

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES ALELOQUÍMICAS DO
FEROMÔNIO DE TRILHA DE FORMIGAS CORTADEIRAS**

KARLA DA SILVA MALAQUIAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

**CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
NOVEMBRO DE 2007**

AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES ALELOQUÍMICAS DO FEROMÔNIO DE TRILHA DE FORMIGAS CORTADEIRAS

KARLA DA SILVA MALAQUIAS

Monografia apresentada ao Centro de
Ciência e Tecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense, como parte
das exigências para obtenção do título de
Licenciando em Química.

Orientador: Prof. Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
NOVEMBRO DE 2007

AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES ALELOQUÍMICAS DO FEROMÔNIO DE TRILHA DE FORMIGAS CORTADEIRAS

KARLA DA SILVA MALAQUIAS

Monografia apresentada ao Centro de
Ciência e Tecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense, como parte
das exigências para obtenção do título de
Licenciando em Química.

Aprovado em 14 de novembro de 2007

Comissão Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Rosana Aparecida Giacomini - UENF

Prof. Dr. Luis César Passoni - UENF

Prof. Dr. Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda - UENF
(Orientador)

Aos meus pais, José Carlos e Maria das Graças. Aos meus avós, Alcendino (*in memorium*) e Maria. À minha tia Iracema (*in memorium*). Pessoas muito queridas que sempre me apoiaram e me ensinaram a nunca desistir dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que é a razão de tudo e sempre esteve presente em minha vida indicando os melhores caminhos a serem tomados.

Ao professor Paulo, pela oportunidade e orientação no desenvolvimento deste trabalho, por toda dedicação e amizade, e pela ótima troca de idéias e ensino sobre a química que está além das salas de aula e laboratórios.

À prof^a. Rosana que exerceu um papel fundamental em minha formação docente, sendo sempre tão disponível, competente e segura como professora e amiga.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas de estudos.

Aos funcionários e técnicos que ajudaram na realização deste trabalho.

À prof^a. Cristina pela atenção dispensada e por fornecer os herbicidas usados nos ensaios biológicos.

Ao amigo Leonardo pela paciência, troca de idéias e experiências, além do apoio incondicional na realização deste trabalho.

À minha priminha Vanuza pela ótima convivência e todo apoio sempre.

Às grandes amigas Gabriela e Juliana pela convivência, companheirismo, por toda ajuda e troca de idéias.

Aos amigos do laboratório Alba, Almir, Carol, Letícia, Lindomar, Marlon, Neidinha, Max e Paty pela ótima convivência e amizade.

Aos amigos, Larissa, Gisele, Josi Pink, Carla, Juliana M., Joice, Marcelo, Sarah, Ronan, Monique e Marcy, pela amizade e convivência agradável.

Aos amigos Natália, Paloma e Vaguinho pelo companheirismo.

A todos os colegas e professores da graduação em Licenciatura em Química.

Aos meus irmãos, Saulo e Felipe, por todo apoio e carinho.

E mais importante, a minha família, especialmente meus pais e avós, por terem me dado a base e o apoio necessários, me ajudando a transformar as dificuldades em oportunidades de aprender.

“É preciso sonhar, mas com a condição de crer em nosso sonho, de observar com atenção a vida real, de confrontar a observação com nosso sonho, de realizar escrupulosamente nossas fantasias. Sonhos; acreditem neles.”

Lenin

RESUMO

Avaliou-se a atividade alomonal herbicida dos principais compostos presentes no feromônio de trilha utilizados por grande parte das espécies de formigas cortadeiras. Estes são o 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (1) e a 3-etil-2,5-dimetilpirazina (2). Além destes, o ácido pirazino-2-carboxílico também foi avaliado, por poder apresentar alguma semelhança com um derivado menos volátil originário de uma biotransformação do composto (2) na glândula de veneno das formigas cortadeiras. O estudo desta atividade herbicida foi feito em comparação com os herbicidas comerciais alaclor, atrazina e ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Somente o pirrol (1) foi sintetizado. Os outros compostos utilizados nos ensaios biológicos foram adquiridos comercialmente. O pirrol (1) foi conseguido a partir da abordagem sintética descrita por Barton (1990), associando esta metodologia ao estudo desenvolvido por Bhattacharya e colaboradores (2006).

Os resultados apresentados apontam uma atividade herbicida dos compostos testados nos ensaios biológicos inibindo o crescimento de pepino e grama. Este fato suporta a possibilidade de que algum composto presente no feromônio de trilha possua uma dupla função. Além de agir como feromônio na orientação das formigas, apresenta um caráter herbicida impedindo o crescimento de plantas na área de atuação do feromônio. Esta dupla função dos compostos implicaria em economia de tempo e energia para a colônia, reforçando o grande sucesso evolutivo das formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação dos semioquímicos de acordo com o comportamento indicado. Os sinais (+) e (-) significam benefício e custo na interação, respectivamente. O primeiro sinal refere-se ao organismo emissor enquanto o segundo ao receptor.....	14
Figura 2 - (a) Gênero <i>Atta</i> sp. (saúva) e (b) gênero <i>Acromyrmex</i> sp. (quenquém).....	19
Figura 3 - Especialização de funções relacionadas ao tamanho da cabeça das operárias de <i>Atta sexdens</i>	22
Figura 4 - Esquema de um ninho ou formigueiro de <i>Atta</i> sp.: 1) câmara com larvas e pupas; 2) câmaras ou painéis; 3) câmara com soldados; 4) câmara com lixo; 5) câmara com rainha.....	23
Figura 5 - Vista externa do formigueiro: a) <i>Atta</i> sp. b). <i>Acromyrmex</i> sp.....	24
Figura 6 - Vista lateral do corpo de (a) <i>Acromyrmex</i> e (b) <i>Atta</i>	24
Figura 7 - Forrageamento (atividade de corte e carregamento de folhas) de formigas cortadeiras.....	25
Figura 8 - 4-Metilpirrol-2-carboxilato de metila (1) e 3-etil-2,5-dimetilpirazina (2).....	28
Figura 9 - Trilhas de formiga cortadeira no campo.....	29
Figura 10 - Compostos pirrólicos inibidores da enzima IGPD.....	31
Figura 11 - Estruturas do herbicida comercial atrazina (20) e do N-(2-hidroxi-5-cloro)fenil-6-cloropirazina-2-carboxiamida (21), inibidor fotossintético derivado de pirazina.....	31
Figura 12 – Fotos do processo experimental no teste de inibição contra grama. (a) Placas de grama plantadas em bandejas de alumínio; (b) Confecção da trilha após o período de estabilização; (c) Trilha correspondente ao tratamento solução veículo após dez aplicações; (d) Trilha correspondente ao tratamento pirazina após dez aplicações.	37
Figura 13 - Estruturas do ácido 2-pirazinocarboxílico (12), alaclor (13) e 2,4-D (13).....	51
Figura 14 - Médias de massa seca da plântula de milho tratada com diferentes compostos em pré-emergência.....	53
Figura 15 - Médias de massa seca da plântula de pepino tratada com diferentes compostos em pré-emergência.....	54

Figura 16 - Médias de massa seca da plântula de milho tratada com diferentes compostos em pós-emergência.....	55
Figura 17 - Médias de massa seca da plântula de pepino tratada com diferentes compostos em pós-emergência.....	56
Figura 18 - Médias da razão da massa seca aérea (g) por área (cm ²), da rebrota em trilha artificial, em grama tratada com diferentes compostos.....	58
Figura 19 - Médias da razão da massa seca aérea (g) por área (cm ²), da rebrota em trilha artificial, no segundo teste em grama tratada com diferentes compostos.....	59
Figura 20 - Trilhas de forrageamento artificial.....	69
Figura 21 - Amostras da trilha retirada onde foi observada a rebrota após quarenta e dois dias de tratamento com solução veículo (a) e com o ácido 2-pirazinocarboxílico (b).	69
Figura 22 - Trilhas artificiais retiradas, no segundo teste, onde foi observada a rebrota após quarenta e dois dias de tratamento com solução veículo.....	70

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 3.1- Rota sintética do 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila.....	35
Esquema 4.1 - Reação de formação do 2-nitropropan-1-ol (5) e mecanismo proposto para a adição aldólica entre nitroetano (3) e formaldeído (4).....	39
Esquema 4.2 - Reação e mecanismo proposto para a reação de acetilação do 2-nitropropan-1-ol (5).....	40
Esquema 4.3 - Provável fragmentação no espectrômetro de massas acetato de 2-nitropropila (6).....	41
Esquema 4.4 - Síntese do cloridrato do éster metílico da glicina (8) e mecanismo proposto para a reação de esterificação.....	42
Esquema 4.5 - Síntese do éster metílico da <i>N</i> -formilglicina (9) e mecanismo proposto para a reação.....	43
Esquema 4.6 - Síntese do isocianoacetato de metila (10) e mecanismo proposto para a reação.....	44
Esquema 4.7 - Síntese do 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (10) realizada por Barton-Zard.....	46
Esquema 4.8 - Formação dos intermediários da reação de síntese do pirrol (1)....	47
Esquema 4.9 - Mecanismo da reação de síntese do pirrol (1).....	48
Esquema 4.10 - Duplo rearranjo [1,5] sigma-trópico que ocorre para a formação do pirrol (1).....	49
Esquema 4.11 - Provável fragmentação no espectrômetro de massas acetato para o pirrol (1).....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais feromônios de ação desencadeadora e o tipo de modificação comportamental que estes influenciam.....	17
Tabela 2 - Prováveis fragmentações no espectrômetro de massas acetato para o isocianoacetato de metila (10).....	45
Tabela 3 - Médias de massa seca da plântula de milho tratada com diferentes compostos em pré-emergência.....	52
Tabela 4 - Médias de massa seca da plântula de pepino tratada com diferentes compostos em pré-emergência.....	53
Tabela 5 - Médias de massa seca da plântula de milho tratada com diferentes compostos em pós-emergência.....	54
Tabela 6 - Médias de massa seca da plântula de pepino tratada com diferentes compostos em pós-emergência.....	56
Tabela 7 - Médias da razão da massa seca aérea (g) por área (cm ²), da rebrota em trilha artificial, no primeiro teste em grama tratada com diferentes compostos.....	57
Tabela 8 - Médias da razão da massa seca aérea (g) por área (cm ²), da rebrota em trilha artificial, no segundo teste em grama tratada com diferentes compostos.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiácetico

ccd - cromatografia em camada delgada

CDCl_3 - clorofórmio deuterado

CG-EM - cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

CG-DIC - cromatografia gasosa com detector de ionização por chama

CH_2Cl_2 - diclorometano

DMAP - 4-(N,N-dimetilamino)piridina

IE - impacto eletrônico

IV – espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier

IGPD - imidazol glicerol fosfato desidratase

MTBE – metil-terc-butil-éter

RMN - ressonância magnética nuclear

THF – tetraidrofurano

SUMÁRIO:

1 – INTRODUÇÃO.....	12
1.1 - Comunicação Química.....	12
1.1.1 – Ação dos Feromônios e a Percepção Química.....	15
1.2 - Aspectos Gerais e Biológicos das Formigas Cortadeiras.....	18
1.3 - Feromônios de Trilha em Formigas Cortadeiras.....	26
1.4 - Atividade Alomonal Herbicida do Feromônio de Trilha.....	29
2 – OBJETIVO.....	33
3 – METODOLOGIA.....	34
3.1 – Abordagem Sintética.....	34
3.2 – Ensaios Biológicos.....	36
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 – Síntese.....	38
4.2 – Abordagem Sintética.....	51
4.2.1 - Bioensaios em milho e pepino.....	52
4.2.2 - Bioensaios em grama.....	57
5 – CONCLUSÃO.....	60
6 - PARTE EXPERIMENTAL.....	61
6.1 – Materiais e métodos usados na síntese.....	61
6.1.2 - Procedimentos experimentais.....	63
6.1.2.1 - Preparação 2-nitropropan-1-ol (5).....	63
6.1.2.2 - Preparação acetato de 2-nitropropila (6).....	64
6.1.2. 3 - Preparação do cloridrato do éster metílico da glicina (8).....	64
6.1.2. 4 - Preparação do éster metílico da <i>N</i> -formilglicina (9).....	64
6.1.2. 5 - Preparação do isocianoacetato de metila (10).....	65
6.1.2. 6 - Preparação 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (1).....	66
6.2 - Ensaios biológicos.....	67
6.2.1 - Bioensaios para testes de atividade alomonal herbicida em milho e pepino em pós e pré-emergência.....	68
6.2.2 - Bioensaios para testes de atividade alomonal herbicida em grama.....	68
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
8 – APÊNDICES.....	76

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Comunicação Química

O empenho na busca pela compreensão dos aspectos que determinam a forma de comunicação entre os vários tipos de organismo e a identificação das substâncias que estão envolvidas neste processo, desde a estrutura dos compostos até o caminho biossintético para a produção destes, são o foco de estudo da Ecologia Química. Este é um ramo da ciência que vem se desenvolvendo consideravelmente desde os anos 70. A palavra ecologia foi definida por Ernst Haeckel como a ciência que estuda interações entre os organismos e entre organismos e o ambiente em que estes estão presentes (EICHLER, 2005). Assim, a ecologia química estuda as substâncias mediadoras das interações de caráter intra e interespecíficas entre os organismos (STILING e SIMBERLOFF, 1998). Apesar das pesquisas nesta área estarem constantemente em evolução, ainda há muito para ser descoberto nestas interações.

Além do conhecimento de como os insetos interagem com o meio em que vivem, a importância do estudo dos compostos químicos envolvidos neste tipo de comunicação também contribui no controle populacional de insetos praga, causadores de grande prejuízo à agricultura. As pesquisas em ecologia química disponibilizam inovações tecnológicas que trazem vantagens sobre os meios tradicionais, tais como: o aumento de produtividade, a redução nos custos de produção, assim como a diminuição de poluentes agroquímicos lançados ao meio ambiente. Desta forma, as aplicações das descobertas nesta área vêm se destacando como um componente potencial no manejo integrado para um grande número de espécies-praga de importância econômica, trazendo grandes contribuições para a sociedade.

Os animais utilizam vários meios de interação e comunicação, como sinais visuais, acústicos, táteis ou químicos que podem estar atuando isoladamente ou não. A forma com que cada um destes sinais é utilizado difere entre as espécies e está relacionada com a interação desta com seu meio ambiente (PAYNE e BIRCH, 1986 *apud* FERREIRA; CORRÊA; VIEIRA, 2001). Mesmo que todos estes sinais apresentem alguma contribuição na comunicação de certas espécies, os insetos são os que mais dependem da comunicação olfativa, ou seja,

dos sinais químicos, para desempenhar suas atividades comportamentais e conseqüentemente a sobrevivência da espécie (BIRCH e HAYNES, 1982).

Os insetos desenvolveram uma comunicação química característica utilizada para a transferência de informações através de odores entre indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes. De um modo geral, esta comunicação ocorre a partir da emissão de substâncias químicas produzidas por um indivíduo e detectadas por outro indivíduo por meio dos órgãos receptores localizados principalmente nas antenas. Estas informações desencadeiam comportamentos necessários para a sobrevivência dos insetos, tais como: agressividade, defesa, acasalamento, escolha de locais de oviposição, localização de presas, organização das atividades sociais e outros tipos de comportamento (VILELA e DELLA LÚCIA, 1987).

As substâncias químicas envolvidas na comunicação entre os organismos, são denominadas semioquímicos, que significa "sinais químicos". A palavra é derivada do grego *semeion* que diz respeito a marca ou sinal, (NORDLUND e LEWIS, 1976). Em 1971 LAW e REGNIER utilizaram este termo para definir as substâncias químicas que mediam interações entre organismos. Alguns autores utilizam o termo infoquímico para fazer menção a esta classe de substâncias (DICKE e SABELIS 1988). Segundo estes autores os semioquímicos abrangem, além das substâncias químicas envolvidas no fornecimento de informação, as toxinas e nutrientes. Esta nomenclatura ainda não está bem consolidada e nesta monografia o termo escolhido para abordar esta classe de compostos foi semioquímicos.

Os semioquímicos são divididos em aleloquímicos (do grego *allelon*, de um para outro, relação recíproca) quando estas interações são interespecíficas, e em feromônios (do grego *phereum*, carregar; e *hormon*, estimulado ou excitado) quando são intraespecíficas (HARBORNE, 1989). Os feromônios e aleloquímicos são classificados, Fig. 1, de acordo com o tipo de mudança comportamental ou fisiológica que provocam (NORDLUND e LEWIS, 1981).

