: *Ascia monuste* (Lepidoptera : Pieridae), *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera : Bruchidae), *Brevicoryne brassicae* (Homoptera : Aphidade), *Spodoptera exigua* (Lepidoptera : Noctuidae), *Sitophilus zeamais* (Coleoptera : Curculionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera : Tenebrionidae), *Musca domestica* (Diptera : Muscidae) e *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Plutellidae) (SOUZA NETA, 1999; PAULA et al., 2000).

Já foram isoladas aproximadamente 145 amidas de plantas da família piperaceae (PARMAR et al., 1997). Essas amidas possuem estruturas do tipo apresentado a seguir:



A atividade inseticida foi registrada para 28 dessas amidas, a maioria isobutilamidas, mas algumas derivadas das pepiridilamidas, como a piperina, contendo sistemas 2-eno ou 2,4-dieno, podem apresentar, ou não, insaturações adicionais (ELLIOTT et al., 1987).

Diante dessas informações, abre-se a perspectiva de avaliar a atividade inseticida de algumas amidas sintéticas, em ensaios de aplicação tópica, utilizando a espécie *Spodoptera frugiperda*. Optou-se por esta espécie pelo

fato de ela ser a praga de maior importância da cultura do milho no Brasil, ocasionando perdas relativamente elevadas para a cultura (CRUZ, 1997), e por apresentar ainda facilidade de criação em meio artificial, possibilitando a esterilização da dieta, o que evita a contaminação por outros microrganismos e permite que doses exatas do agente de controle sejam aplicadas sobre uma larva (SINGH, 1984). Diante disto, e devido a necessidade de uma melhor compreensão da relação estrutura química-atividade biológica das amidas análogas à piperina, o presente trabalho foi conduzido com lagartas de *S. frugiperda* como organismo-modelo, que foram expostas às amidas N-isopropil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-(2*E*)-propenamida [1], N-isopentil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-(2*E*)-propenamida [2], N-hexil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-(2*E*)-propenamida [3], N-pentil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-(2*E*)-propenamida [4] e N-dodecil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-(2*E*)-propenamida [5] e às N-alkil-(3,4-metilenodioxifenil)-amidas, que são as amidas N-isopropil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida [6], N-isopentil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida [7], N-hexil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-amida [8], N-butil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida [9], N-etil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida [10] e N-pentil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida [11], e também ao butóxido de piperonila.

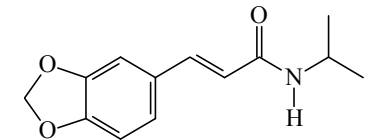
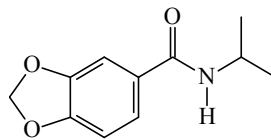
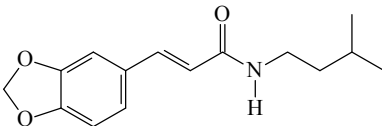
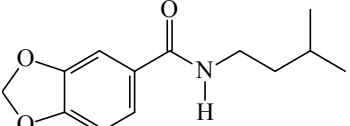
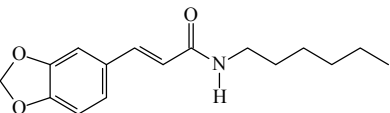
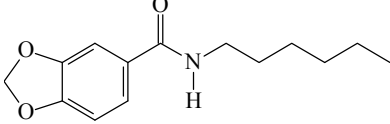
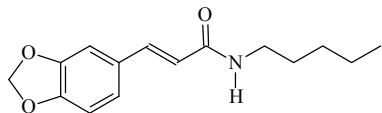
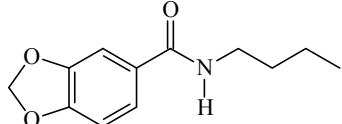
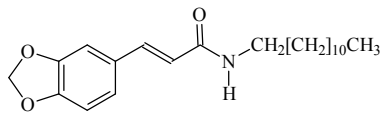
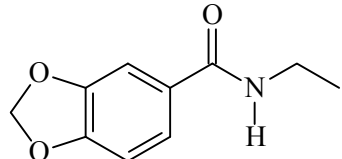
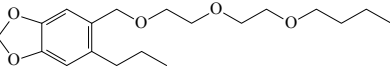
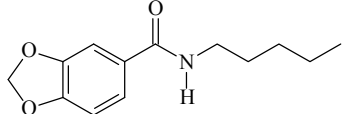
2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo e seleção das amidas testadas

Inicialmente, foram realizados testes preliminares para selecionar as amidas que apresentassem potencial inseticida sobre lagartas de *S. frugiperda*. Para isto, foram utilizados 11 tipos diferentes de amidas, pertencentes a duas séries distintas: 1) N-alkil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-(E)-prop-2-enamidas, que são as amidas: N-isopropil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-(E)-prop-2-enamida [1], N-isopentil-3-(3,4-etenodioxifenil)-(E)-prop-2-enamida [2], N-hexil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-(E)-prop-2-enamida [3], N-pentil-3-(3,4-metiledioxifenil)-(E)-prop-2-enamida [4] e N-dodecil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-(E)-prop-2-enamida [5]; e 2) N-alkil-(3,4-metilenodioxifenil)-amidas, que são as amidas N-isopropil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [6], N-isopentil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [7], N-hexil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [8], N-butil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [9], N-etil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [10] e N-pentil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [11], além do butóxido de piperonila. As estruturas químicas utilizadas nos ensaios tópicos de curta duração (24 horas) encontram-se no Quadro 1.

Quadro 1 - Substâncias utilizadas nos ensaios de aplicação tópica em *Spodoptera frugiperda*

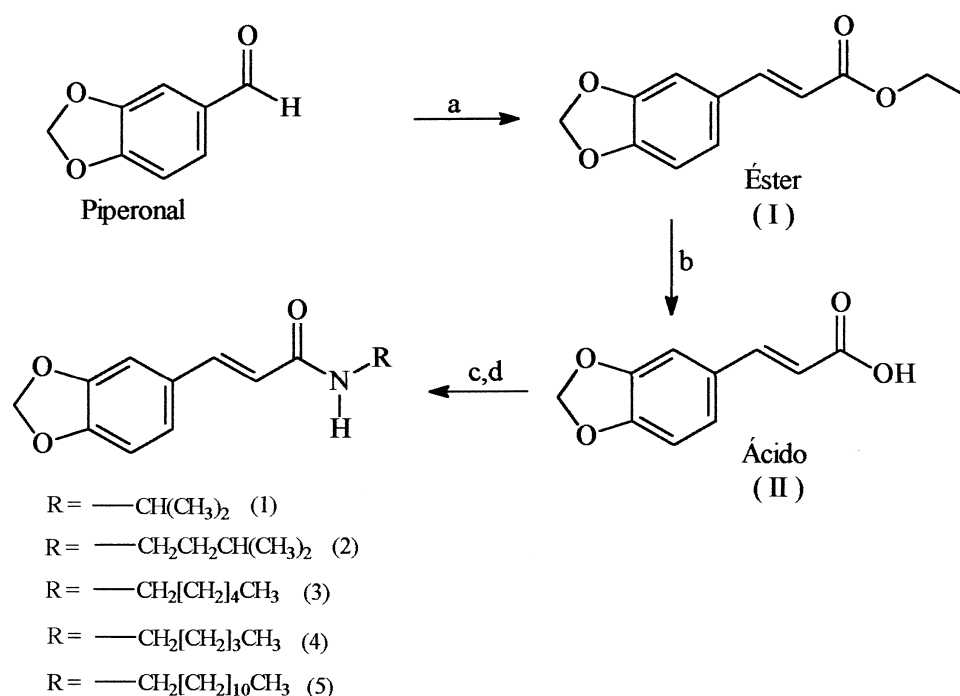
N-alquil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-(E)-prop-2-enamidas N-alquil-(3,4-metilenodioxifenil)-amidas

Substâncias	Código	Substâncias	Código
	[1]		[6]
	[2]		[7]
	[3]		[8]
	[4]		[9]
	[5]		[10]
	butóxido de piperonila		[11]

2.1.1. Preparo das amidas

As amidas utilizadas foram sintetizadas no Laboratório de Síntese de Agroquímicos do Departamento de Química da UFV, utilizando duas metodologias distintas.

Para o preparo das amidas N-alkil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-(*E*)prop-2-enamidas (amidas 1, 2, 3, 4 e 5) foi feita inicialmente a reação de Wittig-Horner, uma metodologia de grande aplicação para a formação de ligação dupla carbono-carbono a partir de aldeídos (SOLOMONS, 1996), conforme esquema abaixo.



a) *tert*-BuOK, THF, (C₂H₅O)₂P(O)CH₂CO₂C₂H₅, 61%; b) i- LiOH, acetona, 60°C, ii-H⁺;82%; c) (COCl)₂, THF, 25°C, 6H; d) amina, THF, 60°C, 1,5H

O éster (I) foi tratado com solução de hidróxido de lítio para fornecer o ácido correspondente (II). Uma vez obtido o ácido, partiu-se para a síntese das amidas.

