

## CROP PROTECTION

### Toxicidade de Amidas Análogas à Piperina a Larvas de *Ascia monuste orseis* Godart (Lepidoptera: Pieridae) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

JOELMA L.V. ESTRELA<sup>1,2</sup>, RAUL N.C. GUEDES<sup>3</sup>, CÉLIA R.A. MALTHA<sup>4</sup> E MURILO FAZOLIN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista CNPq, <sup>2</sup>Embrapa Acre, C. postal 321, 69901-108, Rio Branco, AC

<sup>3</sup>Depto. Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG

<sup>4</sup>Depto Química, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG

*Neotropical Entomology* 32(2):343-346 (2003)

Toxicity of Piperine Amide Analogs to Larvae of *Ascia monuste orseis* Godart (Lepidoptera: Pieridae) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

**ABSTRACT** - The objective of this study was to evaluate the toxicity piperine amide analogs to 3<sup>rd</sup>-instar larvae of *Ascia monuste orseis* Godart and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). The bioassays were based on the topical application of 0.5 µl of the following amides: N-isopentyl-(3,4-metilenodioxifenil)-amide, N-isopropyl-(3,4-metilenodioxifenil)-amide, N-hexyl-3-(3,4-etenodioxifenil)-amide and piperonyl butoxide. The DL<sub>50</sub> (mg a.i./ mg larva) values of the amides N-isopropyl e N-hexyl to *A. monuste orseis* were 0,278 and 0,004, respectively, and to *S. frugiperda* were 1.359 and 0.613, respectively. The steeper slopes of the dose-response curves for both species were obtained with N-isopropyl, indicating the higher homogeneity of response of the pest species studied to this compound. N-isopropyl was also the most promising piperine synthetic analog as insecticide agent among the compounds studied because it was the most toxic amide to both insect-pest species.

**KEY WORDS:** Insecta, *Piper*, fall armyworm, piperonyl butoxide

**RESUMO** - Foi avaliada, no presente estudo, a toxicidade de amidas análogas à piperina utilizando-se larvas de 3<sup>o</sup> instar de *Ascia monuste orseis* Godart e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Os bioensaios consistiram na aplicação tópica de 0.5 µl das seguintes amidas: N-isopentil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida, N-isopropil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida, N-hexil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-amida e butóxido de piperonila. Os valores de DL<sub>50</sub> (mg i.a./ mg larva) das amidas N-isopropil e N-hexil para *A. monuste orseis* foram 0.278 e 0.004, respectivamente; para *S. frugiperda* foram: 1.359 e 0.613, respectivamente. O maior valor das inclinações das curvas de dose-resposta dentre os compostos, para ambas as espécies de inseto foi obtido para N-isopropil, o que indica maior homogeneidade de resposta a esse produto. N-isopropil foi o composto que se mostrou mais promissor como inseticida pois foi mais tóxico a ambas espécies-praga investigadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Insecta, *Piper*, lagarta-do-cartucho-do-milho, butóxido de piperonila

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 biológico, genético e cultural, além das táticas convencionais. 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, explosões populacionais de pragas, e principalmente, a perda de eficácia e inseticidas mediante a seleção de populações resistentes aos compostos químicos (Kay & Collins 1987,

Guedes & Fragoso 1999).

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* Beth (Klocke *et al.* 1991), *Persea americana* Mill (Wrba *et al.* 1992), *Aglaia odorata* Lour (Ahn *et al.* 1998), *Piper nigrum* L. (Khambay *et al.* 1999), pertencentes respectivamente às famílias Scrophularaceae, Laureaceae, Meliaceae e Piperaceae. Destacam-se ainda as

meliáceas, na qual estão *Melia azedarach* L., *Azadirachta indica* A. Juss. e *Trichilia pallida* Sw. (Mordue (Luntz) & Blackwell 1993, Rodriguez & Vendramin 1996).

Propriedades inseticidas de extratos da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L., Piperaceae) são conhecidas desde 1924 (Scoot & Mckibben 1978). Esses extratos mostraram-se tóxicos para a mosca doméstica *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), o mosquito *Culex pipiens* Palex (Diptera: Culicidae) e o gorgulho-do-caupi *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae) (Miyakado et al. 1989).