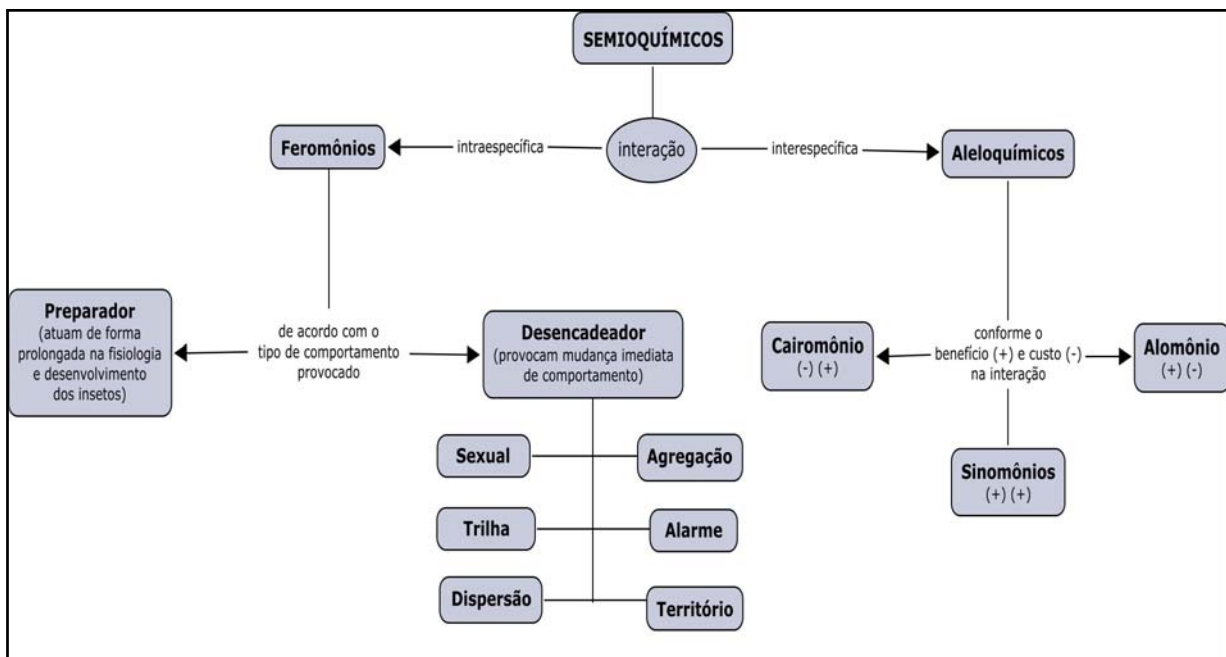


Figura 1 - Classificação dos semioquímicos de acordo com o comportamento indicado. Os sinais (+) e (-) significam benefício e custo na interação, respectivamente. O primeiro sinal refere-se ao organismo emissor enquanto o segundo ao receptor.

Os aleloquímicos desempenham um papel essencial em todas as comunidades na interação entre organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos. Sendo que as relações aleloquímicas dentro destes níveis serão estabelecidas de acordo com o benefício ou custo que os indivíduos terão nesta interação (VILELA e DELLA LÚCIA, 2003). Assim, a classe de semioquímicos que intercede as interações interespecíficas é dividida em cairomônios, alomônios e sinomônios.

As substâncias denominadas cairomônios são semioquímicos relacionados à biologia do organismo emissor que, quando em contato com um indivíduo de outra espécie, o organismo receptor, desencadeará uma resposta adaptativamente favorável ao receptor, e que não beneficia o organismo emissor (VILELA e DELLA LÚCIA, 2003). Os cairomônios, muitas vezes, aparecem mediando as relações ente parasitóides e hospedeiros. Um exemplo comum são os hidrocarbonetos produzidos pelas glândulas mandibulares da praga do algodão *Heliothis virescens* (lagarta-damaça), que acabam atraindo seu inimigo natural, o parasitóide *Cardiochiles nigriceps* (BATISTA-PEREIRA *apud* CORRÊA e VIEIRA, 2007).

Já os alomônios são semioquímicos que desencadearão uma mudança comportamental ou resposta fisiológica que não é favorável ao organismo receptor,

mas beneficia o emissor (VILELA e DELLA LÚCIA, 2003). Os alomônios são usados pelos artrópodes como substâncias de defesa. Alguns exemplos de organismos que usam estes compostos são: as operárias das formigas da espécie *Formica* que produzem substâncias repelentes a animais intrusos (FERREIRA e ZARBIN, 1998). As flores de *Dracula chestertonii* emitem aroma semelhante ao de cogumelos e desta forma atraem moscas-fêmeas (moscas de fungos), as quais normalmente ovipositam nos recipientes nutritivos desses fungos que são fonte de alimento para as futuras larvas. Ao visitar as flores de *D. chestertonii*, as moscas agem como polinizadoras, porém as larvas ao eclodirem, morrem por escassez de alimento (BATISTA-PEREIRA *apud* CORRÊA e VIEIRA, 2007).

Os sinomônios são semioquímicos que desencadeiam uma mudança comportamental ou fisiológica favorável tanto para o organismo receptor quanto para o organismo emissor do sinal (VILELA e DELLA LÚCIA, 2003). O exemplo mais comum são os odores florais associados aos seus polinizadores. Os voláteis florais favorecem as plantas atraindo os polinizadores e estes também são beneficiados, pois além da fonte de alimento encontram parceiros para o acasalamento.

1.1.1 – Ação dos Feromônios e a Percepção Química

No final da década de 1950 as pesquisas arroladas à comunicação química alcançaram um maior desenvolvimento. O primeiro feromônio sexual isolado foi o Bombicol, um álcool de cadeia longa produzido pela fêmea do bicho-da-seda, *Bombyx mori*, usado para atrair os machos para o acasalamento. Este composto foi isolado na Alemanha por Butenandt e colaboradores (KARLSON e BUTENANDT, 1959).

O termo feromônio foi proposto pela primeira vez por Karlson e Lüscher para designar um grupo de substâncias biologicamente ativas que quando são secretadas por um organismo emissor e recebidas por um organismo receptor, da mesma espécie, provocam uma mudança comportamental ou fisiológica bem definida (KARLSON e LÜSCHER, 1959). Assim, cada espécie possui o seu próprio “código” de comunicação baseado nas diferenças estruturais dos compostos químicos que aparecem mediando as interações por meio dos feromônios. Para os insetos este é o tipo de comunicação intra-específico mais importante do que a visão e a audição (DELLA LÚCIA *et al.*, 1993).

Os feromônios, assim como os aleloquímicos, são liberados em baixíssimas quantidades. Por este motivo os insetos desenvolveram um mecanismo muito eficiente na percepção e decodificação das informações provenientes destes compostos. Como existem muitos odores presentes no meio ambiente, este mecanismo é característico de substâncias bioativas (FERREIRA; CORRÊA; VIEIRA, 2001). Segundo Vilela e Della Lúcia (1987, pág. 19):

Os feromônios são constituídos por substâncias multicompostas, que formam um rastro de odor e que contém um gradiente de concentração das diferentes substâncias que o integram; estas substâncias apresentam distintas volatilidades.

Em virtude da natureza multicomponente dos feromônios (VILELA e DELLA LÚCIA, 2003) e da concentração específica de cada substância química que os formam, é possível que mensagens complexas levando diferentes informações sejam emitidas ao mesmo tempo. Quando estas são recebidas, por determinado indivíduo, acarretam um comportamento bem específico, que pode beneficiar o emissor, o receptor ou aos dois organismos envolvidos na interação.

Quando os feromônios agem na fisiologia e no desenvolvimento dos indivíduos apresentando efeito prolongado, provavelmente envolvendo hormônios (WILSON, 1965), são chamados de preparadores, Fig. 1. Já os que atuam diretamente sobre o sistema nervoso central e liberam uma ação imediata no comportamento dos indivíduos são considerados de efeito desencadeador (NORDLUND e LEWIS, 1976). Estes feromônios podem agir como atraentes sexuais, serem marcadores de trilhas, propiciarem comportamentos de agregação, alarme, dispersão, entre outros, como é mostrado na Tabela 1(VILELA e DELLA LÚCIA, 1987).

Tabela 1 - Principais feromônios de ação desencadeadora e o tipo de modificação comportamental que estes influenciam.

Tipo de Feromônio	Mudança comportamental ocasionada
Agregação	Atraem um elevado número de indivíduos.
Alarme	Produzem um estado de alerta pela aproximação de algum predador natural, desencadeando o comportamento de defesa na colônia.
Dispersão	Agem dispersando os indivíduos na presença de um hospedeiro hostil à colônia.
Marcação de território	São usados para a marcação e reconhecimento do próprio território de exploração, garantindo à colônia o alimento e a defesa.
Oviposição	Demarcam o local onde os ovos foram depositados e também são utilizados pelas fêmeas para impedir a postura de outras fêmeas, diminuindo a competição entre larvas por um recurso limitado.
Sexuais	São emitidos com a finalidade de reprodução, uma vez que estes aumentam a probabilidade de sucesso no acasalamento dos insetos.
Trilha	Orientam os indivíduos até a fonte de alimentos e também são usados na exploração de novas áreas.

Quando um semioquímico, após ser emitido, entra em contato com o organismo receptor a resposta comportamental ou mudança fisiológica que ocorrerá está fortemente relacionada com a percepção do inseto a este estímulo. Para um inseto o processo compreendido entre a percepção e a resposta motora envolve vários processos neurofisiológicos, que o capacitarão a responder a um odor característico. Diversos fatores fisiológicos podem agir simultaneamente, determinando a ocorrência, a intensidade da produção e a liberação de um dado semioquímico, bem como a resposta do indivíduo a estes compostos químicos. Além disto, a resposta também é dependente de fatores abióticos, tais como temperatura, umidade, vento e intensidade da luz entre outros (VILELA e DELLA LUCIA, 2003).

A percepção do estímulo químico nos insetos ocorre nas células receptoras localizadas dentro de sensilas ou pêlos olfativos que se encontram principalmente nas antenas (VILELA e DELLA LUCIA, 2003). Esta percepção ocorre inicialmente com a entrada das moléculas do composto químico na antena por difusão,

através dos poros presentes nas sensilas quimiorreceptoras. Posteriormente ocorre o transporte destas substâncias na linfa receptora por meio da interação com proteínas odoríferas de ligação (POLs), estas às conduzirão até as membranas receptoras dos dendritos, que são os prolongamentos mais curtos do neurônio (VOGT e RIDDIFORD *apud* PAYNE e BIRCH, 1986 *apud* FERREIRA; CORRÊA; VIEIRA, 2001). A membrana receptora dos dendritos sofre uma despolarização após entrarem em contato com as moléculas do composto semioquímico. Assim o estímulo químico é transformado em estímulo elétrico. A soma das respostas elétricas provocadas pela ativação de várias células receptoras ao mesmo tempo, gera um potencial elétrico. Este será conduzido até a porção mediana do cérebro que recebe os nervos das antenas, chamado de deutocérebro, ocasionando uma resposta comportamental ao estímulo químico (MANDAVA, 1982).

1.2 - Aspectos Gerais e Biológicos das Formigas Cortadeiras

As formigas são insetos eussociais. Os fatores que ocorrem na colônia de formigas cortadeiras que atribuem esta classificação são:

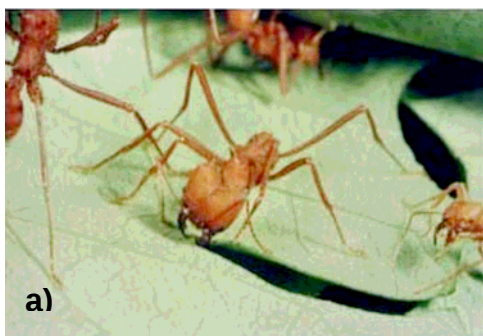
- O cuidado e cooperação entre companheiras de ninho, sendo seus indivíduos considerados altruístas;
- Divisão de tarefas, em que cada casta realiza sua função e apenas um número restrito de indivíduos é responsável pela reprodução;
- A sobreposição de duas ou mais gerações de adultos dentro de um mesmo grupo.

Esses insetos estão presentes em todos os ecossistemas terrestres. Elas se destacam dentre os mais abundantes e freqüentes organismos nesses locais. A elevada capacidade adaptativa das formigas, aliada ao alto grau de organização social que estas possuem, as tornam parte dos insetos considerados mais derivados do planeta (VILELA e DELLA LUCIA, 2003). Segundo Shultz (2000), é provável que 15 a 20% da biomassa terrestre animal seja de formigas. Sendo que este valor é ainda maior, em torno de 25%, nas regiões tropicais em que estas são mais abundantes.

Estima-se que existam em torno de 15.000 espécies de formigas no mundo, das quais aproximadamente 10.000 já foram descritas e pertencem à família Formicidae. Dentro desta, a subfamília Myrmicinae representa o maior agrupamento, e nela está incluída a tribo Attini. Nesta tribo estão presentes doze gêneros de formigas, onde nos gêneros mais derivados, também chamados de attini superiores, estão inclusas as formigas cortadeiras. Destas, cerca de cinquenta espécies são dos gêneros *Atta* conhecidas vulgarmente como saúvas e *Acromyrmex* conhecidas como quenquéns, Fig. 2., (GRIMALDI e AGOSTI, 2000). Estas formigas são encontradas exclusivamente no continente americano, estando distribuídas do sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina (MIKHEYEV; MUELLER; ABBOT, 2006). As formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* em função da importância econômica no Brasil, têm merecido grande atenção dos pesquisadores e nelas concentram-se as principais pesquisas e publicações.

As formigas cortadeiras estão situadas dentro do Reino Animal, Filo Arthropoda, Classe Insecta. Segundo Thomas (1990), este grupo de insetos, é composto de cinco gêneros, dentro da seguinte posição sistemática:

- Ordem: Hymenoptera
- Subordem : Apocrita
- Superfamília : Formicoidea
- Família: Formicidae
- Sub-família: Myrmicinae
- Tribo : Attini
- Gênero: *Atta*, *Acromyrmex*, *Sericomyrmex*, *Trachymyrmex* e *Micoceporus*.



FONTE: (a) <<http://www.uni-bielefeld.de/biologie/Oekosystembiologie/doc/oeko27.html>>
 (b) <http://kudlanky.com/soubory/jiny_hmyz_an.htm>

Figura 2 - (a) Gênero *Atta* sp. (saúva) e (b) gênero *Acromyrmex* sp. (quenquém).

As saúvas e quenquéns são os insetos que causam grandes danos à atividade agro-pastoril-florestal, sendo que os maiores prejuízos ocorrem nas culturas de eucalipto, pinos e citros. Algumas espécies desfolham, indistintamente, mono e dicotiledôneas e por este motivo constituem a pior praga das florestas implantadas (FORTI; CROCOMO; GUASSU, 1987). Estima-se que somente as espécies de *Atta* são responsáveis pelo corte de aproximadamente 15% das folhas produzida nas florestas tropicais da América (CHERRET, 1986 *apud* HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). O desfolhamento de monoculturas gera uma diminuição significativa na produtividade. Uma colônia adulta pode desfolhar uma árvore em menos de 24 horas e consumir até uma tonelada de folhas por ano (WILSON, 1965).

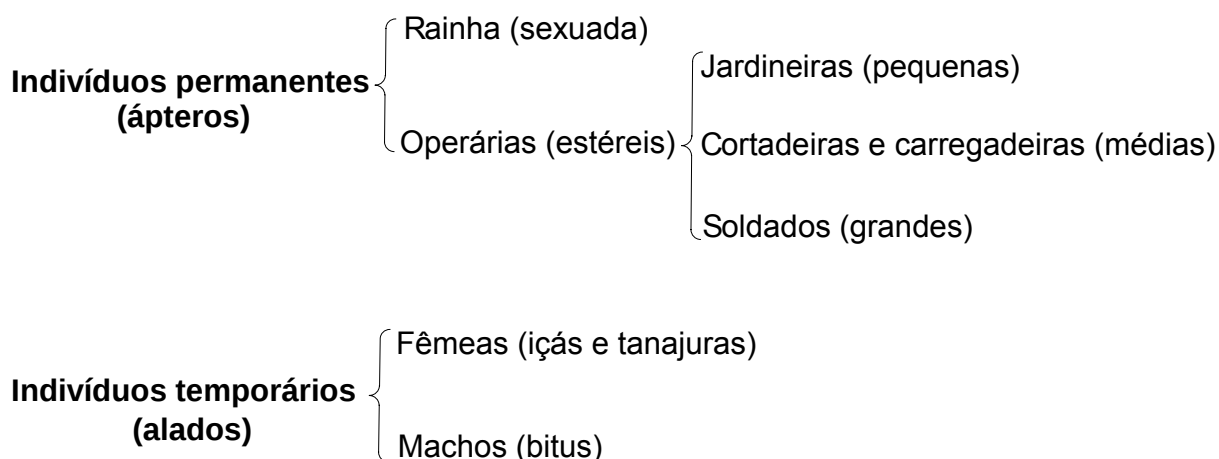
Os ninhos onde vivem as formigas são conhecidos popularmente por formigueiros. Eles podem ser formados por uma ou mais câmaras, dependendo do gênero. Estas câmaras são vulgarmente chamadas de painéis. A formação das colônias de formigas cortadeiras tem início no período das chuvas entre os meses de outubro e novembro. A fêmea virgem alada preparada dentro da colônia, sai do ninho onde nasceu dando início ao vôo nupcial para se acasalar (LIMA; DELLA LÚCIA; SILVA, 2001). Uma fêmea pode se acasalar com até oito machos. A longevidade do macho é bastante curta, pois logo após a cópula, com apenas uma fêmea, ele morre.