A um balão de fundo redondo (50 mL) foram adicionados 200 mg do ácido (II) (1,04 mmol), 10 mL de THF seco e 0,4 mL de cloreto de oxalila (4,6 mmol). Em seguida, adaptou-se ao balão um tubo contendo cloreto de cálcio. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente

durante seis horas. Após este tempo, o THF e o excesso de cloreto de oxalila foram removidos em evaporador rotatório, tomando-se o cuidado para que a temperatura do banho não ultrapassasse 60 °C. Ao resíduo alaranjado obtido adicionaram-se 10 mL de THF seco e a amina (2,00 mmol). Esta mistura foi submetida a aquecimento, em banho de glicerina a 60 °C por uma hora e meia.

O material bruto de reação foi concentrado em evaporador rotatório e o resíduo obtido foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel, para a purificação das amidas obtidas.

As quantidades das aminas utilizadas para o preparo das amidas (1), (2), (3), (4) e (5) e os respectivos rendimentos estão apresentados no Quadro 2.

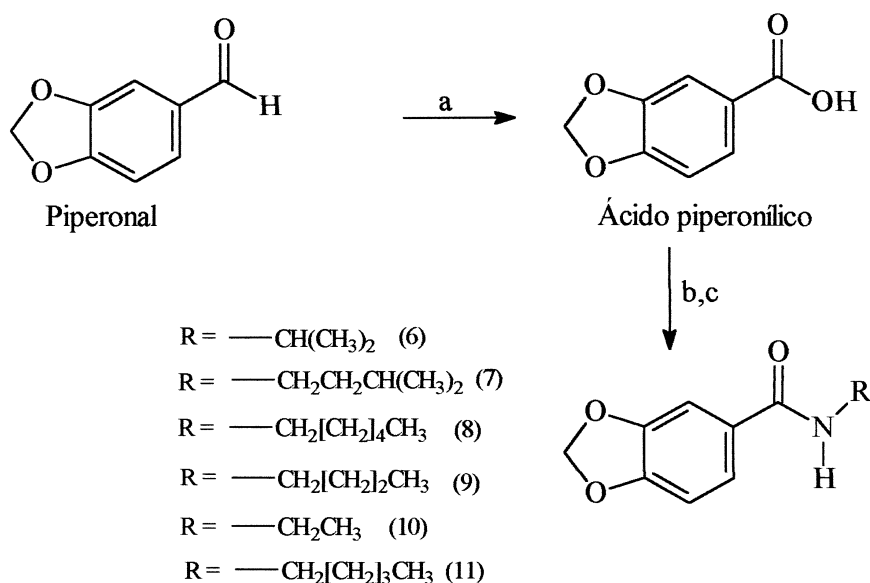
Quadro 2 - Condições gerais para o preparo das amidas (1), (2), (3), (4) e (5) e seus rendimentos

Amida	Massa da Amina/g	Quantidade da Amina/mmol	Solvente para Fracionamento	Rendimento (%)
(1)	0,118	2,0	H/E 1:2	74
(2)	0,174	2,0	H/E 1:2	54
(3)	0,202	2,0	H/E 1:1	42
(4)	0,174	2,0	H/E 1:1	56
(5)	0,370	2,0	H/E 1:1	62

H: hexano.

E: éter dietílico.

Para o preparo das N-alkil-(3,4-metilenodioxifenil)-amidas foi feita inicialmente a reação de oxidação do piperonal para obtenção do ácido piperonílico, conforme esquema a seguir.



a) i- NaOH, AgNO₃, ii- H⁺; 82%; b) (COCl)₂, THF, 25 °C, 6h; d) amina, THF, 60 °C, 1,5h

A reação para obtenção das amidas foi realizada partindo-se do ácido piperonílico, que foi obtido pela reação de oxidação do piperonal (NETA, 2000).

A um balão de fundo redondo (50 mL) foram adicionados 200 mg do ácido [14] (1,20 mmol), 10 mL de THF seco e 0,5 mL de cloreto de oxalila (6 mmol). Em seguida, adaptou-se ao balão um tubo com cloreto de cálcio e a mistura foi mantida sob agitação magnética, à temperatura ambiente, durante seis horas. Após este tempo, o THF e o excesso do cloreto de oxalila foram eliminados em evaporador rotatório, cuidando para que a temperatura do banho não ultrapassasse 60 °C. Ao resíduo alaranjado obtido foram adicionados 10 mL de THF seco e a amina desejada (2,40 mmol). A mistura foi submetida a aquecimento em banho de glicerina por uma hora e meia.

O material bruto de reação foi concentrado em evaporador rotatório, sendo o resíduo sólido obtido purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel. O Quadro 3 mostra os rendimentos e as quantidades de aminas empregadas no preparo das amidas [15], [16], [17] e [18].

Quadro 3 - Condições gerais para o preparo das amidas [15], [16], [17] e [18] e seus rendimentos

Amida	Massa da Amina/g	Quantidade de Amina/mmol	Solvente para Fracionamento	Rendimento (%)
(6)	0,1420	2,4	H/E 1:1	42
(7)	0,2090	2,4	H/E 1:1	58
(8)	0,2430	2,4	H/E 1:1	61
(9)	0,1752	2,4	H/E 1:1	55
(10)	0,1080	2,4	H/E 1:1	63
(11)	0,2088	2,4	H/E 1:1	49

H: hexano.

E: éter dietílico.

Todos os compostos sintetizados tiveram suas estruturas identificadas através da utilização das espectroscopias no infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e de ^{13}C) (NETA, 2000).

2.1.2. Seleção das amidas

Para seleção das amidas foram realizados, no Laboratório de Toxicologia de Inseticidas, Departamento de Biologia Animal da UFV, bioensaios com lagartas de *S. frugiperda*. Essas larvas foram obtidas de uma criação massal de rotina em tubetes de vidro, em sala com fotoperíodo de 12 horas, no insetário da UFV. A alimentação fornecida foi à base de dieta artificial desenvolvida por KASTEN et al. (1978). Esses ovos foram transferidos para BOD, a uma temperatura de 25 °C, até a eclosão das larvas, permanecendo na BOD até o 3^o instar larval, quando foram realizadas as aplicações.

Para determinação do tempo de exposição e obtenção de faixas de dose que desencadeiam a resposta para cada inseticida, foram realizadas aplicações tópicas das amidas em larvas de 3^o instar de *S. frugiperda*, por se tratar de um estágio de desenvolvimento do inseto de fácil manuseio. O tempo de exposição foi determinado pela sobrevivência da testemunha exposta ao solvente acetona, testando-se os intervalos de tempos de exposição de 24 e

48 horas. O tempo de exposição de 24 horas foi o mais adequado para a avaliação pretendida. A faixa de resposta foi definida como sendo o intervalo entre a menor dose, que não causa mortalidade, e a maior dose, que proporciona uma mortalidade superior a 90%.

Para determinação das faixas de resposta foram preparadas soluções-estoque de 10 mg/mL para cada inseticida, que foram posteriormente diluídas em acetona, até que fosse obtida a menor concentração, que correspondeu a 10^{-3} mg/mL. As concentrações das soluções foram: 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1,0 e 10 mg/mL, diluídas em acetona. Para o sinergista butóxido de piperonila, a concentração-estoque foi de 100 mg/mL, diluída em acetona nas seguintes concentrações: 10^{-1} , 1,0, 10 e 100 mg/mL.

As aplicações tópicas foram realizadas ao depositar 0,5 μ L de cada uma das concentrações (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} e 1 mg/mL) no dorso das larvas, com o auxílio de uma microsseringa, correspondendo às doses de: 0,000321, 0,0321, 0,321 e 3,21 μ g/mg peso, sendo este peso determinado pela média do peso das lagartas. Posteriormente, foram formados grupos de dez indivíduos em placas de Petri, com três repetições para cada concentração da solução, perfazendo um total de 30 larvas testadas para cada concentração. As placas de Petri foram mantidas em BOD, à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 5\%$, até o momento da avaliação da mortalidade dos indivíduos, iniciada após decorridas as 24 horas de exposição.