A piperina foi a primeira amida a ser isolada dos frutos das espécies de *Piper* (Parmar et al. 1997). Os constituintes químicos desse extrato têm sido frequentemente estudados, dentre os quais as amidas lipofílicas insaturadas. Estas além de constituírem o principal grupo de metabólitos da planta, são os principais responsáveis pelas atividades inseticidas (Ahn et al. 1998, Parmar et al. 1997). A atividade inseticida da piperina sobre *M. domestica*, mostrou-se maior do que a das piretrinas (Miyakado et al. 1989). No presente estudo pretendeu-se avaliar a relação dose-resposta de três análogos da piperina em duas espécies de insetos *Ascia monuste orseis* Godart e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) e o butóxido de piperonila, sendo este um sinergista que possui em sua estrutura o grupo metilenodioxifenil, comum nas amidas utilizadas neste ensaio.

### Material e Métodos

As amidas utilizadas foram sintetizadas no laboratório de Síntese de Agroquímicos do Departamento de Química da UFV, utilizando a metodologia de Souza Neta (1999). Para o preparo das N-alkuil-(3,4-metilenodioxifenil)-amidas foi feita inicialmente a reação de oxidação do piperonal para obtenção do ácido piperonílico, conforme a Fig.1. A reação para obtenção das amidas foi realizada partindo-se do ácido piperonílico, que foi obtido pela reação de oxidação do piperonal. A um balão de fundo redondo (50 ml) foram adicionados 200 mg do ácido [14] (1,20 mmol), 10 ml de

tetrahidrofuram (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 6h. Após este tempo, 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 1,5h. O material bruto de reação foi concentrado em evaporador rotatório, sendo o resíduo sólido obtido purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel.

Todos os compostos sintetizados tiveram suas estruturas identificadas através da utilização das espectroscopias em infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

As larvas de *A. monuste orseis* provieram de ovos coletados em um plantio de couve, *Brassica oleracea* var. *acephala*, no mês de novembro, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG. Os ovos foram transferidos para câmara climatizada do tipo BOD, alimentando-se as larvas eclodidas com folha de couve até o 3º instar. As larvas de *S. frugiperda* foram obtidas de uma criação massal de rotina em tubetes de vidro, do Insetário da UFV. A alimentação fornecida foi à base de dieta artificial desenvolvida por Kasten et al. (1978).

Inicialmente foram realizados testes preliminares em laboratório com as larvas de *A. monuste orseis* e *S. frugiperda* com tamanho padronizado de 0,4 cm, para obtenção de faixas de respostas, ou seja, intervalos de concentrações do inseticida que ocasionam mortalidade do inseto desde próximo de zero até próximo de 100%. Cada faixa de resposta foi obtida a partir da solução-estoque de de 10 mg i.a./ml para cada amida, que posteriormente foram submetidas a diluições sequenciais de 10 vezes, até que fosse obtida a concentração  $10^{-3}$  mg i.a./ml. As concentrações das amidas testadas para ambas espécies foram ( $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ , 1 e 10 mg/ml), correspondendo às doses de:  $3,21 \times 10^{-4}$ ;  $3,21 \times 10^{-2}$ ;