A fêmea, uma vez inseminada, encontra um local propício para dar início a um novo formigueiro. A nova rainha começa a abrir um túnel perpendicular no solo até uma profundidade de 8 a 25 cm, onde constrói uma pequena câmara. Ao fixar-se, dá início ao jardim de fungo por meio de um micélio, que é trazido do seu ninho de origem, na cavidade infrabucal. A partir de suas reservas energéticas ocorrerá a deposição dos primeiros ovos. Logo após, a fêmea obstrui o canal de entrada e fica confinada até o surgimento das primeiras operárias (WILSON, 1985). Chegando à maturidade estas operárias passam a ter funções de manutenção e crescimento da colônia, cuidado com a prole e forrageamento. A rainha dedicar-se-á exclusivamente à postura de ovos. Em um período de semanas há um apreciável aumento no número de operárias na colônia (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Este constitui o primeiro estágio de formação da colônia conhecido como estágio de fundação.

Posteriormente, inicia-se o estágio ergonômico (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Neste ocorre o crescimento e desenvolvimento da colônia, e todo trabalho é realizado com esta finalidade. Em certo momento a colônia estabiliza-se

energeticamente havendo uma relação favorável entre o número de indivíduos adultos e larvas. Com esta estabilização o último estágio é alcançado, o estágio de reprodução, onde dá-se início a reprodução dos indivíduos sexuais. Estes são preparados recebendo tratamento e alimentação diferenciada dentro da colônia. Na época da revoada estes indivíduos sairão para copular e em seguida fundarão novas colônias, encerrando o ciclo de vida daquele formigueiro.

A população das formigas cortadeiras é dividida em castas permanentes e temporárias, sendo que nas operárias há um elevado grau de polimorfismo, as castas têm tamanhos e atividades diferenciados dentro da colônia. No gênero *Acromyrmex* o polimorfismo é menos acentuado se comparado com o gênero *Atta* (FOWLER *et al*, 1986).



As içás e bitus surgem em formigueiros adultos alguns meses antes da revoada. Estes indivíduos são maiores que os soldados e as operárias. Os menores indivíduos da colônia são as operárias jardineiras. Além de dar assistência à rainha, elas limpam os pedaços de folhas e os cortam em fragmentos menores, para posteriormente serem incorporados e inoculados com o fungo. As operárias carregadeiras são maiores que as jardineiras, e tem como função a localização, corte e transporte de material vegetal para o interior do formigueiro. Na Fig. 3 (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990) fica evidente a relação entre o tamanho da cabeça e a função das operárias na manutenção do jardim de fungo. Os soldados são responsáveis pela proteção, eles são os maiores indivíduos estéreis dentro da colônia.

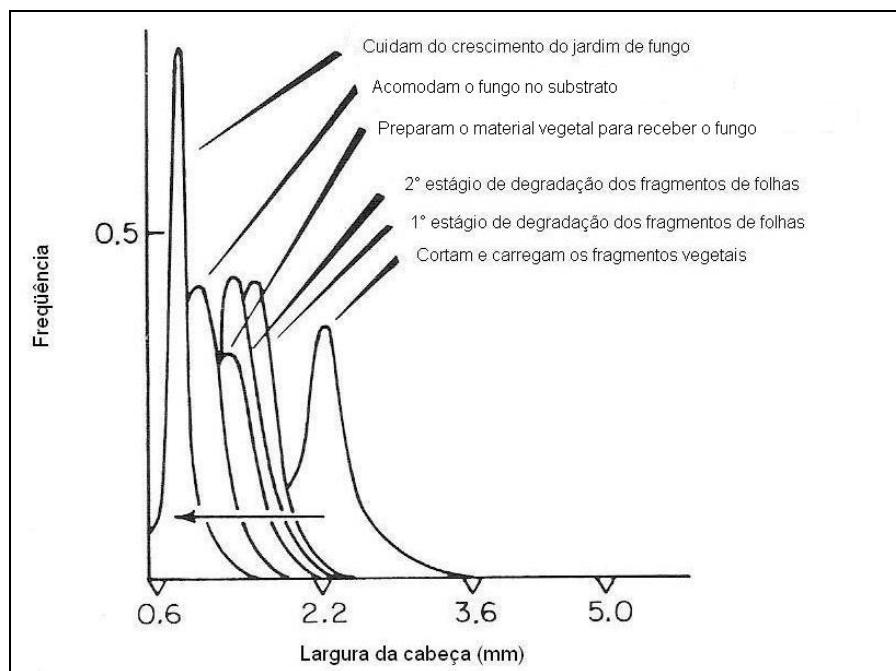
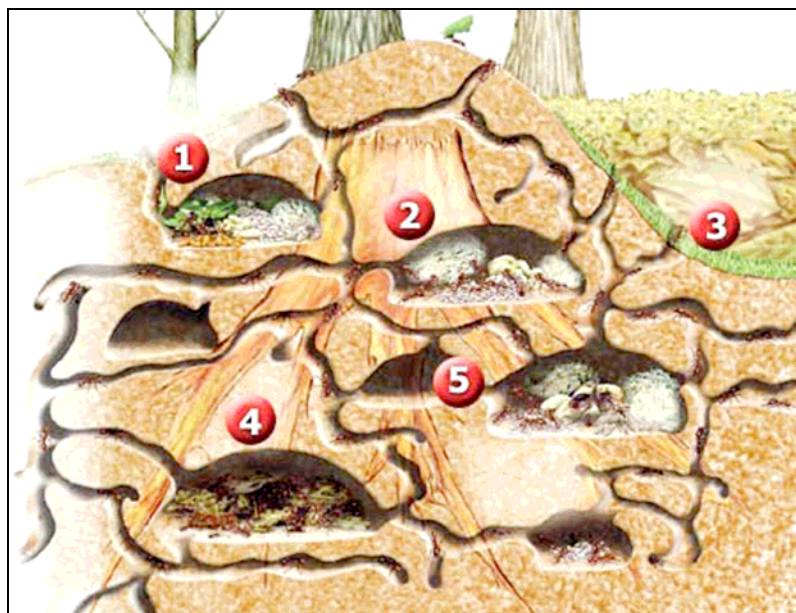


Figura 3 - Especialização de funções relacionadas ao tamanho da cabeça das operárias de *Atta sexdens*.

Os ninhos de *Acromyrmex* são pouco profundos e comumente formados por milhares de indivíduos em uma ou duas câmaras subterrâneas. Algumas espécies fazem o ninho superficialmente coberto de palha, fragmentos e outros resíduos vegetais, enquanto outras o constroem no subterrâneo. Já os ninhos de *Atta*, ou saueiros são construídos no solo e podem ter de dezenas a centenas de câmaras subterrâneas, como é representado na Fig. 4. Estas são ligadas entre si e com a superfície do solo por meio de galerias, podendo ocupar muitos metros quadrados e conter milhões de indivíduos (LIMA; DELLA LÚCIA; SILVA, 2001).

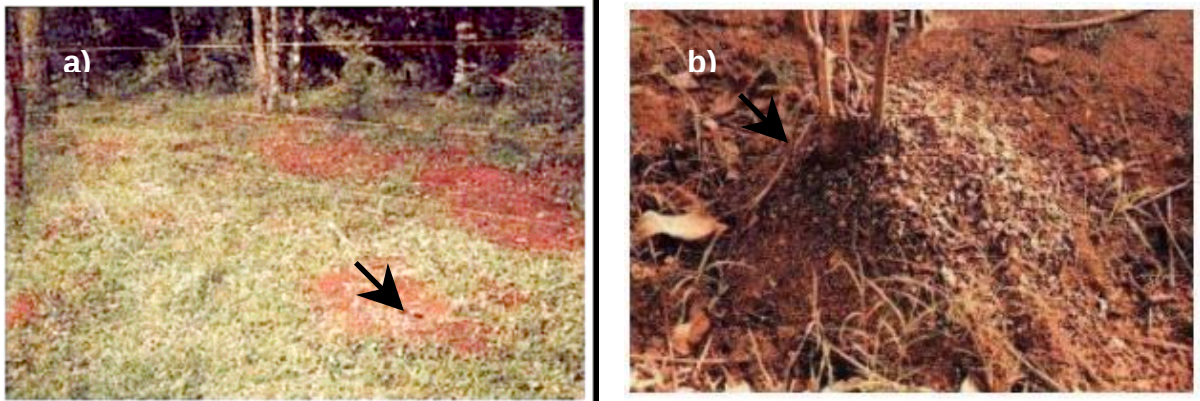


FONTE: http://revistagalileu.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg_article_print/.html

Figura 4 - Esquema de um ninho ou formigueiro de *Atta* sp.: 1) câmara com larvas e pupas; 2) câmaras ou panelas; 3) câmara com soldados; 4) câmara com lixo 5) câmara com rainha.

Dentro das panelas as formigas cultivam o fungo, “panela de fungo”, que é a principal fonte de alimentação da colônia, abrigando também ovos, larva e pupas. Existem outras panelas onde as formigas depositam todos os resíduos do cultivo do fungo e os indivíduos mortos, sendo denominadas de “panela de lixo” (WILSON, 1985).

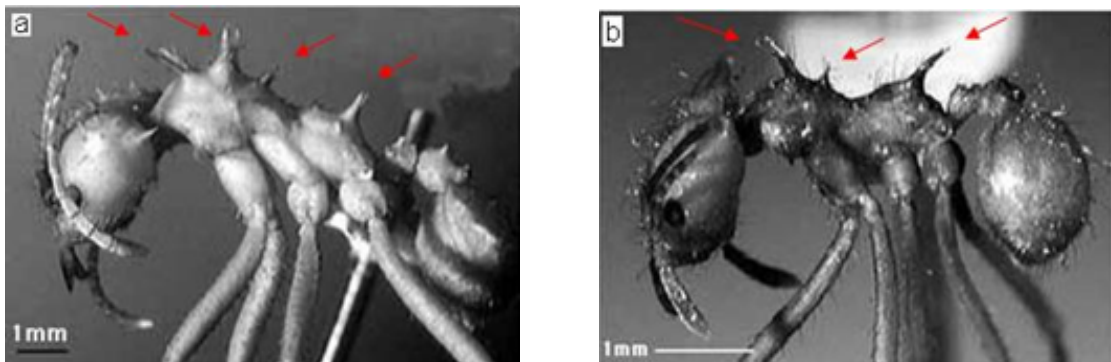
Uma característica para a identificação de um saúveiro é um monte de terra solta aparente, também conhecido como murundú, localizado na superfície do solo, que é formado pelo acúmulo de terra que as formigas retiram das câmaras do subsolo (LIMA; DELLA LÚCIA; SILVA, 2001). Sobre e fora do monte de terra solta, são encontrados orifícios denominados olheiros, onde podem ou não ser observadas as saúvas em atividade. O número e o formato dos montes de terra solta, o formato dos olheiros, que podem abrir-se diretamente na superfície do solo ou aparentar um funil, facilitam a identificação de algumas espécies de saúvas. No Brasil são conhecidas e catalogadas 13 espécies de saúvas e 28 espécies de quenquéns. Na Figura 5, se pode observar a vista externa dos formigueiros de *Atta* e *Acromyrmex*.



Fonte: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=12511>.

Figura 5 - Vista externa do formigueiro: a) *Atta* sp. b) *Acromyrmex* sp.

Outras diferenças entre os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são o tamanho médio das formigas, o número de pares de espinhos dorsais no tórax que elas apresentam e o número de rainhas dentro da colônia. As operárias do gênero *Acromyrmex* possuem de quatro ou cinco pares de espinhos (Fig. 6.a), são geralmente menores medindo de 8 a 10 mm e suas colônias podem ser poligínicas. Já as operárias gênero *Atta* possuem três pares de espinhos dorsais no tórax (Fig. 6.b), medem de 12 a 15 mm e suas colônias são monogínicas (LIMA; DELLA LÚCIA; SILVA, 2001).



Fonte: Longino (2004).

Figura 6 - Vista lateral do corpo de (a) *Acromyrmex* e (b) *Atta*.

Normalmente as formigas cortadeiras são ativas à noite, porém em áreas sombreadas, como as florestas, as atividades de corte e carregamento de folhas, Fig. 7, podem ocorrer durante o dia (ANJOS; MOREIRA; DELLA LUCIA *apud* DELLA LUCIA, 1993).



Fonte: <<http://www.uni-bielefeld.de/biologie/Oekosystembiologie/doc/oeko27.html>>.

Figura 7 - Forrageamento (atividade de corte e carregamento de folhas) de formigas cortadeiras.

A maioria das espécies de formigas cortadeiras faz trilhas externas que são marcadas com substâncias químicas, feromônio de trilha, produzidas pelas próprias formigas servindo para orientar as demais operárias até a fonte de alimento e no retorno ao ninho.

Durante muito tempo pensou-se que o material vegetal cortado e carregado para o interior das colônias subterrâneas fosse consumido diretamente como alimento pelas formigas cortadeiras, o que não acontece. Escavando-se um formigueiro, encontra-se em suas câmaras subterrâneas uma massa esponjosa de cor branco-acinzentada, constituída pelo material vegetal que as formigas carregam para o interior de seus ninhos cortado em minúsculos pedaços e por um fungo, da espécie *Leucocoprinus gongylophorus*, que se desenvolve nutrido pelos vegetais picados caracterizando uma relação simbiótica. No interior do ninho, as operárias jardineiras cortam os pedaços de folhas em pedaços menores e depois “lambem” estes pedaços visando eliminar microrganismos indesejáveis. Os fragmentos de folha, após a limpeza, são inoculados com o fungo e incorporados ao jardim ou “esponja” de fungo (LIMA; DELLA LÚCIA; SILVA, 2001).

Porém o fungo não é a única fonte de alimento das formigas, as operárias adultas alimentam-se principalmente da seiva liberada durante o forrageamento. A dieta destes indivíduos é apenas suplementada pelo fungo (ROCKWOOD e HUBBEL, 1987). A alimentação das larvas é baseada somente no fungo cultivado. A dieta da

rainha é constituída de ovos específicos postos por operárias em certos intervalos de tempo (QUINLAN e CHERRETT, 1979 *apud* HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

O fungo cultivado pelos indivíduos da tribo attini é proveniente de diferentes substratos, como: folhas verdes ou secas, flores, frutos, fezes e insetos mortos. Entretanto somente nos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* é que este cultivo ocorre unicamente a partir de folhas frescas (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Alguns estudos minuciosos sobre os fungos cultivados pelas formigas cortadeiras, especialmente as do gênero *Acromyrmex*, relatam que tal fungo necessita de substrato de origem vegetal para o seu desenvolvimento, sendo a celulose a principal fonte de carbono para o meio.

1.3 - Feromônios de Trilha de Formigas Cortadeiras

As formigas se comunicam através de sinais táteis e químicos, e todas as espécies são capazes de usar a comunicação química, com a finalidade de fornecer informações adicionais através do olfato. A comunicação química através dos feromônios é a principal forma de integração da colônia de insetos sociais (YAMAGATA *et al*, 2005). Eles são utilizados para uma diversidade de funções, tais como: identificação dos membros da colônia e sua casta, orientação e recrutamento para exploração de fontes de alimento, regularização da reprodução, alarme dos membros sobre alguma situação de perigo e identificação do estágio de vida da prole (VILELA e DELLA LUCIA, 2001).

O feromônio de trilha é uma mistura de substâncias depositada sobre uma superfície por um primeiro indivíduo e detectada por outros indivíduos da mesma espécie (VILELA e DELLA LUCIA, 2001). Estas substâncias são utilizadas pelos insetos sociais para orientar outros insetos pertencentes à mesma colônia na direção da fonte de alimento, de novos sítios de moradia, no retorno ao ninho ou para exploração de novas áreas (ATTYGALLE e MORGAN, 1985).

A primeira proposta de que a trilha das formigas era marcada por meio de substância de odor foi indicada em 1770 por Chales Bonnet, que passando o dedo várias vezes sobre o mesmo ponto de uma trilha, fez com que as formigas se desorientassem por alguns instantes (VILELA e DELLA LUCIA, 2001).

A eficiência na busca e exploração de novas fontes de substrato decorre da utilização do feromônio de trilha pelas formigas. As formigas cortadeiras recrutam os membros da colônia para fonte de material vegetal depositando o feromônio de trilha no caminho de volta para o ninho. O depósito de pequenas quantidades, na faixa de picogramas, leva ao recrutamento de um grupo massivo de formigas e desencadeia o comportamento de seguir a trilha e coletar o substrato vegetal (MOSER *apud* KLEINEIDAM *et al*, 2005).

As formigas exibem o comportamento de seguir trilha marcada quimicamente, movendo-se através do vapor criado pela difusão do feromônio no ar. As trilhas são duráveis, estáveis e facilmente detectadas pelas formigas, uma vez que quando as operárias retornam ao longo da trilha adicionam uma nova quantidade de feromônio a ela para que este persista até que o alimento acabe. As trilhas de formigas do gênero *Atta* podem perdurar por meses, sendo a deposição do feromônio constante (VILELA e DELLA LUCIA, 2003). A qualidade e quantidade do alimento encontrado são informadas através das trilhas formadas pelas forrageiras (SCHWEITZER *et al*, 1997). As formigas detectam a trilha movimentando suas antenas de um lado para outro (caminho em ziguezague), testando as moléculas do odor. O benefício deste movimento é evitar a exposição constante à mesma concentração de substâncias químicas. Desta forma a habituação ao feromônio é evitada. Essa capacidade de orientação através de um gradiente de concentração é chamada de quimiotropotaxia (WILSON *apud* VILELA e DELLA LUCIA, 2001).