Para os compostos N-isopropil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [6] e N-hexil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [8], a faixa de dose que desencadeou resposta correspondeu ao intervalo de 0,321 e 3,21 μ g/mg peso, já para o composto N-isopentil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [7] a faixa de resposta correspondeu ao intervalo de 0,166 a 2,41 μ g/mg peso. Em relação ao sinergista butóxido de piperonila, a faixa de resposta ficou entre as doses de 3,21 e 32,1 μ g/mg peso.

Os resultados dos ensaios de dose-resposta foram submetidos à análise de PROBIT, utilizando o procedimento PROC PROBIT do SAS (SAS Institute, 1997).

2.2. Avaliação, a longo prazo, da atividade biológica das amidas selecionadas

Os ensaios complementares foram realizados por meio de aplicações tópicas, em larvas de 3^o instar de *S. frugiperda*, das amidas selecionadas, avaliando-se, até a fase de pupa, os seguintes parâmetros: mortalidade larval acumulada, ganho de peso em função do tempo, sobrevivência ao longo do tempo, duração do período larval e dieta assimilada (diferença entre a dieta consumida e as fezes). A metodologia de aplicação foi a mesma descrita anteriormente, utilizando acetona como solvente e depositando 0,5 µL sobre os insetos, correspondendo às seguintes doses das amidas em ppm: 1.344,0, 268,8, 134,4, 26,88 e 13,44. As concentrações utilizadas correspondentes a essas doses foram: 5, 1, 0,5, 0,1 e 0,05 mg/mL das amidas [6], [7] e [8] e o butóxido de piperonila. Essas doses correspondem à faixa inferior de resposta para os ensaios de 24 horas. Na testemunha foi aplicado 0,5 µL de acetona.

Antes da realização dos ensaios, as larvas e as dietas foram pesadas. Após a aplicação tópica de cada amida, as larvas foram colocadas em potes plásticos com capacidade de 100 mL, com tampa, contendo dieta artificial, e mantidas sob temperatura de 25 °C. As avaliações foram realizadas diariamente, para verificar a mortalidade ao longo do desenvolvimento, e as pesagens dos insetos foram realizadas a cada quatro dias. No estágio de pupa, foi obtido o peso final da dieta assimilada por cada inseto (diferença entre dieta consumida e fezes).

Os resultados de peso do inseto foram submetidos a uma análise multivariada de medidas repetidas, e para determinar a mortalidade provocada por cada amida durante o desenvolvimento do inseto aplicou-se a análise de covariância, tendo os inseticidas e suas concentrações como variáveis independentes. A duração do período larval e a diferença da dieta assimilada foram verificadas mediante as superposições das barras do erro-padrão da média de cada tratamento.

3. RESULTADOS

Os resultados da varredura de ampla faixa de concentrações estão representados no Quadro 4. De maneira geral, as amidas que apresentaram maior mortalidade foram N-isopropil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [6], N-isopentil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [7] e N-hexil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [8]. No caso do sinergista butóxido de piperonila, as doses utilizadas foram maiores do que as utilizadas para as demais amidas. Os dados do efeito inseticida das três amidas mais promissoras e do butóxido de piperonila evidenciados pelo ensaio de varredura de ação inseticida foram sujeitos a bioensaios de concentração-resposta, cujos resultados estão apresentados no Quadro 4. Os valores das DL_{50} dos inseticidas foram usados na detecção da amida mais tóxica durante o monitoramento. Esses valores variaram para as diferentes amidas empregadas neste estudo, com a amida [6], e para o butóxido de piperonila, que apresentaram maior e menor potência, respectivamente (Quadro 5).

Quanto à sobrevivência larval (Figura 1), pôde-se observar que para a amida [8] as duas menores doses acarretaram em diminuição da sobrevivência de insetos no 3^o dia e a que partir daí não houve alteração na taxa de sobrevivência, que permaneceu num patamar entre 90 e 95%. Para a concentração de 268,80 ppm houve uma diminuição mais acentuada na taxa de

Quadro 4 - Análise de covariância para mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* em função das amidas aplicadas em diferentes doses

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Soma Quadrado	F	p
Modelo	7	19500,18	9,07	0,0001*
Erro	72	22125,06		
Total	79	41625,24		

Modelo	Grau de Liberdade	Soma Quadrado	F	P
Inseticida	3	2135,73	2,32	0,08
Dose	1	8993,80	29,27	0,0001*
Dose x inseticida	3	3848,26	4,17	0,0088*

Significativamente diferentes a 5% de probabilidade.

Quadro 5 - Análise multivariada de peso com medidas repetidas utilizando as amidas[6], [7], e [8] em *Spodoptera frugiperda*. Efeitos foram computados entre e dentro de cada inseticida

(a) Entre Tratamentos

Fonte de Variação	Valores de F	Graus de Liberdade	p
Bloco	3,83	3	0,0140
Inseticida	5,31	3	0,0026*
Dose	21,02	3	0,0001*
Inseticida x Dose	7,92	15	0,0001*

(b) Dentro dos Tratamentos

Fonte de Variação	Wilks Lambda	Valores de F	Graus de Liberdade do Numerador	Graus de Liberdade do Denominador	p
Tempo	0,00557353	2587,08	4	58	0,0001*
Tempo x Bloco	0,73047868	1.61476	12	153.745	0,0926
Tempo x Inseticida	0,64757362	2.28683	12	153.745	0,0105*
Tempo x Dose	0,16658529	6.92707	20	193.314	0,0001*
Tempo x Dose x Inseticida	0,1524418	2.35908	60	228.631	0,0001*

¹ Num e Den df refere-se ao grau de liberdade do numerador e denominador respectivamente.

*Significativo ($p < 0,01$).

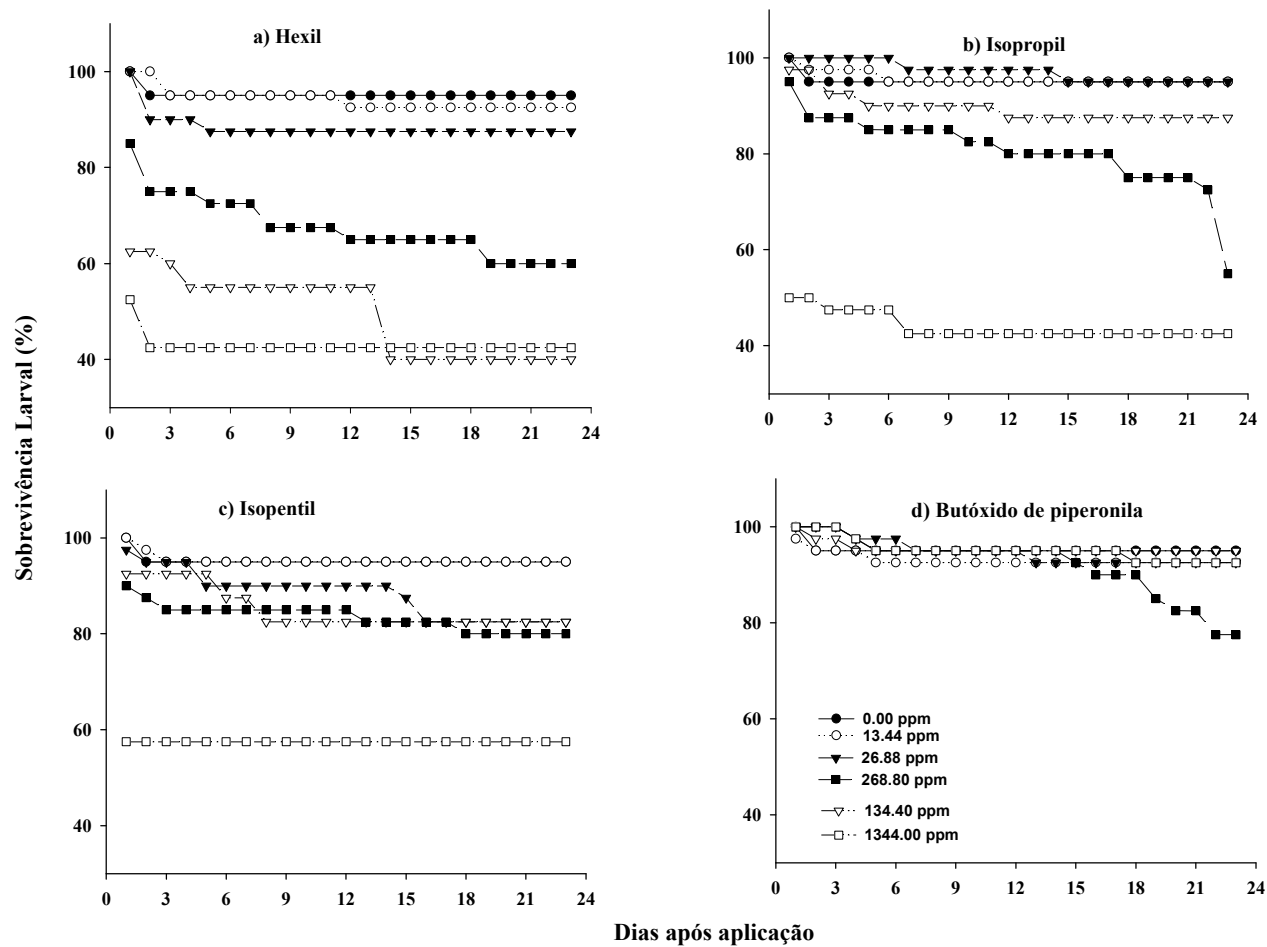


Figura 1 - Curvas de sobrevivência para três amidas [6], [7] e [8] e para o butóxido de piperonila aplicadas em *Spodoptera frugiperda*.