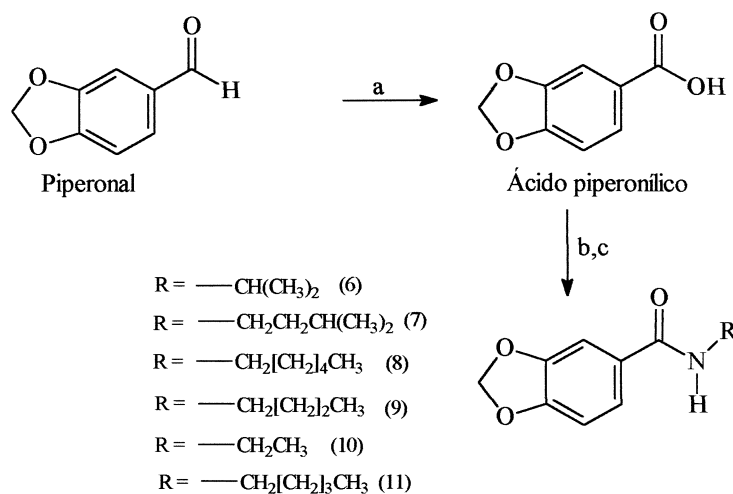


Figura 1. Esquema da reação de oxidação do piperonal para obtenção do ácido piperonílico. a) i- NaOH, AgNO<sub>3</sub>, ii- H<sup>+</sup>; 82%; b) (COCl)<sub>2</sub>, THF, 25°C, 6H; c) amina, THF, 60°C, 1,5H.

3,21 x 10<sup>-1</sup>; 3,21 e 32,1 mg/mg peso de larva, sendo esse peso determinado pela média do peso das lagartas. Desta forma, dentro da ampla faixa testada nos bioensaios iniciais foram obtidas faixas mais estreitas de respostas (com cinco a sete doses) além de um controle com apenas solvente. Estas concentrações foram usadas na realização de ensaios definitivos de curva de concentração-mortalidade e determinação de dose-resposta para estimativa de DL<sub>50</sub> dos compostos para cada espécie investigada, seguindo metodologia descrita por Finney (1971).

As amidas utilizadas foram N-isopentil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida, N-isopropil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida, N-hexil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-amida e o butóxido de piperonila. Os ensaios consistiram na aplicação tópica de 0,5 µl das amidas dorsalmente à região protorácica de cada lagarta de ambas espécies com auxílio de uma microseringa em ambas espécies. Posteriormente foram formados grupos de 10 indivíduos em placa de Petri, com três repetições (i.e., 30 lagartas) para cada inseticida. As placas de Petri foram mantidas em BOD, à temperatura de 25 ± 1°C e umidade relativa de 70 ± 5%, até o momento da avaliação da mortalidade dos indivíduos (total paralisação dos insetos), iniciada 24h após a exposição. Durante esse período os insetos não foram alimentados.

### Resultados e Discussão

Dentro das faixas de concentração testadas para a amida N-isopropil, foram obtidas faixas mais estreitas de resposta para *A. monuste orseis* variando de 10<sup>-3</sup> a 1 mg/ml; para *S. frugiperda* a faixa de resposta variou de 10<sup>-3</sup> a 10 mg/ml. Assim a primeira espécie apresenta maior homogeneidade de resposta aos compostos investigados do que *S. frugiperda*.

As demais faixas de concentrações das amidas para ambas espécies foram as mesmas (10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-1</sup>, 1 e 10 mg/ml).

De maneira geral, a amida que apresentou maior porcentagem de mortalidade para *A. monuste orseis* foi N-isopropil na dose de 3,21 x 10<sup>-1</sup> mg/mg peso de larva, enquanto que para *S. frugiperda* a dose que causou maior mortalidade foi 32,1 mg/mg peso de larva, sendo *A. monuste orseis* mais susceptível à ação dessa amida que *S. frugiperda*.

Os dados de toxicidade de N-isopentil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida, N-isopropil-(3,4-metilenodioxifenil)-amida, N-hexil-3-(3,4-metilenodioxifenil)-amida e o butóxido de piperonila para *A. monuste* e *S. frugiperda* foram obtidos pelas curvas de dose-resposta (Tabelas 1 e 2). Esses valores variaram para as diferentes amidas e as espécies de insetos empregadas no presente ensaio. As amidas N-isopentil e N-isopropil proporcionaram, respectivamente, maior e menor valor de DL<sub>50</sub> para *A. monuste*; o butóxido de piperonila e a amida N-isopropil proporcionaram, respectivamente, o maior e o menor valor de DL<sub>50</sub> para *S. frugiperda*. Resultados semelhantes também foram encontrados por Souza Neta (1999) em testes de aplicação tópica utilizando as substâncias N-isopropil-(3,4-metilenodioxifenil)-amidas e N-isopentil-(3,4-metilenodioxifenil)-amidas sobre *T. molitor*, utilizando a dose de 0,034 mg/mg.