Os feromônios de trilha de formigas geralmente são constituídos de múltiplos compostos. Provavelmente, cada espécie produz alguma substância química, em proporções bem definidas, em adição ao odor básico da substância de trilha que atrairá somente os membros da sua própria espécie (MOSER, *apud* KLEINEIDAM *et al*, 2005). No final da década de 60, os cientistas Moser e Silverstein descobriram que o feromônio de trilha de *Atta texana* era composto por, no mínimo, duas frações, uma muito volátil e outra menos volátil. Estudos posteriores identificaram dois compostos voláteis presentes nos feromônios de trilhas de formigas cortadeiras das espécies *Atta* e *Acromyrmex*, que são: 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (1) e a 3-etil-2,5-dimetilpirazina (2) produzidos na glândula de veneno (TUMLINSON *et al*, 1971), Fig. 8. A grande maioria das formigas cortadeiras têm estes dois compostos

presentes no feromônio de trilha. A proporção de cada composto varia de acordo com as espécies, assim uma pode evitar a trilha de outra (CROSS *et al*, 1979).

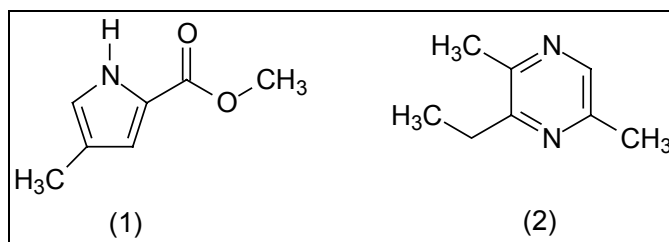


Figura 8 - 4-Metilpirrol-2-carboxilato de metila (1) e 3-etil-2,5-dimetilpirazina (2).

Apenas uma operária pode ser responsável pelo recrutamento de um grande número de operárias para o forrageamento. Jaffé e Howse (1979) relacionaram as principais características para o recrutamento em massa das cortadeiras nas espécies de *Atta* e *Acromyrmex*:

- O recrutamento é induzido e regulado unicamente por sinais químicos, que é o feromônio de trilha;
- A quantidade de substância química depositada na trilha regulará o número de operárias que deixam o ninho para o forrageamento;
- O feromônio de trilha orienta as operárias até a fonte do substrato para o cultivo do fungo, bem como o retorno ao ninho;
- O feromônio de trilha é constituído de uma mistura de compostos voláteis e, por isto, é preciso que este seja permanentemente reforçado sobre a trilha.

Contudo as operárias não se orientam unicamente pelas marcas químicas, mas também baseiam-se em outras informações como estímulos visuais, marcas físicas, posição do sol e outros fatores espaciais quando se deparam com deterioração ou destruição da trilha química, quando se perdem ou mesmo durante a formação da trilha (LIMA; DELLA LÚCIA; SILVA, 2001). Estas evidências indicam que as trilhas químicas não possuem polaridade. Assim no constante processo de orientação as formigas-cortadeiras também se baseiam em outras informações. Porém primeiramente elas se valem da presença da trilha química (VILELA e DELLA LÚCIA, 2003).

1.4 - Atividade Alomonal Herbicida do Feromônio de Trilha

As trilhas de formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* têm como peculiaridade o fato de serem livres de vegetação, e permanecerem assim por meses ou anos (HOWARD, 2001), Fig. 9. As trilhas são limpas para facilitar a locomoção das formigas, uma vez que qualquer empecilho que esteja presente nela reduz a eficiência no forrageamento. As trilhas são construídas e expandidas de acordo com o tamanho e o nível de atividade da colônia.



Figura 9 - Trilhas de formiga cortadeira no campo.

Esta observação sugere o questionamento de algumas hipóteses. Uma delas é que algum componente pode estar atuando como herbicida. Este pode ser um produto não volátil e ainda não identificado, presente no feromônio de trilha. Também pode-se sugerir a existência de metabólitos que possam ser produzidos dentro da glândula de veneno proveniente do metabolismo das formigas. A oxidação dos compostos feromonais pode ser citada como exemplo. Tais substâncias excretadas poderiam apresentar atividade herbicida e estariam sendo depositadas juntamente com o feromônio de trilha. A dificuldade encontrada na identificação destas substâncias até o momento, é justificada pelo fato destas não serem voláteis nas condições usadas normalmente para análise. Uma vez que os métodos tradicionais

de análise de metabólitos utilizam a cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM), a volatilidade dos componentes do feromônio e demais compostos analisados é primordial para que se tenha sucesso na caracterização através desta técnica analítica.

Uma outra possibilidade seria o fato das formigas estarem constantemente realizando a limpeza mecânica da trilha. Assim o crescimento de qualquer tipo de vegetação nesta área é impedido. Em 2001 Howard desenvolveu um detalhado trabalho sobre o custo de manutenção e limpeza de trilhas ativas em colônia de *Atta columbica*. Neste estudo fica evidente que a confecção das trilhas representa um grande investimento de tempo e energia para a colônia. O autor relata a existência de um grupo de formigas dentro da colônia cuja função é especificamente a limpeza e manutenção das trilhas. Estes indivíduos teriam um tamanho intermediário entre as carregadeiras e os soldados, constituindo cerca de 4 a 5 % da população.

Por último, pode haver a possibilidade de algum dos componentes do feromônio de trilha possuir dupla função. Além de sua atividade feromonal comprovada, pode agir também como alomônio, demonstrando atividade herbicida. Desta forma a germinação e rebrota de vegetação presente na área de ação do feromônio seria impedida. É em uma averiguação minuciosa desta hipótese que este trabalho foi baseado.

A busca pela descoberta de novos herbicidas, menos tóxicos ao meio ambiente, vem crescendo consideravelmente. Neste contexto o aminoácido histidina, por ser de suma importância para o desenvolvimento de plantas, chama a atenção de muitos pesquisadores. Ele está presente em animais, que o obtêm através da alimentação. Entretanto apenas vegetais o biossintetizam. Schweitzer e colaboradores (2002) apontaram alguns compostos heterocíclicos pirrólicos como inibidores da enzima imidazol glicerol fosfato desidratase (IGPD), que é essencial no caminho biosintético da histidina. Como pode ser observado na Fig. 10, os inibidores da enzima IGPD apresentam grande semelhança estrutural com o 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila, composto presente no feromônio de trilha de formigas cortadeiras.

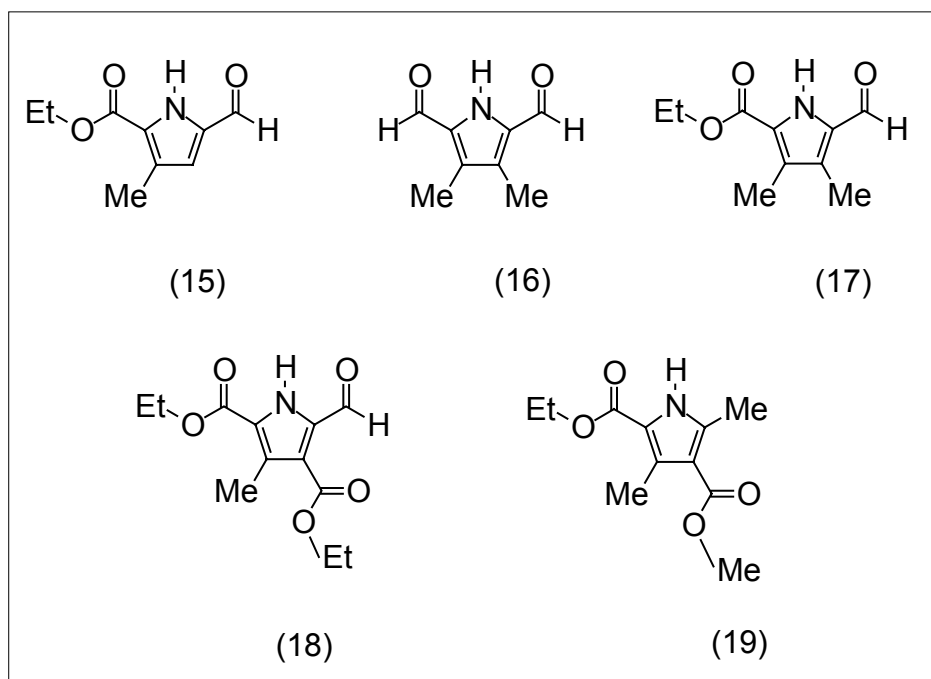


Figura 10 - Compostos pirrólicos inibidores da enzima IGPD.

Na literatura também se encontram relatos de alguns compostos derivados do ácido pirazinocarboxílico que possuem atividades herbicidas. Em 1999 Dolezal e colaboradores testaram a inibição fotossintética em espinafre usando pirazinas tri substituídas nas posições 2, 3 e 5. os efeitos foram comparados com a atividade biológica da atrazina (20), um conhecido herbicida comercial muito eficaz. Os resultados mostraram que o composto N-(2-hidroxi-5-cloro)fenil-6-cloropirazino-2-carboxiamida (21), Fig. 11, que é um derivado do ácido 6-cloro-2-pirazinocarboxílico, na concentração de 8 $\mu\text{mol/L}$ é tão ativo quanto a atrazina (20) em concentração oito vezes menor.

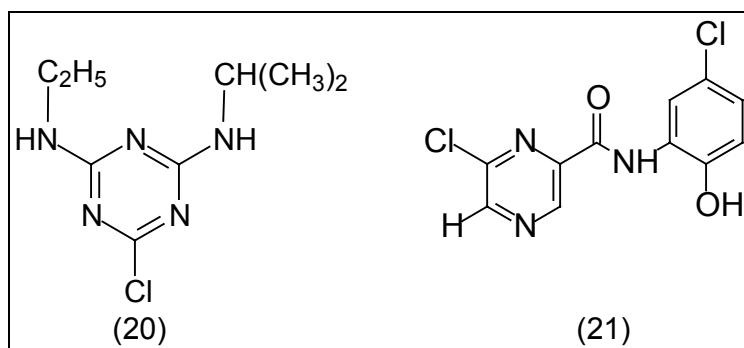


Figura 11 - Estruturas do herbicida comercial atrazina (20) e do N-(2-hidroxi-5-cloro)fenil-6-cloropirazino-2-carboxiamida (21), inibidor fotossintético derivado de pirazina.

Estas ocorrências deram base ao estudo mais detalhado da possibilidade do feromônio de trilha possuir uma dupla função. O fato deste ter alguma atividade herbicida implicaria em economia de tempo e energia na limpeza da trilha. O que reforça as afirmações sobre o grande sucesso evolutivo das formigas cortadeiras da tribo Attini.

Além disto, o conhecimento dos compostos presentes no feromônio de trilha, assim como nos demais tipos de feromônio de formigas e de outros insetos, é de grande importância para o desenvolvimento de uma alternativa no controle de insetos-praga. A aplicação de feromônios na agricultura, como forma de monitoramento populacional ou em armadilhas de captura de insetos, é hoje uma realidade cada vez maior, tanto em outros países como no Brasil. Neste aspecto o emprego de feromônios vem ao encontro das duas principais vertentes que preocupam o setor agrícola nacional, que são a produção de alimentos com a menor concentração possível de resíduos tóxicos e a redução no custo da produção.

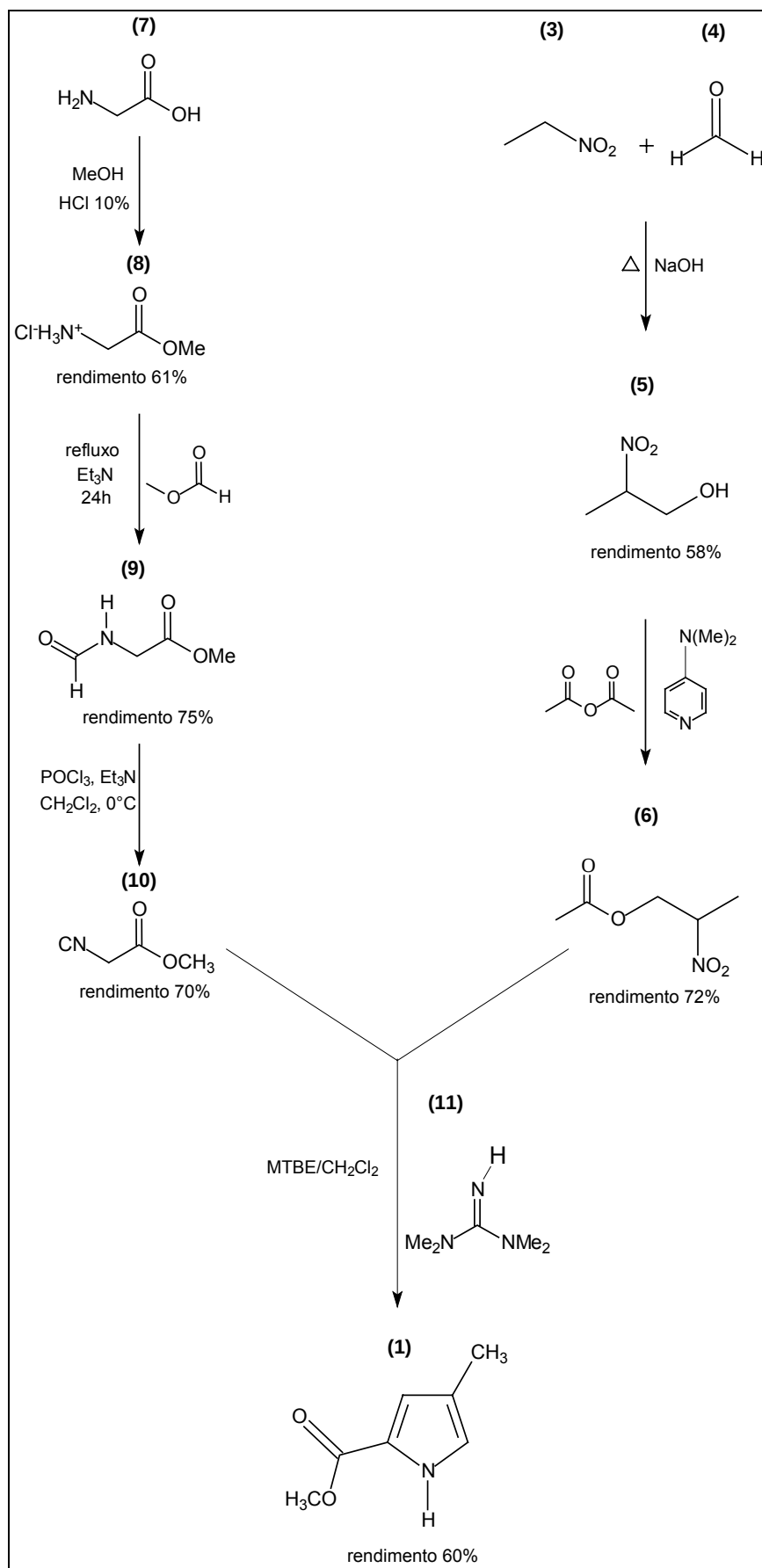
2 – OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo sintetizar um dos constituintes do feromônio de trilha de formigas cortadeiras, o 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (1), e investigar sua atividade alomonal, assim como da 3-etil-2,5-dimetilpirazina (2) que também está presente neste feromônio.

3 – METODOLOGIA

3.1 – Abordagem sintética

A rota sintética para a preparação do 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (1), composto presente no feromônio de trilha de formigas cortadeiras, foi fundamentada nos trabalhos de Barton, Kervagoret e Zard (1990) e Apurba Bhattacharya e colaboradores (2005). Para formar o pirrol (1), o acetato de 2-nitropropila (6) e o isocianoacetato de metila (10) reagiram na presença de uma base forte, a *N,N,N',N'*-tetrametil-guanidina (11). O isocianoacetato de metila (10) foi sintetizado em três etapas a partir da glicina (7), já o composto (6) foi obtido a partir do nitroetano (3) e do formaldeído (4) que reagiram em meio básico originando o 2-nitropropan-1-ol (5). Este último sofreu uma acetilação formando o composto (6). O esquema 3.1. mostra a rota sintética completa de obtenção do pirrol (1).



Esquema 3.1- Rota sintética do 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila.

3.2 – Ensaios Biológicos

Os ensaios biológicos de verificação da atividade herbicida dos compostos presentes no feromônio de trilha de formigas cortadeiras foram realizados em conjunto com o Setor de Semioquímicos e o Setor de Plantas Daninhas e Medicinais do Centro de Ciência e Tecnologia Agrária - CCTA.