sobrevivência, ocorrendo uma variação no decorrer do tempo de avaliação; nos primeiros três dias a sobrevivência foi de 85%, entre o 12^o e 18^o dia foi em torno de 70% e no final do ciclo a taxa de sobrevivência alcançou valores próximos a 65%. Já para as duas maiores doses houve uma diferença na diminuição da sobrevivência, quando comparadas entre si, até o 14^o dia do ciclo; a partir daí essas doses proporcionaram o mesmo decréscimo na sobrevivência, ficando em torno de 40%.

Nos testes com a amida [6] foi observado que até o 13^o dia do ciclo houve um efeito semelhante das três menores doses na taxa de sobrevivência, não proporcionando grandes alterações. Para a dose de 268,80 ppm houve uma diminuição de sobreviventes, a partir do 1^o dia, em torno de 10%. Do 2^o até o 21^o dia, estes valores sofreram uma pequena variação, devendo ser ressaltado que no 22^o dia do ciclo os valores da taxa de sobrevivência estavam em torno de 60%. Os resultados da amida [7] nas doses de 26,88 e 268,80 ppm acarretaram em diminuição de sobreviventes até o 3^o dia, a partir daí mantiveram-se constante até o 22^o dia de desenvolvimento do inseto.

Para a dose de 1.344,00 ppm, a taxa de sobreviventes manteve-se constante do 1^o dia até o final do desenvolvimento do inseto, em torno de 55% de sobreviventes. Já para o sinergista butóxido de piperonila, a maioria das doses manteve uma taxa constante do número de sobreviventes desde o 1^o dia da aplicação das substâncias até o 22^o dia, em torno de 90% de sobreviventes; a dose de 268,80 ppm apresentou uma pequena variação no número de sobreviventes no 16^o dia, em torno de 85%, e a partir daí ocorreu uma pequena variação na taxa de sobreviventes até o final do estágio de desenvolvimento do inseto, em torno de 75% na taxa de sobreviventes.

Verificou-se ainda o efeito das amidas [6], [7] e [8] e do butóxido de piperonila na duração do período larval da *S. frugiperda*, que apresentaram diferença significativa entre si. Na Figura 2 pode-se observar que a amida N-hexil [8] apresentou um decréscimo do período larval quando aplicada às doses de 134,4, 268,8 e 1.344 ppm. Já as amidas N-isopropil [6] e N-isopentil [7] não apresentaram diferença entre si, porém difereriram-se

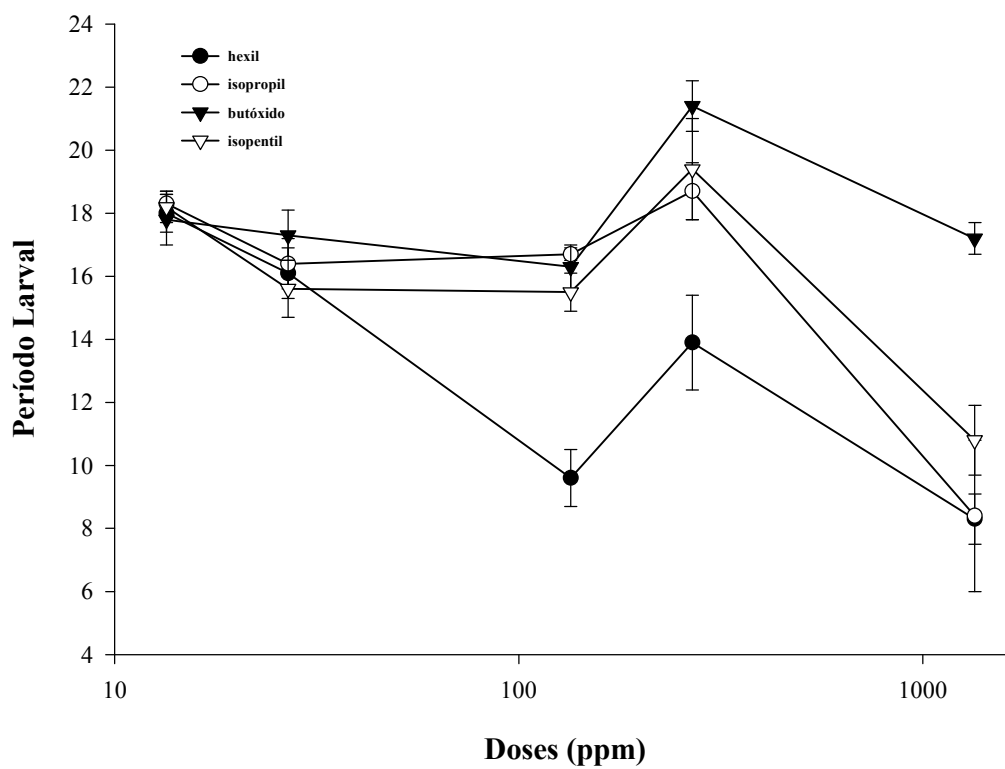


Figura 2 – Duração do período larval de *Spodoptera frugiperda* após a exposição às amidas [6], [7] e [8] de piperonila.

I

significativamente do butóxido de piperonila, que apresentou período larval mais longo que o das amidas testadas.

Os resultados de mortalidade larval, utilizando as três amidas e o butóxido de piperonila em larvas de *S. frugiperda*, foram sujeitos à análise de covariância, cujos resultados podem ser observados no Quadro 6. Tais resultados mostram que houve diferença significativa entre os tratamentos quando submetidos à análise de covariância, tendo os inseticidas como variável independente e as doses destes como covariáveis. As amidas que apresentaram maior toxicidade (Figura 3) para as larvas de *S. frugiperda* foram as [6], [7] e [8], não diferindo estatisticamente entre si com base na superposição do erro-padrão de suas inclinações ($0,04 \pm 0,01$, $0,03 \pm 0,01$ e $0,02 \pm 0,01$, respectivamente). No entanto, mostraram-se diferentes do butóxido de piperonila (com inclinação de $-0,01 \pm 0,08$), demonstrando possuir baixo efeito tóxico sobre a espécie *S. frugiperda*. Valores altos de inclinação indicam que pequenas variações na dosagem da substância ativa levariam a grandes variações na taxa de mortalidade da larva, ou seja, resultariam numa resposta homogênea da população a esta substância. Por outro lado, valores baixos de inclinação, mesmo com grandes variações na dosagem da substância ativa, resultaram em pequenas variações na taxa de mortalidade, ou seja, a população respondeu de forma heterogênea.

Além da mortalidade das larvas de *S. frugiperda*, foram observados anormalidades morfológicas das larvas e pupas (Figura 4), prolongamento dos instares larvais e morte dos adultos logo após a completa metamorfose, quando aplicados os compostos [6], [7] e [8], principalmente na dose de 268,8 ppm. A maioria dos insetos morreu após permanecerem inativos ou durante ecdises prolongadas. Com relação aos insetos que conseguiram completar o processo de muda de larva para a fase de pupa, os defeitos se intensificaram com a sucessão de muda no instar posterior, e as pupas que conseguiram completar a muda até a fase adulta mostraram danos morfológicos drásticos, morrendo logo em seguida. Essas anomalias foram observadas para os compostos N-isopropil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [6],

Quadro 6 – Modelo de regressão relacionados ao assimilado da dieta para os compostos testados [15], [17] , [18] e o butóxido de piperonila

$Y = a + bx + cx^2$							
Inseticida	a ± EP	b ± EP	c ± EP	G.L.erro	F	P	R ²
N-hexil	2,04 ± 0.11	0,003 ± 0,00095	-2,22 x 10 ⁻⁶ ± 6 x 10 ⁻⁷	19	6,89	0,005	0,42
N-isopentil	2,01 ± 0.11	0,004 ± 0,00096	-3,18 x 10 ⁻⁶ ± 6 x 10 ⁻⁷	19	11,47	0,0001	0,54
N-isopropil	1,54 ± 0.15	0,004 ± 0,00132	-3,35 x 10 ⁻⁶ ± 9 x 10 ⁻⁷	19	7,40	0,004	0,43
butóxido	1,89 ± 0.12	0,004 ± 0,00109	-2,92 x 10 ⁻⁶ ± 7 x 10 ⁻⁷	19	7,87	0003	0,45

* Significativamente diferentes a 1% de probabilidade.