Paula *et al.* (2000) observaram que a piperina possui ação inseticida para *A. monuste orseis*, o bruchídeo *Acanthoscelides obtetus* Say, o afídeo *Brevicoryne brassicae* L., o vespídeo *Protopolybia exigua* De Sans e o isóptero *Conitermes cumulans* Kollar. *B. brassicae* foi susceptível 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 mortalidade que variou de 52,5% a 70,0%. Apesar de a literatura indicar que a maioria das

Tabela 1. Toxicidade de amidas a larvas de 3º instar de *A. monuste orseis*.

Amidas	GL	Inclinação ± EPM	DL <sub>50</sub> (IC 50%) µg i.a./mg larva	DL <sub>99</sub> (IC 95%) µg i.a./mg larva	χ <sup>2</sup>	Prob.
N-Isopropil amida	1	0,85 ± 0,14	0,004 (0,004-0,005)	0,010 (0,007-0,046)	0,00	0,99
N-Isopentil amida	4	0,32 ± 0,05	0,68 (0,14-3,45)	202,35 (16,43-161,57)	10,70	0,03
N-Hexil amida	3	0,44 ± 0,07	0,278 (0,12-0,42)	4,49 (2,54-15,36)	3,46	0,33
Butóxido de piperonila	2	0,29 ± 0,15	0,28 (0,05-5,39)	197,24 (15,83-564,87)	0,49	0,78

GL = grau de liberdade, EPM = erro-padrão da média, IC = intervalo de confiança, DL = dose letal, χ<sup>2</sup> = Qui-quadrado e Prob. = probabilidade, número de insetos usados no teste = 200

Tabela 2. Toxicidade de amidas a larvas de 3º instar de *S. frugiperda*.

Amidas	GL	Inclinação ± EPM	DL <sub>50</sub> (IC 95%) µg i.a./mg larva	DL <sub>99</sub> (IC 95%) µg i.a./mg/larva	χ <sup>2</sup>	Prob.
N-Isopropil amida	4	0,77 ± 0,11	0,61 (0,48-0,74)	3,99 (2,71-7,59)	2,84	0,58
N-Isopentil amida	5	0,36 ± 0,03	1,24 (0,83-2,02)	52,20 (17,69-430,34)	6,25	0,18
N-Hexil amida	2	0,95 ± 0,09	1,35 (0,98-1,67)	7,081 (4,70-17,01)	0,10	0,94
Butóxido de piperonila	3	0,32 ± 0,10	2,63 (0,05-5,39)	849,05 (125,61-153,54)	4,81	0,18

GL = grau de liberdade, EPM = erro-padrão da média, IC = intervalo de confiança, DL = dose letal, χ<sup>2</sup> = Qui-quadrado e Prob. = probabilidade, número de insetos usados no teste = 200

substâncias ativas é do grupo das isobutilamidas (Miyakado *et al.* 1985, Elliot *et al.* 1987), neste estudo tal fato não foi comprovado. A N-isobutilpiperamida apresentou atividade inseticida somente para *B. brassicae* que foi a espécie sensível à maioria das piperamidas.

Com relação aos valores de inclinação das curvas de dose-resposta para as três amidas e o butóxido de piperonila, o maior valor verificado para *A. monuste orseis* foi a amida N-isopropil, já para *S. frugiperda* o maior valor de inclinação verificado foi para a amida N-hexil. Os valores altos de inclinação indicam que pequenas variações na concentração da substância ativa levariam a grandes variações na taxa de mortalidade das larvas, ou seja resultariam numa resposta homogênea da população à substância. Por outro lado, valores baixos de inclinação, mesmo com grandes variações na concentração da substância ativa, resultariam em pequenas variações na taxa de mortalidade, ou seja, a população responderia de forma heterogênea.

Pelos resultados obtidos, podemos concluir que dentre os compostos testados para ambas espécies, a amida N-isopropil foi a que se mostrou mais promissora como inseticida por ter mostrado mais tóxica para as duas espécies.