Os ensaios foram feitos com milho, pepino e grama de jardim. Todos os testes foram realizados em casa de vegetação. No milho e pepino, os testes visaram avaliar a inibição do desenvolvimento da parte aérea e radicular das plantas. Esta avaliação foi feita em dois estágios, períodos de pré e pós-emergência. Em pré-emergência as sementes foram plantadas em vasos e a após o plantio estes foram borrifados com 2,0 mL da solução veículo contendo 100 ppm de cada tratamento testado, sendo efetuadas quatro replicatas para cada tratamento. A aplicação dos tratamentos foi feita somente uma vez, logo após o plantio das sementes, no ensaio em pré-emergência, que foi finalizado trinta dias após o plantio. Em pós-emergência os tratamentos foram aplicados vinte dias após o plantio e ainda foram feitas três reaplicações a cada cinco dias. Cinco dias após a última reaplicação o ensaio foi encerrado, totalizando 40 dias após o plantio.

Na grama o intuito foi analisar a inibição da rebrota em trilhas artificiais. Nos dois testes realizados as placas de grama foram cortadas medindo 18X15 cm, e plantadas em bandejas de alumínio que continham solo (Fig. 12. a). Foram realizadas cinco repetições para cada tratamento. Após um período de estabilização, confeccionou-se em cada placa uma trilha artificial medindo 15x4cm (Fig. 12. b). Imediatamente após a confecção das trilhas, foram aplicados 20,0 mL da solução veículo contendo 100 ppm de cada tratamento testado. A cada quatro dias eram feitas reaplicações dos tratamentos, dois dias após a décima aplicação o ensaio foi encerrado (Fig. 12. c), totalizando 42 dias.

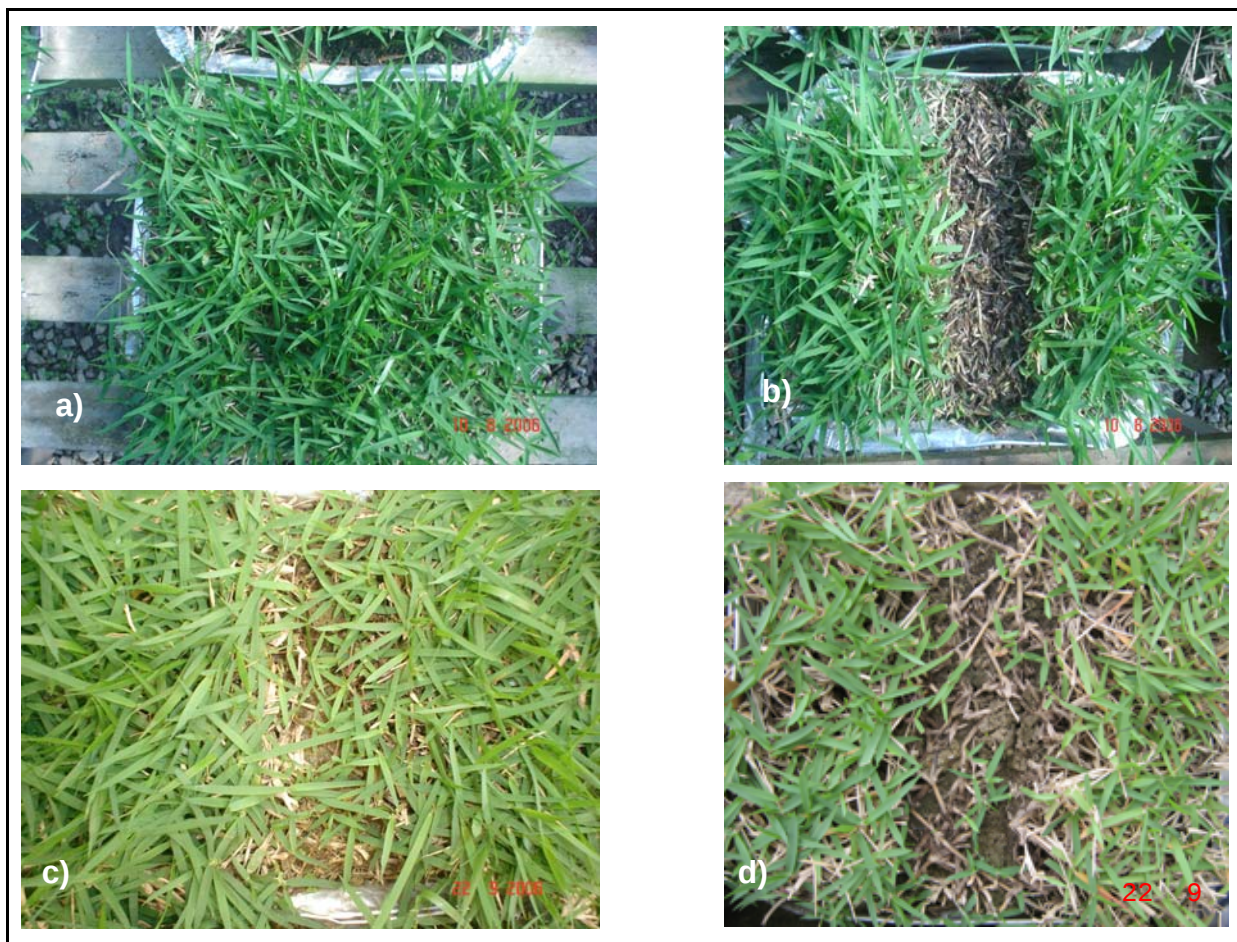


Figura 12 – Fotos do processo experimental no teste de inibição contra grama. (a) Placas de grama plantadas em bandejas de alumínio; (b) confecção da trilha após o período de estabilização; (c) trilha correspondente ao tratamento solução veículo após dez aplicações; (d) trilha correspondente ao tratamento pirazina após dez aplicações.

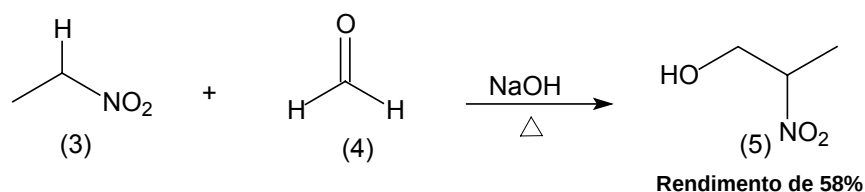
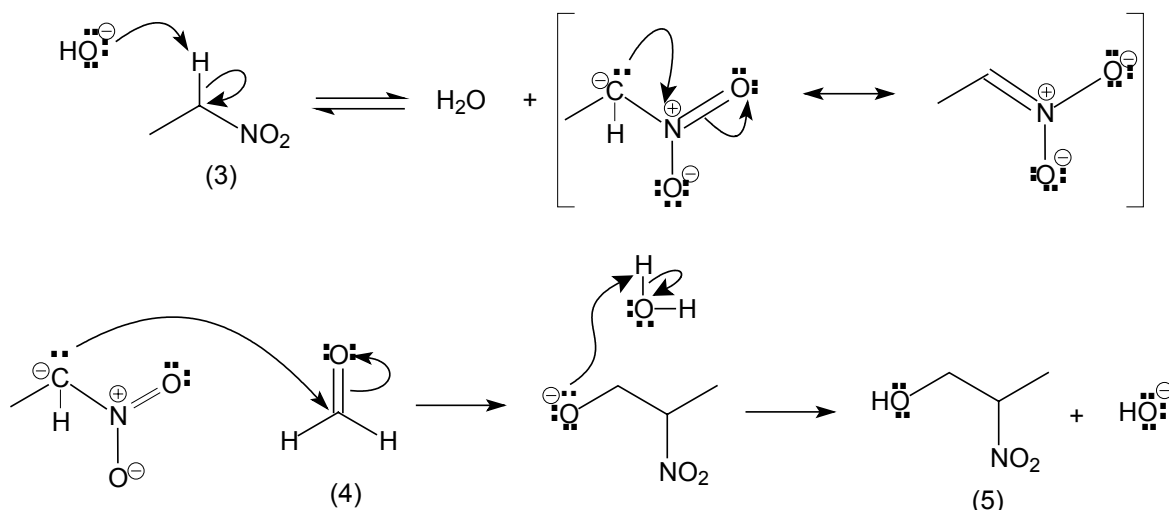
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Abordagem Sintética

Dos compostos presentes no feromônio de trilha de formigas cortadeiras, que foram usados nos ensaios biológicos da atividade alomonal herbicida, apenas o pirrol (1) foi sintetizado. A pirazina (2) foi adquirida comercialmente (*Acros Organics*, 99%) e empregada sem maiores purificações.

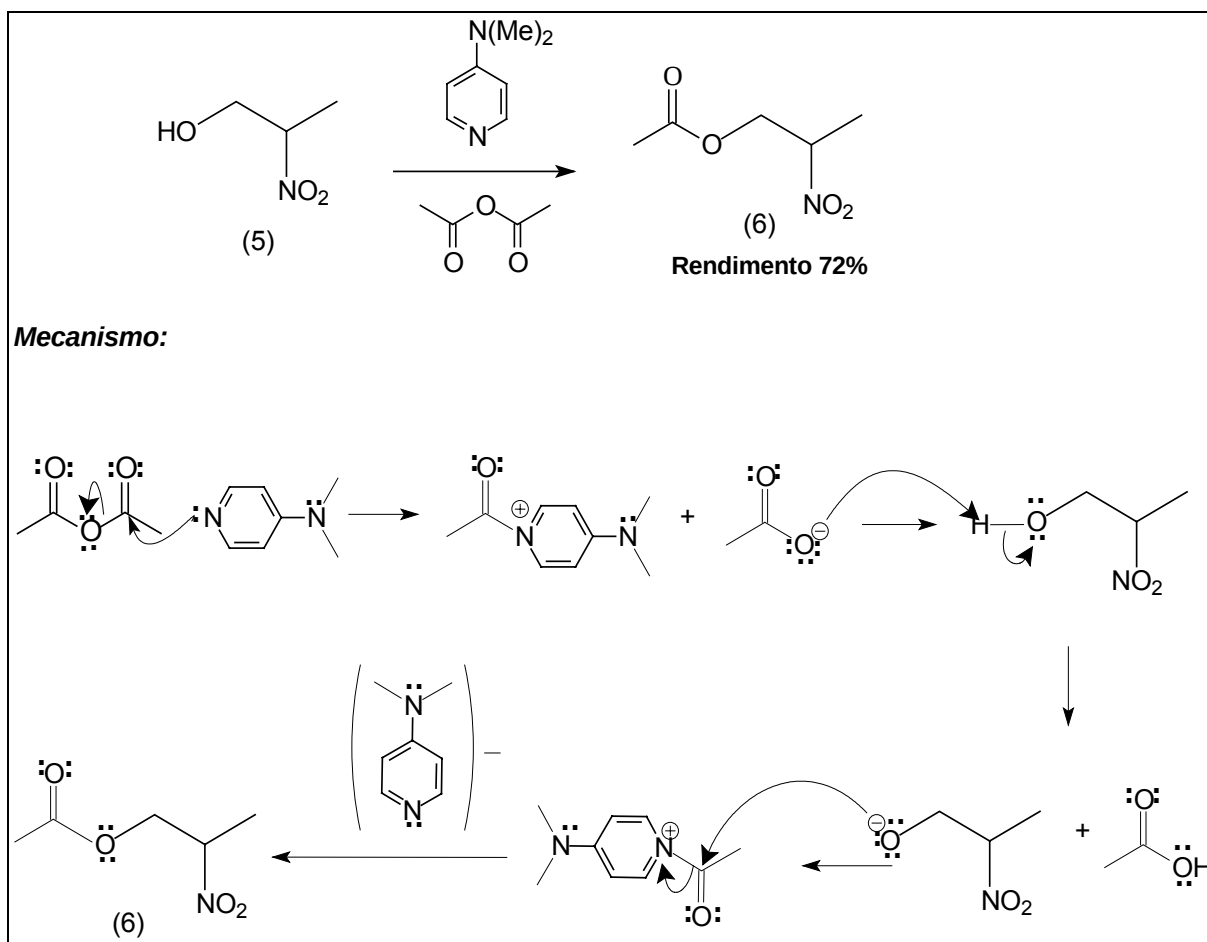
O pirrol (1) foi sintetizado através do método de Barton-Zard (BARTON, KERVAGORE e ZARD, 1990). Neste ocorre uma reação entre o acetato 2-nitropropila (6) e o isocianoacetato de metila (10) em presença de uma base. A reação ocorre em uma etapa, onde há a formação *in situ* do nitroalqueno que sofrerá a adição nucleofílica, dando início ao processo de ciclização do anel pirrólico.

O composto (6) é obtido em duas etapas. Na primeira delas adotou-se o método descrito por Feuer e Miller (1961), onde há a formação do 2-nitropropan-1-ol (5) a partir do nitroetano (3) e formaldeído (4) em presença de NaOH. No mecanismo proposto para esta reação, esquema 4.1, ocorre uma desprotonação na posição do nitroetano pelo íon hidróxido, formando um carbânion sal nitroato. Posteriormente a solução que contem o sal é adicionada à do paraformaldeído. Assim, ocorre o ataque nucleofílico do carbânion à carbonila do aldeído (4) (SYKES, 1985). Por último ocorre o ataque da água do meio reacional, formando o composto (5) com a restituição a base.

Reação:**Mecanismo proposto:**

Esquema 4.1 – Reação de formação do 2-nitropropan-1-ol (5) e mecanismo proposto para a adição aldólica entre nitroetano (3) e formaldeído (4).

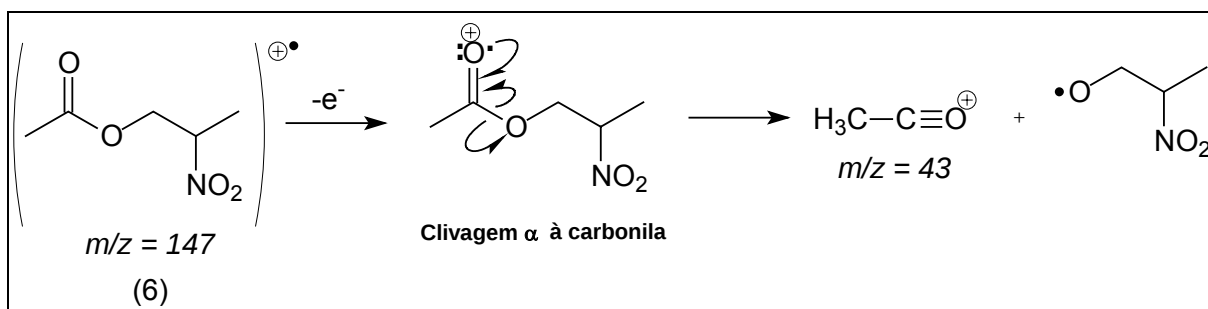
Na segunda etapa, o 2-nitropropan-1-ol (5) é acetilado com anidrido acético com catálise nucleofílica por 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP). Uma proposta mecanística é sugerida no esquema 4.2. Neste a reação tem início com o ataque do nucleófilo à carbonila do anidrido. Posteriormente ocorre um ataque nucleofílico à carbonila do intermediário formado carregado positivamente, como este é um bom grupo abandonador, facilita a reação de acetilação produzindo o acetato de 2-nitropropila (6).



Esquema 4.2 - Reação e mecanismo proposto para a reação de acetilação do 2-nitropropan-1-ol (5).

Os dados de infravermelho (APÊNDICE A) para o acetato de 2-nitropropila (6) mostram em 856 cm^{-1} o sinal de deformação axial da ligação C-NO₂. Em 1229 cm^{-1} aparece o sinal característico de deformação axial da ligação C-O. O espectro também apresenta o sinal de deformação da ligação axial simétrica do O=N⁺-O⁻ em 1361 cm^{-1} e a deformação assimétrica em 1560 cm^{-1} . Em 1751 cm^{-1} aparece um forte sinal típico de deformação axial da ligação C=O. O indício de a acetilação ter sido completa é a ausência do sinal largo característico da função álcool, na região de $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$.

No espectro de massas (APÊNDICE B) apresenta somente um sinal em 4,6 min. No fragmentograma observa-se o íon base com m/z igual a 43. Uma atribuição possível para este íon seria uma clivagem α à carbonila.



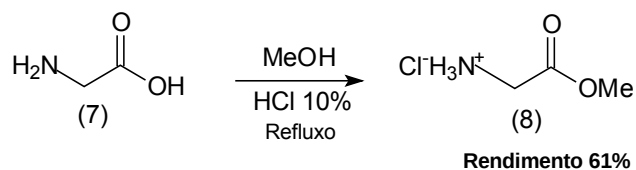
Esquema 4.3 - Provável fragmentação no espectrômetro de massas acetato de 2-nitropropila (6).

Os deslocamentos químicos obtidos a partir do espectro de RMN de ^1H (APÊNDICE C), para o composto (6) mostram um duplete em 1,54 ppm que corresponde ao acoplamento dos hidrogênios da metila β ao grupo nitro com os hidrogênios do metino. Em 2,05 ppm aparece um simpleto que é característico de metila, relativamente desblindada por estar ligada ao grupo acetato. Em 4,38 ppm observa-se um duplete oriundo do acoplamento do hidrogênio α ao grupo nitro com os hidrogênios do carbinólicos. O metino α ao grupo nitro é caracterizado pelo multiplete em 4,77 ppm.