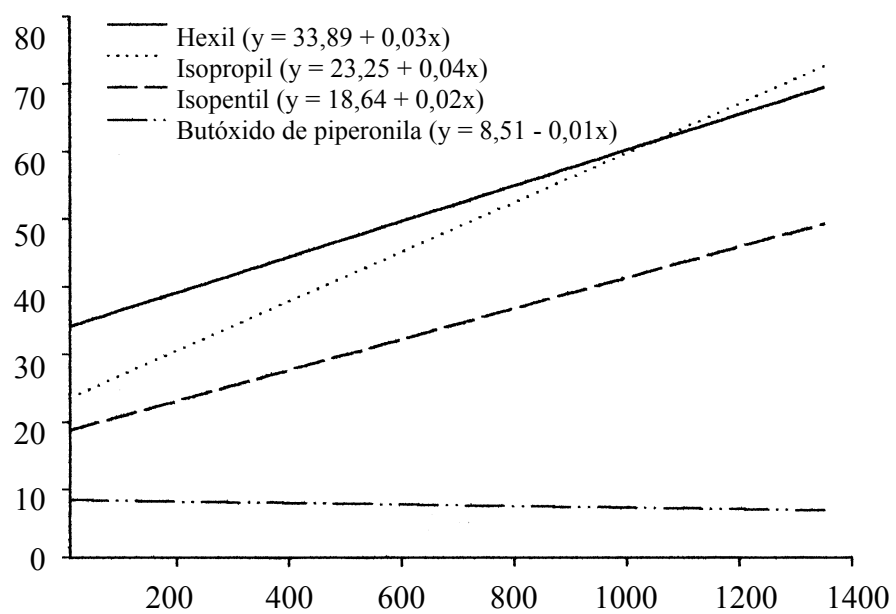
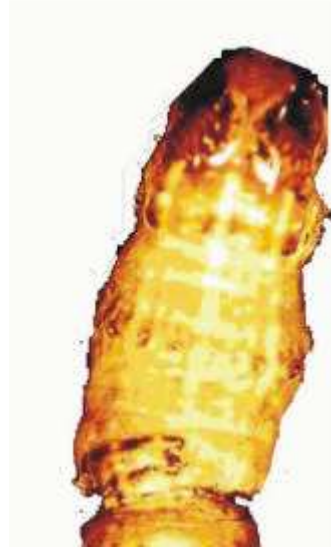


Figura 3 – Efeito da dose de três amidas N-isopropil-3,4-metilenodioxifenil) amida [6], N-isopentil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [7], N-hexil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [8] e butóxido de piperonila na mortalidade de *Spodoptera frugiperda*.



Larva



Larva-pupa



Adulto

Figura 4 – Larva, larva-pupa e adulto de *Spodoptera frugiperda* deformadas após a aplicação a tópica das amidas [6], [7] e [8] em 3^o instar na dose de 268 ppm.

N-isopentil-(3,4-metileno-dioxifenil) amida [7] e N-hexil-(3,4 metilenodioxifenil) amida [8]. A maioria das vezes, partes da cutícula velha do inseto permaneciam aderidas à cutícula larval, ficando esta escurecida, e as larvas normalmente permaneciam na fase de pré-pupa por muito mais tempo. A maioria das pupas demonstrou alteração na pigmentação da cutícula ou apresentou manchas pretas, que são resultados da melanização cuticular. Já os adultos tinham as asas deformadas ou a base das asas incompletas.

A análise de ganho de peso dos insetos expostos às amidas [6], [7] e [8], pertencentes ao grupo das N-alkil-(3,4-metilenodioxifenil)-amidas, e ao butóxido de piperonila demonstrou que houve diferença significativa entre eles, suas doses e na interação inseticida x dose (Quadro 6). Ainda na mesma análise foram verificadas diferenças significativas para as variáveis de tempo, tempo x inseticida e tempo em relação à dose, assim como interação entre tempo x dose x inseticida a 0,01% (Quadro 6), quando submetido à análise de variância com medidas repetidas, indicando que houve variação significativa de peso das lagartas com o tempo, o que era esperado em face do crescimento dos insetos (Figura 5). Com relação aos compostos testados, pode-se perceber que houve tendência de o N-hexil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [8], nas três menores doses, ter maior ganho de peso que as demais doses. Com relação à dose de 268,82 ppm, as amidas mostraram-se, de modo geral, semelhantes. Quando utilizada a dose de 1.344,09 ppm, o butóxido de piperonila demonstrou uma perda de peso maior que a das demais amidas, aos 12 dias, mas o efeito dos compostos se igualou ao final do experimento.

Os resultados dos testes com dieta assimilada mostraram haver diferenças significativas entre algumas das amidas e o butóxido de piperonila, com base nas superposições das barras de erro-padrão (Figura 6). A amida [6] apresentou o menor valor do consumo da dieta assimilada nas doses de 13,44, 26,88 e 134,4 ppm, demonstrando um aumento do assimilado na dose de 268,8 ppm e, logo após, um decréscimo na maior dose aplicada (1.344,0 ppm). As demais amidas e o butóxido de piperonila, principalmente quando aplicado à maior dose, mostraram diferenças significativas.

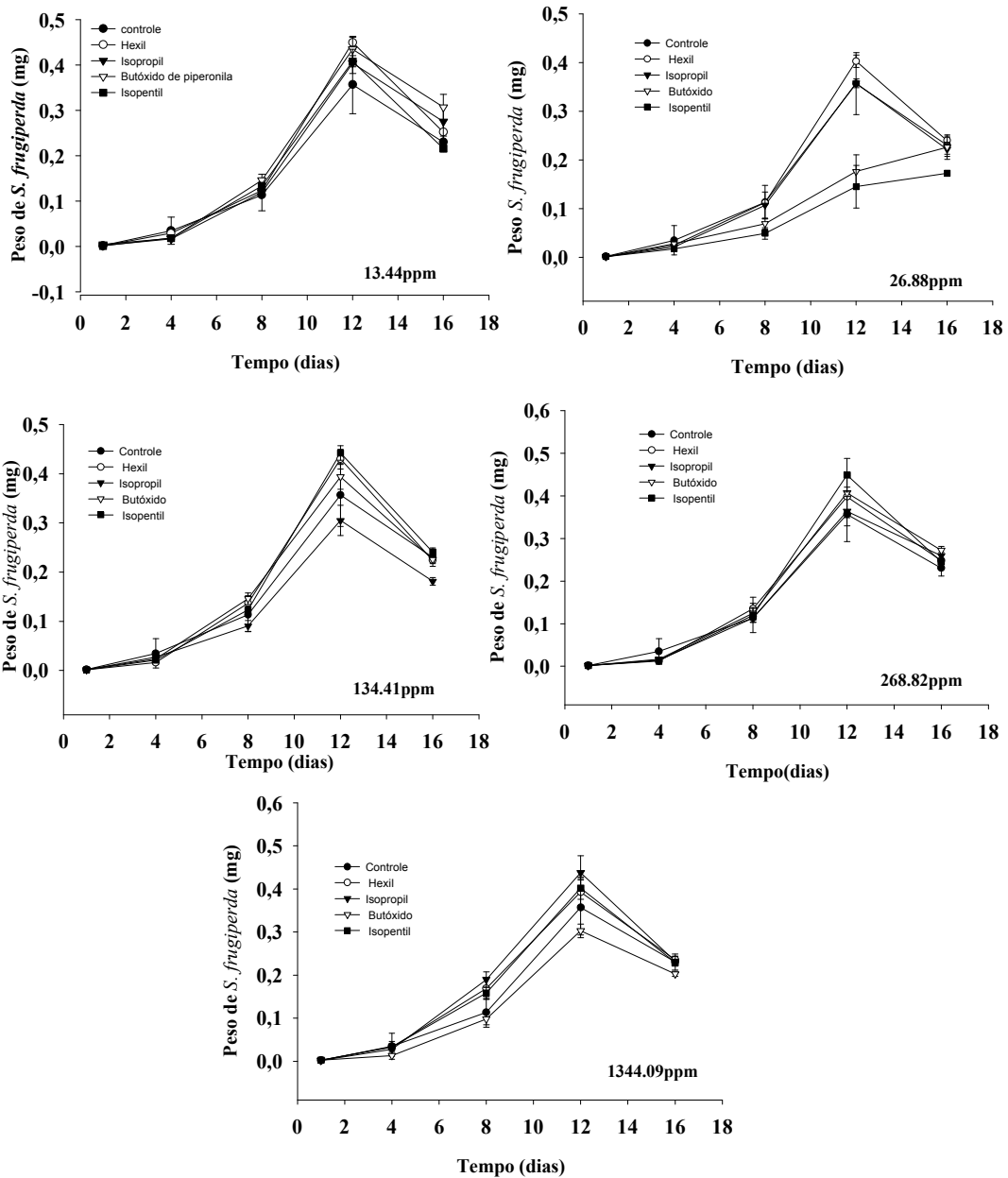


Figura 5 - Efeito das amidas [6], [7] e [8] e o butóxido de piperonila em diferentes doses no ganho de peso de *Spodoptera frugiperda*.