### Literatura Citada

- Ahn, Y.J., S.B. Lee, H.S. Lee & G.H. Kim. 1998.** Insecticidal and acaricidal activity of carvacrol and beta-thujaplicine derived from *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* sawdust. *J. Chem. Ecol.* 24: 81-90.
- Elliott, M., A.W. Farnham, N.F. Janes, D.M. Johnson & D.A. Pulman. 1987.** Synthesis and insecticidal activity of lipophilic amides. Part 1: Introductory survey, and discovery of active synthetic compound. *J. Pestic. Sci.* 18: 191-201.
- Finney, D.J. 1971.** Probit analysis. London, Cambridge University, 33p.
- Guedes, R.N.C. & D.B. Fragoso. 1999.** Resistência a inseticidas: Bases gerais, situação e reflexões sobre o fenômeno em insetos-praga do cafeeiro. In L. Zambolim (ed.), I Encontro sobre produção de café com qualidade. Viçosa, UFV, 259p.
- Kasten Jr., P., A.A.C.M. Precetti & J.R.P. Parra. 1978.** Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. *Rev. Agric.* 53: 68-78.
- Kay, I.R. & P.J. Collins. 1987.** The problem of resistance to insecticides in tropical insects pests. *Insect Sci. Applic.* 8: 715-721.
- Khambay, B.P.S., D. Batty, M.Cahill, I. Denholm, M. Mead-Briggs, S. Vinall, H.M. Niemeyer & M.S.J. Simmonds. 1999.** Isolation, characterization, and biological activity of naphthoquinones from *Calceolaria andina* L. *J. Agric. Food Chem.* 47: 770-775.
- Klocke, J.A., Hu. Mei-Ying, S.F. Chiu & I. Kubo. 1991.** Grayanoid diterpene insect antifeedants and insecticides from rhododendron-molle. *Phytochemistry* 30: 1797-1800.
- Marr, K.L. & C.S. Tang. 1992.** Volatile insecticidal compounds and chemical variability of *Hawaiian zanthoxylum* (rutaceae) species. *Bioch. Syst. Ecol.* 20: 209-217.
- Miyakado, M., I. Nakayama, M. Inoue, M. Hatakoshi & N. Ohno. 1985.** The piperaceae amides. Chemistry and insecticidal activities of piperaceae amides and their synthetic analogs. *J. Pestic. Sci.* 10: 11-17.
- Miyakado, M., I. Nakayama & N. Ohno. 1989.** Insecticidal unsaturated isobutylamides: From natural products to agrochemical leads, p. 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, 320p.
- Mordue (Luntz), A.J. & A. Blackwell. 1993.** Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.* 39: 903-924.
- Oberlies, N.H., L.L. Rogers, J.M. Martin & J.L. McLaughlin. 1998.** Cytotoxic and insecticidal constituents of the unripe fruit of *Persea americana*. *J. Natural Products.* 61: 781-785.
- Parmar, V.S., S.C. Jain, K.S. Bisht, R. Jain, P. Taneja, A. Jha, O.D. Tyagi, A.K. Prasad, J. Wengel, C.E. Olsen & P. Boll. 1997.** Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46: 597-673.
- Paula, V.F., L.C.A. Barbosa, A.J. Demuner, D. Veloso-Piló & M. Picanço. 2000.** Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. *Pestic. Sci.* 56: 168-174.
- Rodriguez, C.H. & J.D. Vendramim. 1996.** Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Man. Int. Plagas* 42: 14-22.
- Scott, W.P. & G.H. Mckibben. 1978.** G.H. Toxicity of black pepper extract to boll weevils. *J. Econ. Entomol.* 71: 343-344.
- Souza Neta, L.C. 1999.** Síntese e avaliação da atividade inseticida de amidas análogas à piperina. Dissertação de mestrado, Viçosa, UFV, 86p.
- Wrba, H., M.M. Elmofly, M.H. Schwaireb & A. Dutter. 1992.** Carcinogenicity testing of some constituents of black pepper (*Piper nigrum*). *Exp. Toxicol. Pathol.* 44: 61-65.

Received 26/04/02. Accepted 26/03/03.