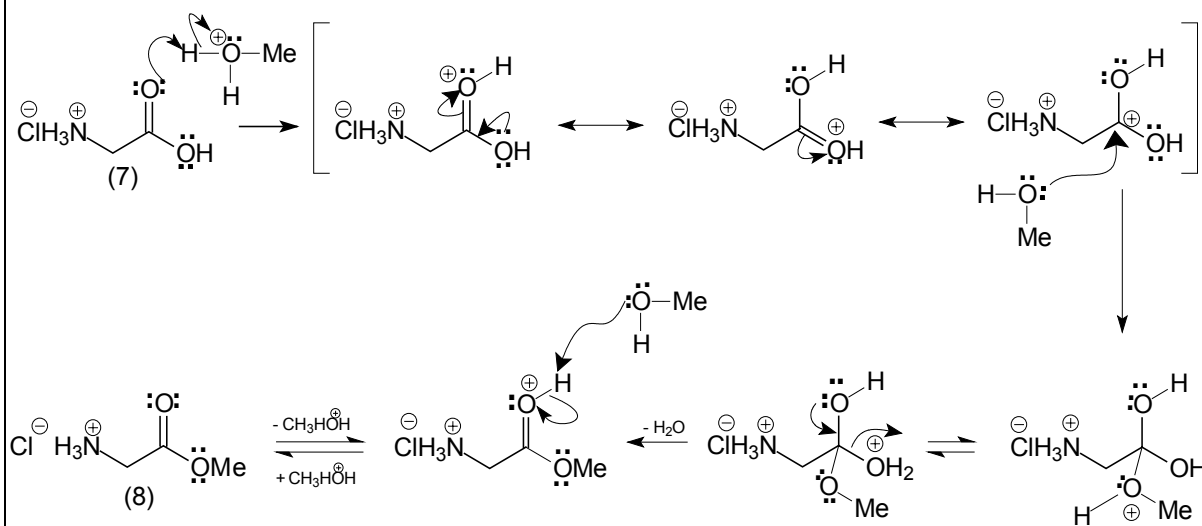
Para a síntese do segundo precursor para a formação do pirrol (1), o isocianoacetato de metila (10), foram necessárias três etapas. Na primeira delas adotou-se o protocolo experimental descrito por Furniss (1989). Neste ocorre a reação entre a glicina (7) e metanol acidificado por ácido clorídrico. Uma proposta mecanística encontra-se no esquema 4.4, onde o sal da glicina aceita um próton do catalisador ácido forte. Após isto, o álcool, que é o solvente da reação, ataca o grupo carbonila protonado fornecendo um intermediário carregado positivamente. Após trocas intermoleculares de prótons a hidroxila é protonada, gerando um bom grupo de saída: a água. Com a perda de água o éster protonado é gerado e, em seguida é desprotonado regenerando o próton.

Assim que o meio reacional é resfriado, em banho de gelo e sal, ocorre a formação de um precipitado identificado como sendo o sal do éster glicina (8).

Reação:

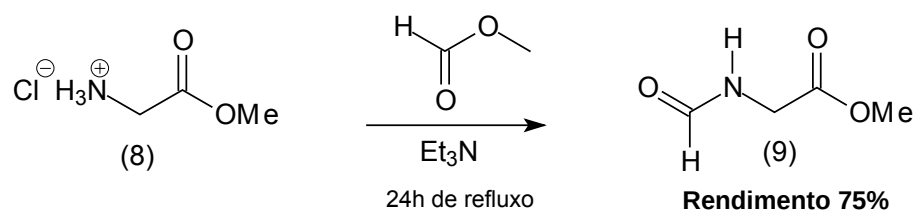
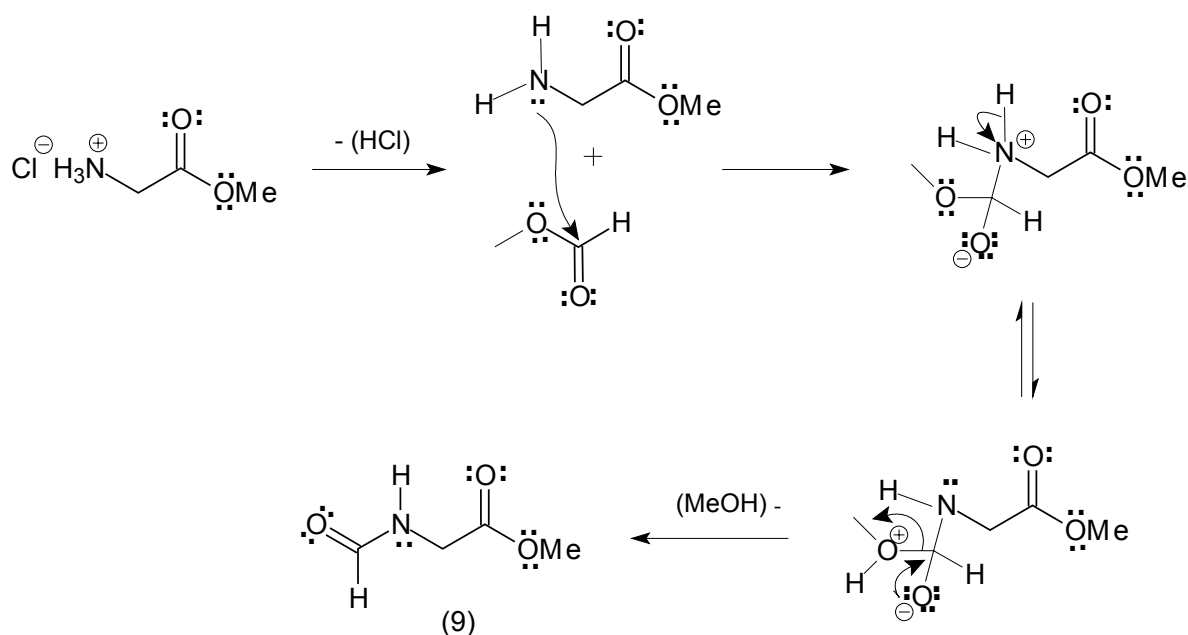


Mecanismo proposto:



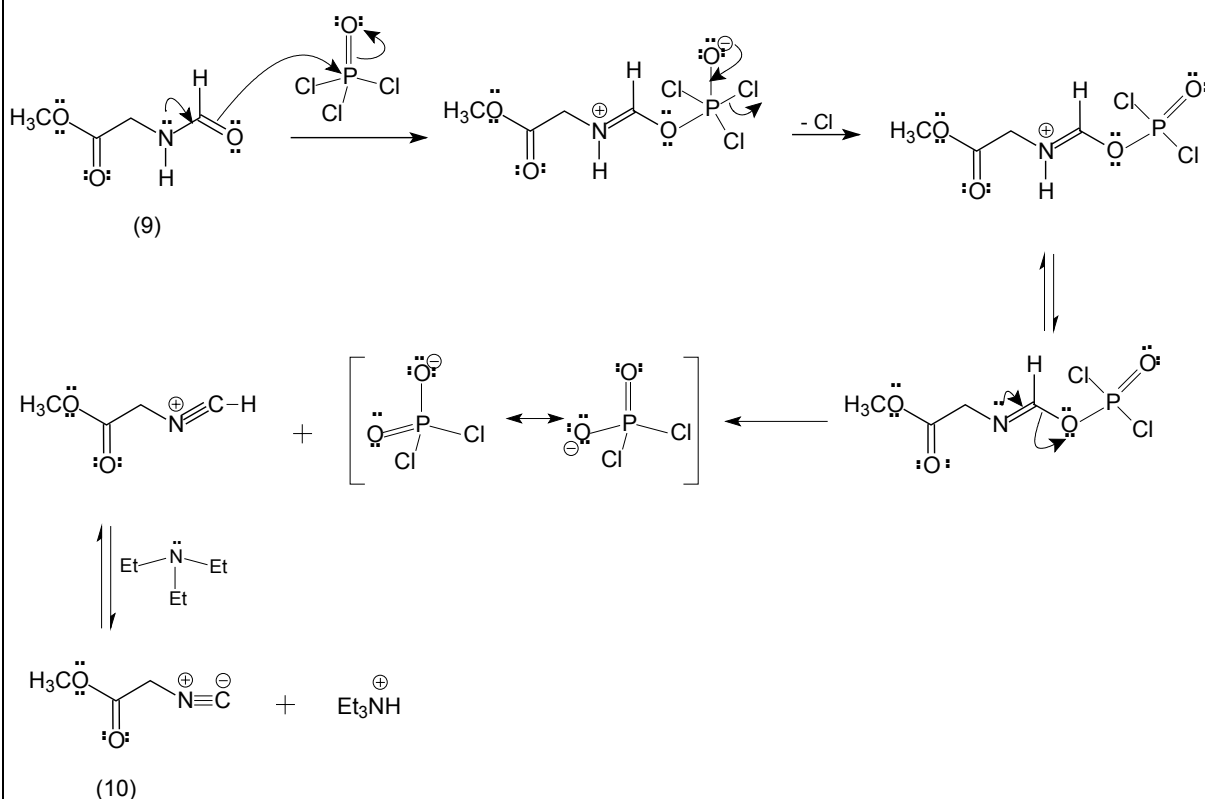
Esquema 4.4 - Síntese do cloridrato do éster metílico da glicina (8) e mecanismo proposto para a reação de esterificação.

Na segunda e terceira etapas seguiu-se o protocolo descrito por Hartman e Weinstock (1988). Primeiramente ocorre a *N*-formilação do composto (8) com formiato de metila em meio basificado com trietilamina, esquema 4.5.

Reação:**Mecanismo proposto:**

Esquema 4.5 - Síntese do éster metílico da *N*-formilglicina (9) e mecanismo proposto para a reação.

Na terceira etapa o POCl_3 , que é um ótimo agente secante, tem como função retirar a água gerada no meio reacional basicado por trietilamina sob atmosfera inerte de N_2 . Assim, o isocianoacetato de metila (10) é formado (HARTMAN e WEINSTOCK, 1988), esquema 4.6. Durante este processo, observa-se que a coloração do o meio reacional se torna vermelha com o passar do tempo.

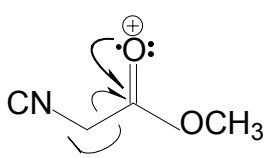
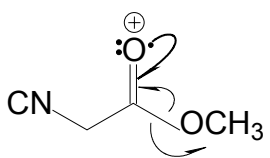
Reação:**Mecanismo proposto:**

Esquema 4.6 - Síntese do isocianoacetato de metila (10) e mecanismo proposto para a reação.

A extração do produto foi feita com CH_2Cl_2 , e posteriormente este foi destilado sob pressão reduzida ($75-76^\circ\text{C}$ a 10 mmHg), resultando em um líquido claro, que foi armazenado sob atmosfera inerte e sob temperatura abaixo de 4°C .

O cromatograma em fase gasosa do isocianoacetato de metila (APÊNDICE D) mostra somente um sinal em 6,42 minutos. No fragmentograma aparecem os íons de m/z igual a 59 e m/z 68. Os fragmentos iônicos prováveis para estas espécies são mostrados na Tabela 2.

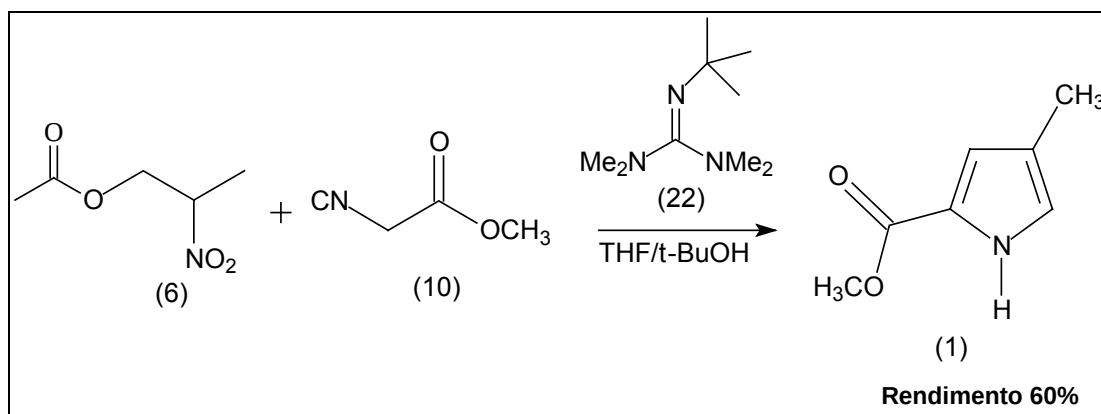
Tabela 2 - Prováveis fragmentações no espectrômetro de massas acetato para o isocianoacetato de metila (10).

Íons (m/z)	% do pico base	Clivagem	Fragmento iônico
59	100	α à carbonila 	$\text{O}^+=\text{C}-\text{OCH}_3$
68	33	α à carbonila 	$\text{CN}-\text{C}^+=\text{O}$

Como esperado, o espectro de RMN de ^1H do composto (10) apresenta dois doublets (APÊNDICE E). O primeiro deles aparece em 3,84 ppm, caracterizando a metila ligada ao oxigênio, que corresponde a metoxila da função éster. O segundo sinal caracteriza o metileno α -carbonílico, observado por um doublet em 4,27 ppm no espectro de ^1H .

No espectro de RMN de ^{13}C (APÊNDICE F) obtido para o isocianoacetato de metila (10), o carbono referente a metoxila da função éster é caracterizado pela presença de um sinal negativo em 53,4 ppm. Outros três sinais positivos são observados. Os sinais em 161,4 e 164,5 correspondem respectivamente ao carbono com hibridização sp ligado ao nitrogênio e a carboxila da função éster.

O 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila foi obtido com 60% de rendimento. Este foi igual ao relatado por Barton (BARTON; KERVAGORE e ZARD, 1990). Sendo que na reação descrita por Barton e colaboradores, esquema 4.7, o pirrol (1) foi obtido utilizando uma guanidina com grande impedimento estérico, por ter um grupo t-butil ligado ao nitrogênio. Esta base é a *N*-terc-butil-*N'*,*N'*,*N''*,*N''*-tetrametilguanidina (22), conhecida como base de Barton (BARTON; ELLIOTT e GÉRO, 1981).



Esquema 4.7 - Síntese do 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (1) realizada por Barton-Zard.

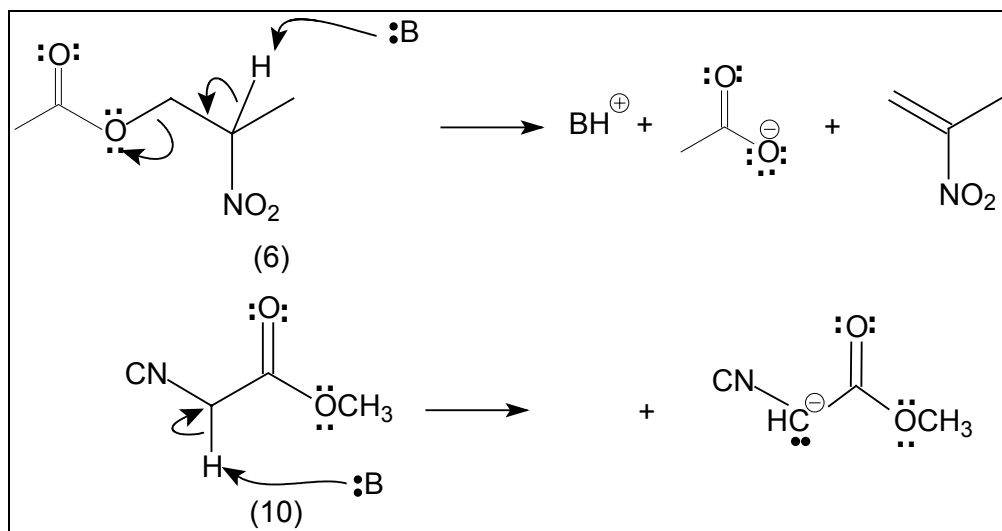
Neste trabalho, foi usada a *N,N,N',N'*-tetrametilguanidina (11), na síntese o pirrol (1). Esta base tem um pK_{BH}^+ igual a 23,3 (SIGMA-ALDRICH, 2003) e é bem mais barata que a base de Barton. Utilizando terc-butanol (BuOH) e tetraidrofurano (THF) como solventes, conforme é descrito no protocolo de Baton. Os melhores rendimentos obtidos na reação variam entre 17-24%.

Em 2006 foi publicado um trabalho sobre os efeitos dos solventes em síntese orgânica de pirróis pelo método de Barton-Zard por pesquisadores do departamento de química da Universidade de Kingsville (BHATTACHARYA, *et al*, 2006).

Estes pesquisadores realizaram um estudo visando desenvolver um método que aumentasse os rendimentos na síntese e pirróis segundo o protocolo experimental descrito por Barton, uma vez que, este normalmente leva a rendimentos consideravelmente baixos. Os autores conseguiram um aumento significativo no rendimento na síntese do 3,4-dietil-2-pirrol carboxilato de etila (98–100%), apenas com a substituição do solvente terc-butanol por metil-terc-butil éter (MTBE). Os rendimentos encontrados para a obtenção do mesmo produto usando o BuOH variavam entre 45-50%. Ainda não foram realizadas pesquisas detalhadas dos mecanismos que levam a uma melhor compreensão neste processo.