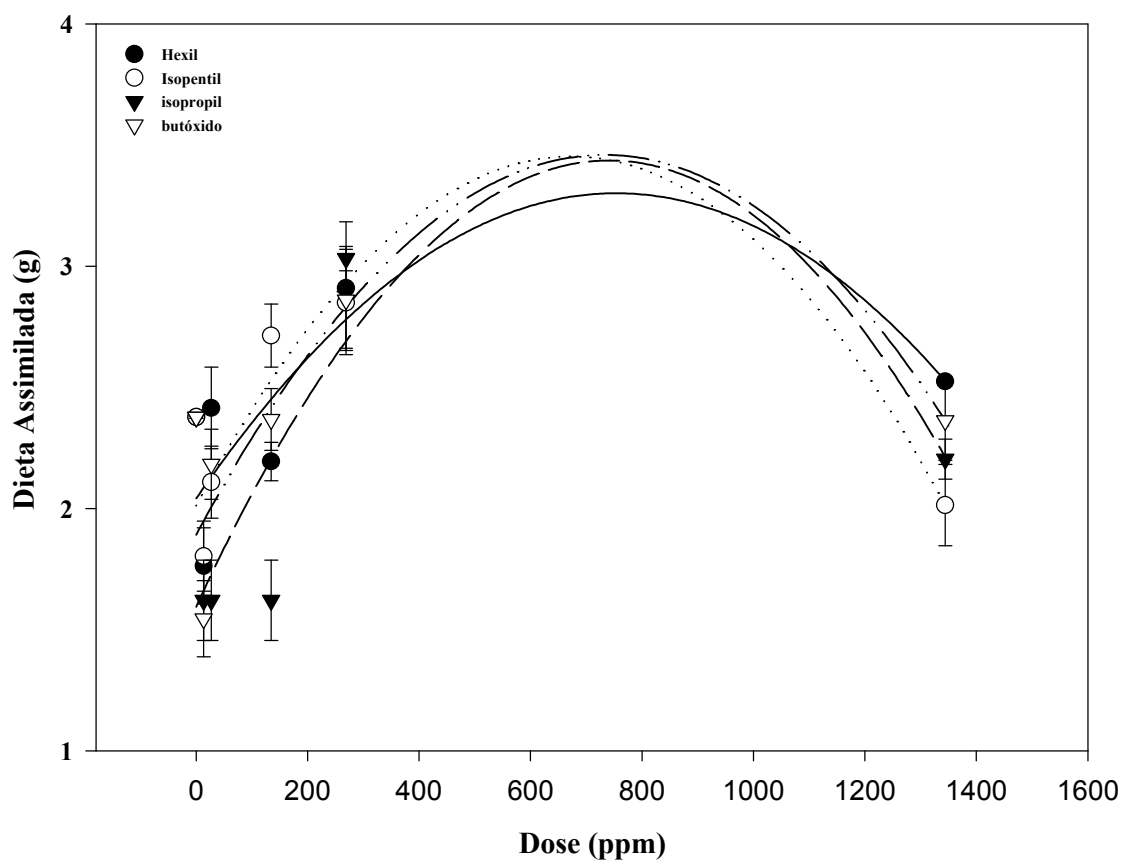


Figura 6 - Efeito das amidas [6], [7] e [8] e o butóxido de piperonila à diferentes doses, no assimilado em larvas de *Spodoptera frugiperda*.

4. DISCUSSÃO

Como exposto na introdução, poucos trabalhos foram realizados com amidas análogas à piperina, apesar do conhecimento da ação inseticida deste composto. Além disto, pouco ainda se conhece sobre o modo de ação dessas amidas no organismo dos insetos. Diante da necessidade de melhor compreensão da relação estrutura química-atividade biológica das amidas análogas à piperina, avaliou-se, neste trabalho, a atividade inseticida ao longo do desenvolvimento do inseto. Por ser um trabalho pioneiro a esta espécie nesta linha de pesquisa, buscou-se elucidar os efeitos sobre mortalidade da larva, sobrevivência, duração do período larval, ganho de peso e assimilação da dieta ao longo do desenvolvimento de *S. frugiperda*, com discussão embasada em estudos e trabalhos correlacionados.

Nos resultados obtidos por meio de bioensaios de concentração-resposta (Quadro 2), observou-se maior toxicidade para as amidas [6], [7] e [8] a *S. frugiperda*, quando comparadas com o butóxido de piperonila, que apresentou menor toxicidade. Resultados semelhantes também foram encontrados (SOUZA NETA, 1999) em testes de aplicação tópica das substâncias N-isopropil-(3,4-metilenodioxifenil)-amidas [15] e N-isopentil-(3,4-metilenodioxifenil)-amidas [17] na espécie *T. molitor*, utilizando a dose de 0,034 µg/mg.

PAULA et al. (2000) observaram que a piperina possui ação inseticida para as espécies *Ascia monustes* (Lepidoptera:Pieridae), *Acanthoscelides obtetus* (Coleoptera:Bruchidae), *Brevicoryne brassicae* (Homoptera:Aphididae), *Protopolybia exigua* (Hymenoptera:Vespidae) e *Conitermes cumulans* (Isoptera:Termitidae). *B. brassicae* foi suscetível a 13 das 16 amidas testadas, com mortalidade que variou de 52,5 a 92,5%. As amidas mais ativas foram N-etilpiperamida, N-pentilpiperamida e N-hexilpiperamida, pertencentes ao grupo das piperamidas, causando mortalidades que variou de 52,5,0 a 70,0%. As outras dez amidas apresentaram toxicidades que variaram de 70,0 a 52,5% de mortalidade. Apesar de na literatura ser encontrado que a maioria das substâncias ativas é do tipo isobutilamidas (MIYAKADO et al., 1985; ELLIOT et al., 1987a), neste estudo tal fato não foi observado. A N-isobutilpiperamida apresentou atividade inseticida somente para *B. brassicae* que foi a espécie sensível à maioria das piperamidas. Resultados semelhantes também foram observados no estudo de aplicação tópica com a espécie *S. frugiperda*, apesar de as amidas testadas terem sido diferentes, estruturalmente, das piperamidas testadas por PAULA et al.(2000).

Os resultados da aplicação tópica de doses mais baixas dos compostos mais promissores mostraram diferenças significativas na média de sobrevivência larval e duração do período larval. As amidas [6], [7] e [8] foram as que proporcionaram decréscimo da sobrevivência e menor período larval em relação ao butóxido de piperonila, conseqüentemente essas mesmas amidas causaram maior mortalidade das larvas de *S. frugiperda* ao longo do desenvolvimento do inseto, como foi verificado nas Figuras 1 e 2. Este resultado já era esperado, pois nos bioensaios de concentração-resposta essas amidas foram as que proporcionaram maior toxicidade a esta espécie. Como as três amidas sintéticas pertencem ao grupo N-alkil-(3,4-metilenodioxifenil)-amidas, este parece ser o mais promissor ao desenvolvimento de amidas mais potentes, podendo haver uma correlação entre as suas estruturas. As amidas [6] e [7] mostraram ser tóxicas para a *S. frugiperda*, com grupos alquilas de número de átomos de carbonos diferentes, porém de cadeias ramificadas.

Verificou-se ainda que a amida [8], com grupo alquila de cadeia longa não-ramificada, parece ter nessa característica uma condição importante para a toxicidade a essa espécie. KIUCHI et al. (1988) isolaram sete amidas de *P. nigrum* que apresentaram atividade larvicida para larvas de segundo instar de *Toxocara canis* (Ascaridida:Toxocaridae), e sugeriram a importância do grupo metilendioxifenil para a atividade larvicida. O trabalho de PARMAR et al. (1997) reforça essa hipótese, uma vez que ficou demonstrada que a piperina apresentava atividade fago-inibidora para a larva de *Chilopartillus* no seu quinto instar, estando a atividade relacionada com a presença do grupo metilendioxifenil na estrutura química da molécula da piperina. No presente estudo foi também observada a presença do grupo metilendioxifenil na estrutura química das amidas testadas, causando mortalidade para a espécie *S. frugiperda*.