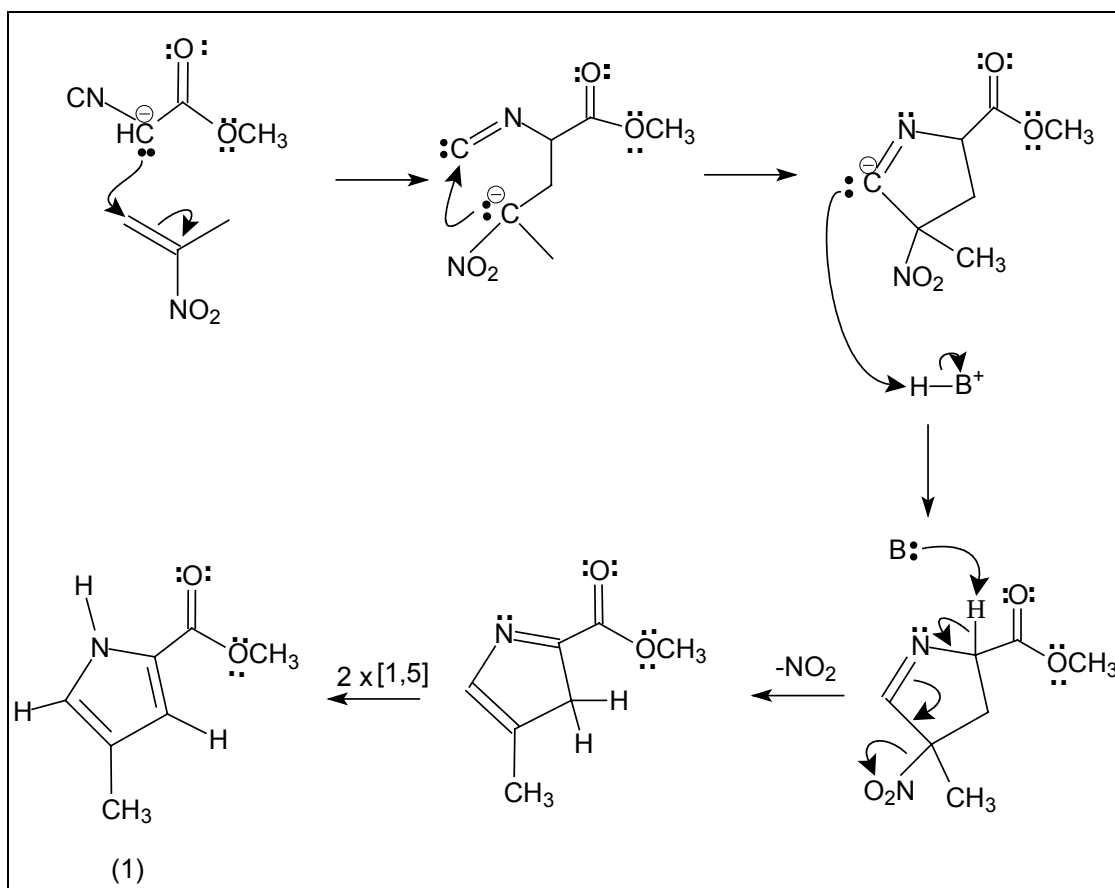
Este estudo induziu a troca do solvente. Seguindo o protocolo experimental de Barton, porém usando o MTBE, o rendimento alcançado foi o mesmo do relatado por Barton. Este foi um ótimo resultado considerando que a base empregada na síntese tem um impedimento estéreo inferior à de Barton, o que levaria ao aparecimento de reações colaterais indesejadas.

A formação do pirrol (1) tem início com o ataque da base (11) ao acetato de 2-nitropropila (6), que com a eliminação de acetato, forma o 2-nitropropeno *in situ*. Simultaneamente ocorre o ataque da base ao isocianoacetato de metila (10), originando um nucleófilo.



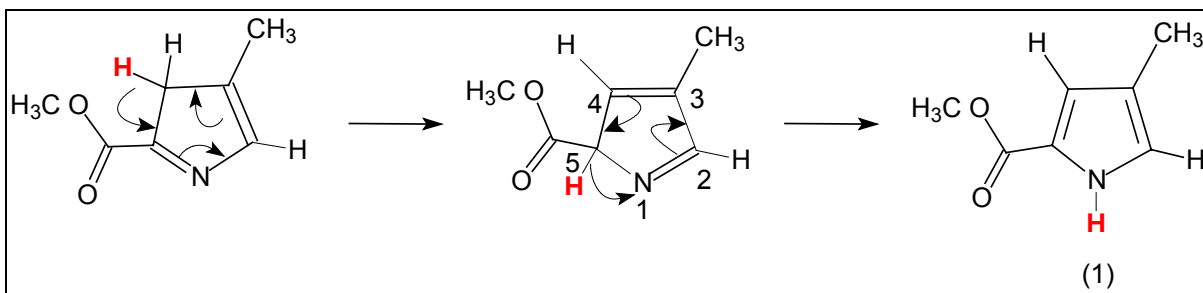
Esquema 4.8 – Formação dos intermediários da reação de síntese do pirrol (1).

Com os dois intermediários formados ocorrerá uma adição de Michael do nucleófilo ao 2-nitropropeno. Após esta adição, acontece a migração de um par de elétrons do carbono α -NO₂, fechando o anel. Após o fechamento ocorre a eliminação de nitrito e, em seguida, um duplo rearranjo [1,5] sigmatrópico, restaurando a aromaticidade do anel pirrólico, esquema 4.9.



Esquema 4.9 - Mecanismo da reação de síntese do pirrol (1).

Os mecanismos envolvidos nos rearranjos sigmatrópicos levam em consideração a simetria dos orbitais de fronteira (HOMO e LUMO). É esta simetria que justifica a ocorrência do rearranjo [1,5] sigmatrópico na formação do pirrol. Este rearranjo tem início com a quebra da ligação sigma (σ), entre carbono e hidrogênio, e migração do próton. Posteriormente a ligação π se move ocorrendo o rearranjo dos elétrons, e ao término do rearranjo uma nova ligação (σ) é formada. Como a aromaticidade do anel ainda não foi restituída, ocorre um novo rearranjo. O rearranjo [1,5] sigmatrópico é suprafacial, uma vez que a migração do hidrogênio da espécie intermediária está na mesma face do sistema π . O esquema este rearranjo é mostrado a seguir.

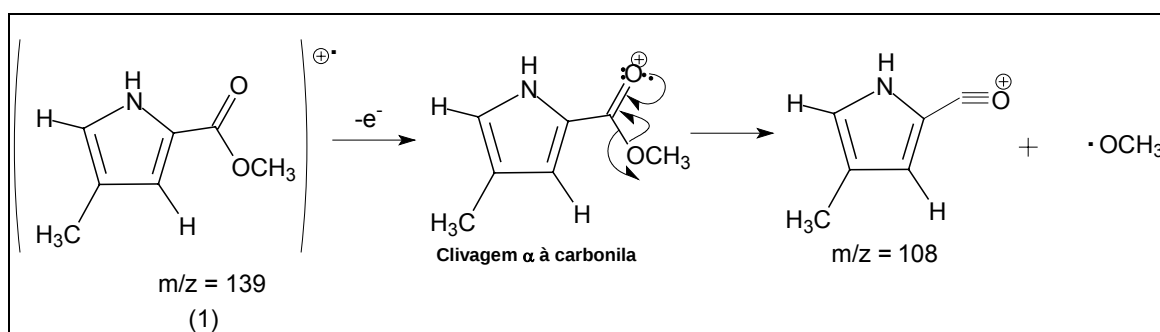


Esquema 4.10 – Duplo rearranjo [1,5] sigma-trópico que ocorre para a formação do pirrol (1).

A caracterização do 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila foi realizada por medida de ponto de fusão, IV, CG-EM e RMN de ^1H e ^{13}C . O ponto de fusão medido foi de 71,5-72,5 °C. Este valor está muito próximo do descrito por Sonnet (1972), que varia na faixa de 72,5-73,5 °C.

O espectro de infravermelho (APÊNDICE G) apresenta um sinal em 1213 cm^{-1} referente à deformação axial assimétrica acoplada das ligações $\text{C}=\text{O}$ -O. Também estão presentes os sinais em 1448, 1489 e 1578 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos das ligações $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático, confirmando a ciclização. Há em 1674 cm^{-1} o sinal característico da deformação axial da ligação $\text{C}=\text{O}$. Outro sinal relevante é o da deformação axial da ligação $\text{N}-\text{H}$ em 3285 cm^{-1} .

No espectro de massas do composto (1) observa-se o sinal em m/z 139 que corresponde ao íon molecular, além de um sinal, cuja atribuição seria devido a uma clivagem α à carbonila resultando em uma espécie de m/z 108 (APÊNDICE H).

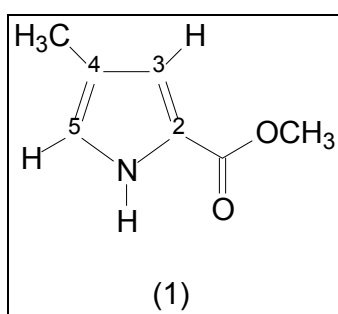


Esquema 4.11 - Provável fragmentação no espectrômetro de massas acetato para o pirrol (1).

No espectro de RMN de ^1H para o pirrol (1) (APÊNDICE I), observa-se um simpleto em 2,098 ppm correspondente aos hidrogênios da metila ligada ao anel na posição 4. Os hidrogênios da metila ligada ao grupo acetato são mais desblindados e

aparecem em um simpleto em 3,832 ppm. Dois simpletos muito próximos são observados em 6,724 e 6,717 ppm, estes correspondem aos hidrogênios ligados ao anel nas posições 5 e 3 respectivamente. Também há um sinal largo em 9,075 ppm característico de hidrogênio ligado a nitrogênio de anel pirrólico.

O espectro de RMN de ^{13}C (APÊNDICE H) obtido para o pirrol (1), mostra três sinais negativos. Em 162,030 ppm aparece um sinal que correspondem à carbonila da função éster. Em 122,195 e 120,888 ppm estão os sinais dos carbonos 2 e 4 do anel pirrólico, Fig. 13. Na parte positiva do espectro aparecem outros quatro sinais. Os carbonos ligados nas posições 5 e 3 do anel têm os respectivos deslocamentos 121,335 e 116,037 ppm. Em 51,386 ppm há um sinal referente ao carbono da metoxila a função éster e em 11,924 ppm está o sinal do carbono da metila ligada na posição 4 do anel pirrólico.



4.2 – Ensaios biológicos

Em todos os ensaios biológicos foi realizado um tratamento utilizando o ácido pirazino-2-carboxílico (12). O feromônio de trilha é armazenado na glândula de veneno das formigas cortadeiras. Ali pode ocorrer alguma reação que transforme os compostos do feromônio de trilha em um derivado menos volátil, como um ácido, por exemplo. É claro que a confirmação desta hipótese necessita de pesquisa mais aprofundada como a microderivatização de compostos presentes no extrato desta glândula.

Nos ensaios também foram usados herbicidas comerciais como forma de controle experimental. No primeiro teste de inibição contra grama o herbicida alaclor (13) foi empregado como controle. Nos testes realizados em milho, pepino e no segundo teste de inibição contra grama, o herbicida usado foi o ácido 2,4-diclorofenoxiacético, conhecido popularmente como 2,4 – D (14). As estruturas destes compostos, assim como a do ácido pirazino-2-carboxílico (12), são mostradas na Fig. 13.

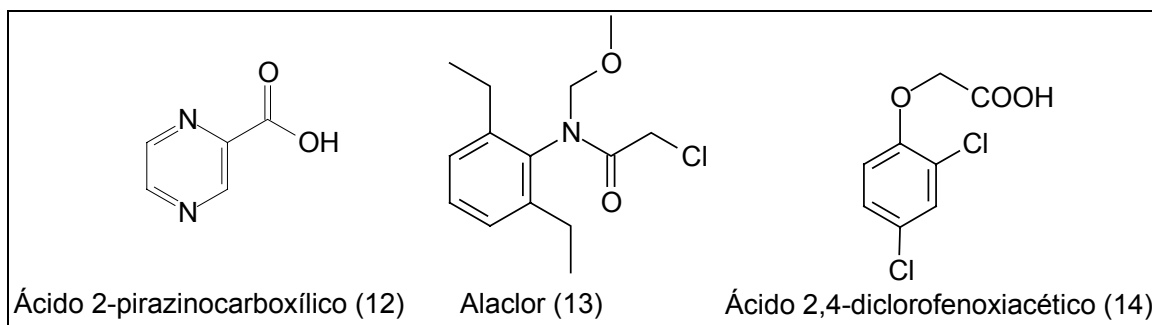


Figura 13 - Estruturas do ácido 2-pirazinocarboxílico (12), alaclor (13) e 2,4-D (13).

4.2.1 - Bioensaios em milho e pepino

Os ensaios realizados em milho e pepino visaram avaliar o efeito dos compostos testados em dois estágios: pré e pós-emergência. No primeiro o objetivo foi analisar se de alguma forma os composto afetavam a germinação das plantas. No segundo estágio, o objetivo foi avaliar se haveriam efeitos no desenvolvimento das plantas formadas.

Os testes realizados em pré-emergência no milho, assim como os realizados no pepino, não apresentaram diferenças estatísticas da solução veículo. Ambos foram diferentes somente do controle com o herbicida comercial. No milho, o fato das sementes usadas serem selecionadas e a alta resistência que esta gramínea apresenta, justificam os resultados negativos no ensaio. O milho mostrou-se tão resistente, que nem no tratamento realizado utilizando o 2,4-D houve uma inibição expressiva. Estes resultados podem ser vistos na Tabela 3 e na Fig. 14.

Tabela 3 - Médias de massa seca da plântula de milho tratada com diferentes compostos em pré-emergência.

Tratamentos	Média da massa seca (g)*	Desvio padrão (g)
Solução veículo	0,9384 a	± 0,1405
4-Metilpirrol-2-carboxilato de metila (1)	1,1885 a	± 0,1654
4-Metilpirrol-2-carboxilato de metila (1) + 3-etil-2,5-dimetilpirazina (2)	1,0288 a	± 0,1631
3-Etil-2,5-dimetilpirazina (2)	1,0198 a	± 0,1252
Ácido pirazino-2-carboxílico (12)	1,0317 a	± 0,2333
2,4-D (14)	0,5784 b	± 0,1259

* As média seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

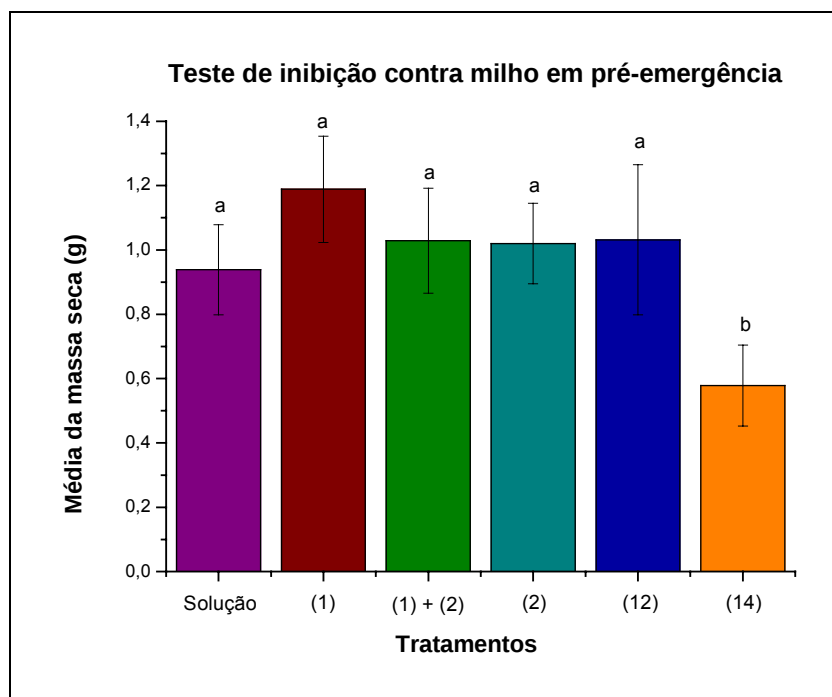


Figura 14 - Médias de massa seca da plântula de milho tratada com diferentes compostos em pré-emergência.

No pepino, devido a alta sensibilidade que este apresenta, observou-se que o controle realizado com o herbicida 2,4-D (14) inibiu fortemente o crescimento das plantas, Tabela 4 e Fig. 15. Enquanto os outros tratamentos não apresentaram inibição.

Tabela 4 - Médias de massa seca da plântula de pepino tratada com diferentes compostos em pré-emergência.