Quanto às deformações morfológicas observadas nas larvas e pupas, verificou-se alteração na pigmentação da cutícula ou manchas pretas, que são resultados da melanização cuticular. MARTINEZ et al. (2001), em observações semelhantes, utilizando larvas de 3^o instar de *S. littoralis* alimentadas com dieta artificial do composto azadiractina e doses de 0,01 a 5 ppm, relataram o efeito desse composto como regulador de crescimento, interferindo no sistema neuroendócrino dos insetos. WIGGLESWORTH (1972) concluiu que os principais hormônios envolvidos na regulação de crescimento em insetos são a ecdisona e 20-hidroecdisona e o hormônio juvenil.

Resultados semelhantes foram também observados por KOUL (1987), utilizando larvas de *S. littoralis* com o composto azadiractina, sendo este associado a baixos níveis de ecdisteróides e hormônio juvenil (HJ), agindo como inseticidas reguladores de crescimento (HORI et al 1984). O desenvolvimento de inseticidas reguladores de crescimento somente teve início após a elucidação da estrutura química do HJ, por ROLLER et al. (1967). Esses inseticidas podem ser classificados, de acordo com o seu modo de ação, em dois grupos básicos: inibidores de formação da cutícula e

interferentes da ação hormonal em insetos, que são os juvenóides (análogos do hormônio juvenil), cujo principal efeito ocorre durante a mudança de larva para pupa (metamorfose incompleta).

O butóxido de piperonila já foi reportado como composto com atividade anti-HJ (ETO, 1990), pois o mesmo possui em sua estrutura o grupo metilenodioxifenil, à semelhança das amidas aqui estudadas, que também podem estar apresentando este efeito, o que será objeto de estudos no futuro.

Os resultados em relação ao peso adquirido durante o desenvolvimento do inseto mostraram que houve aumento de peso nos primeiros dias até o 12^o dia, para todas as doses utilizadas. A partir daí, houve decréscimo do peso da larva. Este resultado era esperado para as doses mais baixas, já que o seu ganho de peso está relacionado com a assimilação da dieta, que foi também alta para a maioria das doses empregadas. Porém, os insetos só apresentaram um baixo consumo do assimilado e uma queda no peso quando a dose mais alta foi aplicada. Neste caso, pode ter ocorrido “hormese”, que é definida, segundo FORBES (2000), como sendo a estimulação de um organismo quando submetido a níveis baixos de exposição de agentes tóxicos que são prejudiciais a ele somente quando expostos a elevados níveis. Segundo SEBENS (1982), se um organismo evolui para lidar com certos tipos comuns de estresses ambientais, ele pode obter respostas ambientais semelhantes para lidar com o novo estresse ao qual foi envolvido, ou seja, os seus genótipos, sob tais condições, podem responder de forma a aumentar ou até mesmo reduzir a alimentação disponível, direcionando suas reservas à manutenção do organismo.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho propiciou a avaliação da atividade inseticida de 11 amidas análogas à piperina e do butóxido de piperonila ao longo do desenvolvimento de larvas de *S. frugiperda*. Pôde-se concluir que nos ensaios de aplicação tópica, realizados com esta espécie, apenas três das 11 amidas testadas, N-isopropil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [6], N-isopentil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [7], N-hexil-(3,4-metilenodioxifenil) amida [8], e o butóxido de piperonila apresentaram toxicidade expressa pela mortalidade e pelas deformidades morfológicas de larvas e adultos. Apesar de as demais amidas não apresentarem atividade inseticida no presente estudo, é necessária a continuidade da realização de ensaios biológicos, utilizando outras espécies de insetos e até mesmo outras técnicas experimentais, em virtude do reconhecimento na literatura de que a toxicidade de uma substância pode variar de acordo com a espécie de inseto estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, Y.J., LEE, S.B., LEE, H.S., KIM, G.H. Insecticidal and acaricidal activity of carvacrol and beta-thujaplicine derived from *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* sawdust. **Journal of Chemical Ecology**, v.24, p.81-90, 1998.
- ATAL, C.K., DHAR, K.L., SINGH, J. The chemistry of Indian Piper species. *Lloydia*. **Journal of Natural Products**, v.38, p.256-264, 1975.
- BERNARD, C., PHILOGENE, B.J.R. Inseticides synergists: role, importance, and perspectives. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.38, p.199-233, 1993.
- BERNARD, C.B., KRISHINAMURTY, H.G., CHAURET, D., DURST, T., PHILOGÈNE, B.J.R., SÁNCHEZ-VINDAS, P., HASBUN, C., POVEDA, L., ROMÁN, L.S., ARNASON, J.T. Insecticidal defenses of piperaceae from the neotropics. **Journal of Chemical Ecology**, v.21, p.801-814, 1995.
- CAMPANHOLA, C. **Resistência de insetos a inseticidas: importância, características e manejo**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1990. 45p.
- DEVINE, J.G., ISHAAYA, I.A., HOROWITZ, R.A., DENHOLM, L. Effects of piperonyl butóxide on *Bemisia tabaci* Gen. (Homoptera : Aleyrodidae): mortality, development, parasitism and predation in Israeli cotton fields. **Pesticide Science**, v.17, p.717-726, 1998.

- ELLIOTT, M., FARNHAM, A.W., JANES, N.F., JOHNSON, D. M., PULMAN, D.A. Synthesis and insecticidal activity of lipophilic amides. Part 1: Introductory survey, and discovery of na active synthetic compound. **Pesticide Science**, v.18, p.191-201, 1987a.
- ELLIOTT, M., FARNHAM, A.W., JANES, N.F., JOHNSON, D.M., PULMAN, D.A. Synthesis and insecticidal activity of lipophilic amides. Part 5: Influence on activity of varying the substituent on nitrogen. **Pesticide Science**, v.18, p.239-244, 1987b.
- ETO, M. Biochemical mecanismos of insecticidal activities. In **Chemistry of Plant Protection**, v.6, p. 65-107, 1990.
- FERNANDES, W.D., FERRAZ, J.M.G., FERRACII, V.L., HABIB, M.E.M. Deterrência alimentar e toxidez de extratos vegetais em adulto *Anthonomus grandis* Both. (Coleoptera:Curculionidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.25, n.3, p.553-556, 1996.
- FORBES, V.E. Is hormesis na evolutionary expectation. **Functional ecology**, v.14, p.16-20, 2000.
- GRAVENA, S. Estratégias de manejo integrado do bicho-mineiro-do-cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Ménéville). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.13, p.117-129, 1984.
- GUEDES, R.N.C. Resistência de insetos a inseticidas. In: ZAMBOLIM, L. **I Encontro sobre manejo de doenças e pragas**. Viçosa: UFV, 1999. p.101-107.
- GUEDES, R.N.C., D.B. FRAGOSO. Resistência a inseticidas: Bases gerais, situação e reflexões sobre o fenômeno em insetos-praga do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. **I Encontro sobre produção de café com qualidade**. Viçosa: UFV, 1999. p.99-120.
- HARE, J.D., MORSE, J.G. Toxicity, persistence, and potency of sabadilla alkaloid formulations to citrus thrips (Thysanoptera: Thripidae). **Journal of Economic Entomology**, v.90, p.326-332, 1997.
- HARVIL, P., EDWARD, K., ALBERT, H., JONH, M.A Toxicity of piperine solutions to housefleis. **Contributions from the Boyce Thompson Institute**, v.13, p 87-92, 1943.
- HIRATA, R. Estrutura química-atividade biológica. **Química Nova**, v.18, n.4, p.368-374,1995.

- HORI, M., HIRUMA, K., RIDDIFORD, L.M. Cuticular melanization in the tobacco hornworm larva. **Insect Biochemical**, v.14, p.267-274, 1984.
- HU, MAY, KLOCKE, J.A., CHIU, S.F., KUBO, I. Response of 5 insect species to a botanical insecticide, rhodojaponin-iii. **Journal of Economic Entomology**, v. 86, p.706-711, 1993.
- IVBIJARO, M.F., BOLAJI, O. O. Effects of cypermethrin + dimethoate and extracts of *P. guineense* and *Azadirachta indica* on the pests and yield of cowpea, *Vigna unguiculata*. **Journal Agricultural Science**, v.115, p.227-231,1990.
- JANPRASERT, J., SATASOOK, C., SUKUMALANAND, P., CHAMPAGNE, D.E., ISMAN, M.B., WIRIYACHITRA, P., TOWERS, G.H.N. Rocaglamide a natural benzofuran insecticide from *aglaia-odorata*. **Phytochemistry**, v.32, p.67-69, 1993.
- KASTEN, P. JR., A.A.C.M. PRECETTI, J.R.P. PARRA. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.53, n.1-2, p.68-78,1978.
- KAY, I.R., COLLINS, P.J. The Problem of resistance to insecticides in tropical insect pests. **Insect Science and its Applications**, v.8, p.715-721, 1987.
- KHAMBAY, B.P.S., BATTY, D., CAHILL, M., DENHOLM, I., MEAD-BRIGGS, M., VINALL, S., NIEMEYER, H.M., SIMMONDS, M.S.J. Isolation, characterization, and biological activity of naphthoquinones from *Calceolaria andina* L **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v.47, p.770-775, 1999.
- KIUCHI, F., NAKAMURA, N., TSUDA, Y., KONDO, K., YOSHIMURA, H. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. IV. Isolation and identification of larvicidal principles in pepper. **Chemical Pharmacological Bulletin**, v.36, n.7, p.2452-2465, 1988.
- KLOCKE, J.A., HU, MY, CHIU, S.F., KUBO, I. Grayanoid diterpene insect antifeedants and insecticides from *rhododendron-molle*. **Phytochemistry**, v.30, p.1797-1800,1991.

- KOKATE, C.K., TIPNIS H.P., GONSALES, L.X., D'CRUZ, J.L.. Anti insect and juvenile Hormone mimicking activities of essential oils of *Adhatoda vasica*, *Piper longum* and *Cyperus rotundus*. Abstracts. 4th Asian **Symposium on Medicinal Plants and Spices**. Bangkok, Thailand, p.154, 1980.
- KOUL, O. Antifeedant and growth inhibitory effects of calamus oil and neem oil on *Spodoptera litura* under laboratory conditions. **Phytoparasitica** v.15, p. 169-180, 1987.
- KUMARI, K.,SINGH, S.N. Evaluation of efficacy of botanicals as insecticides against pulse beetle (*Callosobruchus chinensis* L.). **Journal of Applied Biology**, v.8, n.1, p.138-140, 1998.
- MARR, K.L., TANG, C.S. Volatile insecticidal compounds and chemical variability of *Hawaiian zanthoxylum* (rutaceae) species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.20, p.209-217, 1992.
- MARTINEZ, S.S., HELMUT, F., EMDEN, V. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera : Noctuidae) caused by Azadirachtin. **Neotropical Entomology**, v.30, p.113-125, 2001.
- MERVILLE., A.R. The place of biological control in the modern science of entomology. **Kenya coffee**, v.24, p.81-84, 1959.
- MIYAKADO, M., NAKAYAMA, I., INOUE, M., HATAKOSHI, M., OHNO, N. The piperaceae amides. 6. Chemistry and insecticidal activities of piperaceae amides and their synthetic analogs. **Journal of Pesticide Science**, v.10 n.1, p.11-17, 1985.
- MIYAKADO, M., NAKAYAMA, L., OHNO, N. Insecticidal unsaturated isobutylamides: From natural products to agrochemical leads, pp. 183-187, in J.T. Amason, B.J.R. Philogène, P. Morand (eds.). **Insecticides of Plant Origin**. ACS Symposium Series 387, Am. Chem. Soc., New York,1989.
- MIYAKADO, M., NAKAYAMA,I., OHNO, N. Insecticidal unsaturated isobutylamides. p.173-187. In: J. T. Arnason, B. J. R. Philogène, P. Morad (Eds.) **Insecticides of Plant Origin**. ACS symposium series 387, 1989.
- OBERLIES, N.H., ROGERS, L.L., MARTIN, J.M., MCLAUGHLIN, J.L. Cytotoxic and insecticidal constituents of the unripe fruit of *Persea americana*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p.781-785, 1998.

- PARMAR, V.S., JAIN, S. C., BISHT, K.S., JAIN, R., TANEJA, P., JHA, A., TYAGI, O.D., PRASAD, A.K., WENGEL, J., OLSEN, C.E., BOLL, P. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v.46, n.4, p.597-673, 1997.
- PAULA, V.F. **Estudo químico de *Ochroma lagopus* swartz e síntese de amidas derivadas da piperina, com avaliação das suas respectivas atividades inseticida.** Belo Horizonte, MG: UFMG, 1999. 219p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Minas Gerais. 1999.
- PAULA, V.F., BARBOSA, L.C.A., DEMUNER, A.J., VELOSO-PILO, D., PICANÇO, M.C. Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. **Pesticide Management Science**, v.56, p.168-174, 2000.
- ROLLER, H., DAHM, K.H., SWEeley, C.C., TROST, B.M. Die struktur des juvenil hormone. **Agew. Chemistry**, v.79, p.190-191, 1967.
- ROSENTHAL, A, NGUYEN, L. Chain sugar nucleosides. *Journal of Organic Chemistry*, v.34, p. 1029-1032, 1969.
- SCHUTES, R.E., RAFFAUFF, R.F. Medicinal and toxic plants of the Indians of northwest Amazonia, Piperaceae. in R.E. Schultes and R.F. Raffauf (eds.). *The healing forest: medicinal and toxic plants of the northwest amazonia. historical, ethno- & economic botany Series*, Dioscoride Press, Portland, Oregon. v.2, p. 362-368,. 1990.
- SCOTT, W.P., MCKIBBEN, G.H. Toxicity of black pepper extract to boll weevils. **Journal of Economic Entomology**, v.71, p.343-344, 1978.
- SEBENS, K.P. Asexual reproduction in *Anthopleura elegantissima* (Brandt) (Anthozoa: Actinaria): seassonality and spatial extent of clones. **Ecology**, v.63, p.434-444, 1982.
- SINGH. P. Insects diets. Historical developments, recent advances, and future prospects. In: KING, E.G., N.C. LEPLA (Eds.) **Advances and challanges in insect rearing**, p. 32-34, 1984.
- SODERLUND, D.M. **Molecular neurobiology and insecticide discovery.** p.309-319. In: 8th International Congress of pesticide Chemistry: Options 2000. Washington: ACS, 1995.
- SOLOMONS, T.W.G. **Organic chemistry.** New York: Jonh Wiley & Sons, 6.ed. p.1218, 1996

- SOUZA NETA, L.C. **Síntese e avaliação da atividade inseticida de amidas análogas à piperina.** Viçosa, MG: UFV, 1999. 86p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Viçosa. 1999.
- SRIVASTAVA, J.B. Insecticide and larvicide activity in the extract of *Piper peepuloides* Royle. **Indian Journal. Experimental Biology.** v.8, p.224-225, 1970.
- STRUNZ, G.M., FINLAY, H. Concise, efficient new synthesis of pipericide, an insecticidal unsaturated amide from *Piper nigrum*, and related compounds. **Tetrahedron**, v.50, p.11113-11122, 1994.
- SU, H.C.F. Inseticidal properties of black pepper to rice weevils and cowpea weevils. **Journal of Economic Entomology**, v.70, p.19-22, 1977.
- SU, H.C.F., HORWAT, R. Isolation, identification and insecticidal properties of *Piper nigrum* amides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.29, p.115-118, 1981.
- SYNERHOLM, M. E., HARTZELL, A, ARTHUR, J.M. Derivatives of piperic acid and their toxicities toward houseflies. **Contributions from the Boyce Thompson Institute.** V.13, p.433-442, 1945.
- TABUNENG, W., BANDO, H., AMIYA, T. Studies on the constituents of the crude drug “*Piperis longifrucrus*” on the alkaloids of fruits of *Piper longum*. L. **Chemical Pharmacological Bulletin.** v.31, p.3562-3565, 1983.
- WIGGLESWORTH, V.B. **The principles of insects physiology.** V.7, p. 827, ed. Jonh Wiley, New York, 1972.
- WRBA, H., ELMOFTY, M.M., SCHWAIREB, M.H., DUTTER, A. Carcinogenicity testing of some constituents of Black Pepper (*Piper nigrum*). **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.44, n.2, p.61-65, 1992.
- YOSHIDA, H.A., TOSCANO, N.C. Comparative effects of selected natural insecticides on *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae) larvae. **Journal of Economic Entomology**, v.87, p.305-310, 1994.
- ZANG, X.J., FUKUDA, E.K., ROSEN, J.D. Method for the determination of veratridine and cevadine, major components of the natural insecticide sabadilla, in lettuce and cumpers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.1758-1761, 1997.