Tratamentos	Média da massa seca (g)*	Desvio padrão (g)
Solução veículo	0,6217 a	± 0,0766
4-Metilpirrol-2-carboxilato de metila (1)	0,5178 a	± 0,1229
4-Metilpirrol-2-carboxilato de metila (1) + 3-etil-2,5-dimetilpirazina (2)	0,5684 a	± 0,0654
3-Etil-2,5-dimetilpirazina (2)	0,6283 a	± 0,1452
Ácido pirazino-2-carboxílico (12)	0,4062 a	± 0,0526
2,4-D (14)	0,0965 b	± 0,1118

* As média seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

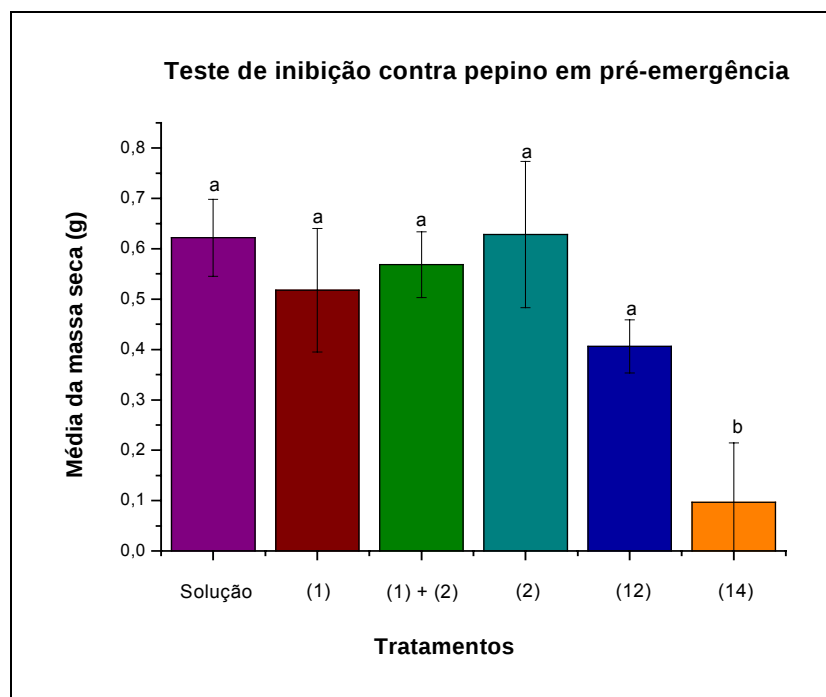


Figura 15 - Médias de massa seca da plântula de pepino tratada com diferentes compostos em pré-emergência.

Em pós-emergência, os resultados encontrados para o milho mostram que não há diferenciação estatística entre os tratamentos do ensaio, pelos motivos já mencionados. Estes resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Médias de massa seca da plântula de milho tratada com diferentes compostos em pós-emergência.

Tratamentos	Média da massa seca (g)*	Desvio padrão (g)
Solução veículo	1,3069 a	± 0,1029
4-Metilpirrol-2-carboxilato de metila (1)	1,7657 a	± 0,3473
4-Metilpirrol-2-carboxilato de metila (1) + 3-etil-2,5-dimetilpirazina (2)	1,7215 a	± 0,3478
3-Etil-2,5-dimetilpirazina (2)	1,7940 a	± 0,1892
Ácido pirazino-2-carboxílico (12)	1,6534 a	± 0,2627
2,4-D (14)	1,3346 a	± 0,2573

* As média seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o milho em pós-emergência nem o herbicida comercial 2,4-D inibiu o crescimento das plantas. O teste de Tukey mostrou que a média para este tratamento é estatisticamente semelhante à solução e aos demais tratamentos, Fig. 16.

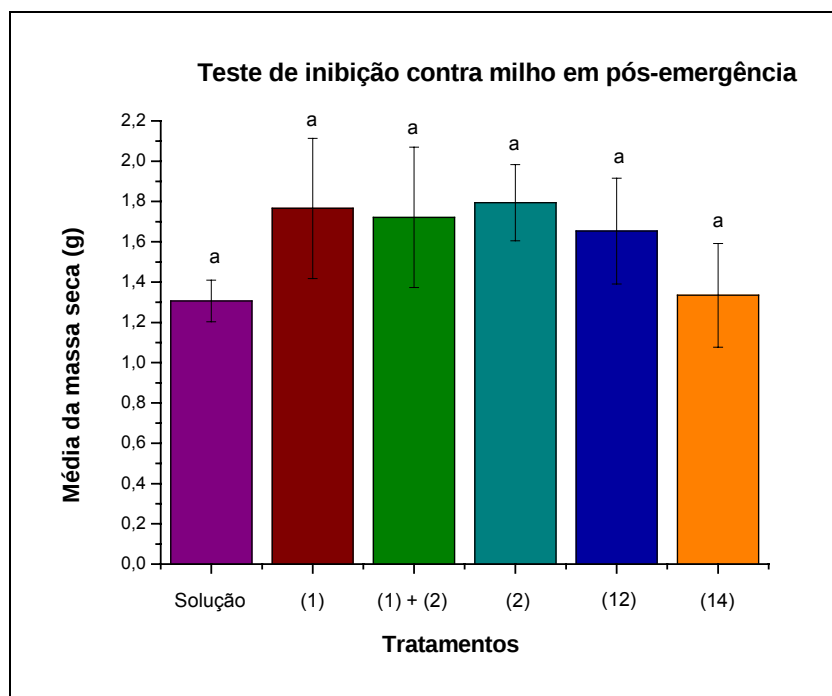


Figura 16 - Médias de massa seca da plântula de milho tratada com diferentes compostos em pós-emergência.

Como pode ser visto na Tabela 6 e na Fig. 17, os tratamentos aplicados no período de pós-emergência no pepino, mostraram resultados expressivos para pirrol (1) + pirazina (2) e ácido 2-pirazinocarboxílico (12), que afetaram significativamente o desenvolvimento das plantas. Já foi mencionado que o pepino é muito sensível, e por este motivo a aplicação contínua de 2,4-D (14) causou a morte das plantas no início do teste, após serem feitas as primeiras aplicações. Isto fez com que a média de massa seca fosse muito baixa para este herbicida. Esta média ficou muito distante da encontrada para os outros tratamentos aplicados que somente afetaram o desenvolvimento das plantas.

Tabela 6 - Médias de massa seca da plântula de pepino tratada com diferentes compostos em pós-emergência.

Tratamentos	Média da massa seca (g)*	Desvio padrão (g)
Solução veículo	0,9061 a	± 0,1297
4-Metilpirrol-2-carboxilato de metila (1)	0,8869 ab	± 0,0649
4-Metilpirrol-2-carboxilato de metila (1) + 3-etil-2,5-dimetilpirazina (2)	0,7131 c	± 0,0372
3-Etil-2,5-dimetilpirazina (2)	0,9939 a	± 0,0912
Ácido pirazino-2-carboxílico (12)	0,7315 bc	± 0,0243
2,4-D (14)	0,0982 d	± 0,0158

* As média seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

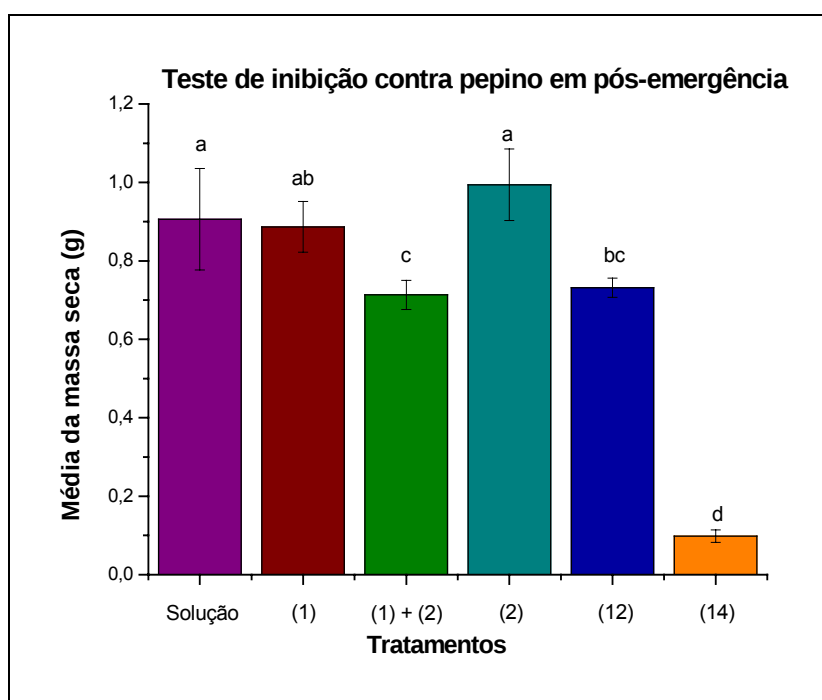


Figura 17 - Médias de massa seca da plântula de pepino tratada com diferentes compostos em pós-emergência.

4.2.2 - Bioensaios em grama

Tendo em vista que nosso alvo de estudo era a atividade dos compostos, já citados, nas trilhas de forrageamento, definimos um teste exclusivo para a abordagem deste objetivo, que foi realizado em grama de jardim. Este teste foi projetado especificamente para essa investigação, objetivando aproximar-se ao máximo das condições reais de uma trilha de forrageamento.

Os resultados obtidos com os compostos testados na trilha artificial em grama apresentaram valores relevantes. Todos os tratamentos foram estatisticamente diferentes da solução veículo. Com exceção do pirrol (1), os outros tratamentos, inclusive o ácido pirazino-2-carboxílico (12), proporcionaram inibição estatisticamente comparável ao herbicida comercial alaclor (13). Estes são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Médias da razão da massa seca aérea (g) por área (cm²), no primeiro teste em grama tratada com diferentes compostos

Tratamentos	Massa da parte aérea por área (mg/cm ²)*	Desvio padrão (g)
Solução veículo	9,0733 a	± 0,6956
4-Metilpirrol-2-carboxilato de metila (1)	4,8723 b	± 1,4972
4-Metilpirrol-2-carboxilato de metila (1) + 3-etil-2,5-dimetilpirazina (2)	4,1527 bc	± 0,8485
3-Etil-2,5-dimetilpirazina (2)	3,0987 c	± 0,3248
Ácido pirazino-2-carboxílico (12)	2,7862 c	± 0,5177
Alaclor (13)	4,1028 bc	± 1,3412

* As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste T a 5% de probabilidade.

A grande inibição da rebrota na trilha artificial promovida pelos compostos aplicados se apresenta como o primeiro indício de propriedade alomonal herbicida, associadas aos componentes do feromônio de trilha.

Na Fig. 18, pode-se observar de forma mais clara, como a inibição dos compostos testados foi expressiva.

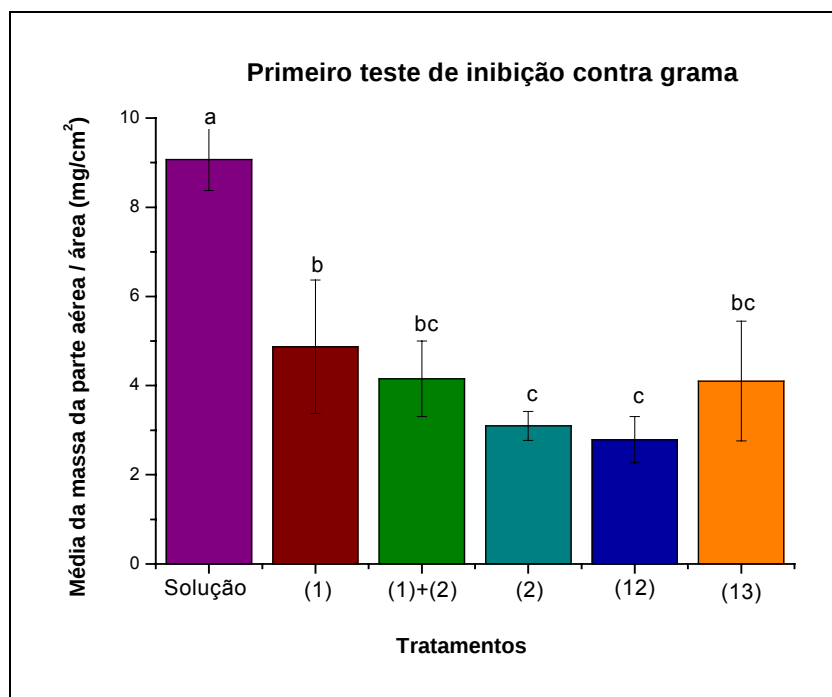


Figura 18 - Médias da razão da massa seca aérea (g) por área (cm²), da rebrota em trilha artificial, no primeiro teste em grama tratada com diferentes compostos.

Para confirmar esta propriedade herbicida dos compostos testados, o bioensaio em grama foi realizado novamente, nas mesmas condições experimentais do primeiro teste. As únicas diferenças foram:

- O tratamento com pirrol (1) e pirazina juntos (2) não foi realizado;
- Como controle foi usado o herbicida comercial 2,4-D, no lugar do alaclor (13).

Como esperado, a inibição promovida pelos constituintes do feromônio de trilha, com destaque para o pirrol (1) e para o ácido pirazino-2-carboxílico (12), foram significativas sendo comparadas estatisticamente ao herbicida comercial 2,4-D, como é mostrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Médias da razão da massa seca aérea (g) por área (cm²), da rebrota em trilha artificial, no segundo teste em grama tratada com diferentes compostos.

Tratamentos	Massa da parte aérea por área (mg/cm ²)*	Desvio padrão (g)
Solução veículo	1,2838 a	± 0,3104
4-Metilpirrol-2-carboxilato de metila (1)	0,6512 bc	± 0,0488
3-Etil-2,5-dimetilpirazina (2)	0,8656 ab	± 0,3951
Ácido pirazino-2-carboxílico (12)	0,6492 bc	± 0,1567
2,4 - D (14)	0,3244 c	± 0,1472

* As média seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste T a 5% de probabilidade.

Na Fig. 19, observa-se que estes resultados são condizentes com os encontrados no primeiro bioensaio realizado em grama, suportando o indício da atividade alomonal herbicida dos compostos presentes no feromônio de trilha de formigas cortadeiras. Assim como a possível existência de um derivado ácido, que pode estar sendo produzido na glândula de veneno.

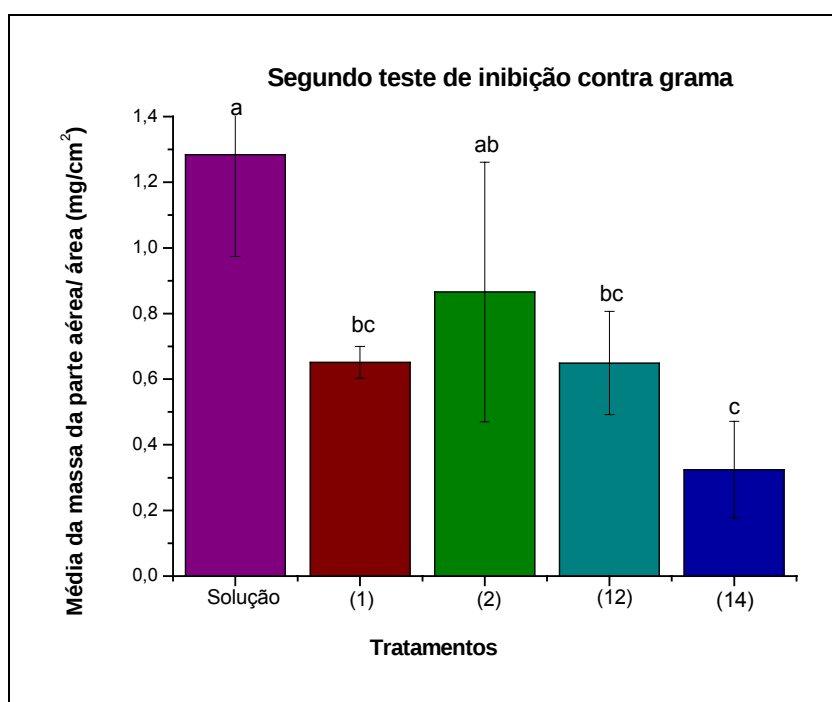


Figura 19 - Médias da razão da massa seca aérea (g) por área (cm²), da rebrota em trilha artificial, no segundo teste em grama tratada com diferentes compostos.

5 - CONCLUSÃO

Nos testes realizados em milho assim como em pepino, observa-se que os compostos não apresentam inibição em pré-emergência. Em pós-emergência os ensaios com pirrol (1) + pirazina (2) e ácido pirazino-2-carboxílico (12) mostraram significativa inibição no crescimento do pepino. No milho, devido à alta resistência e o uso de sementes selecionadas, não houve efeito em nenhum dos tratamentos aplicados.

Já os resultados obtidos nos dois testes realizados em grama de jardim constataram que os compostos presentes no feromônio de trilha, assim como o ácido pirazino-2-carboxílico (12), análogo estrutural da pirazina (2), apresentam atividade herbicida. Este fato corrobora a possibilidade de um dos componentes do feromônio de trilha possuir uma dupla função. Além de sua atividade feromonal comprovada, também possui uma atividade alomonal atuando como herbicida na área de ação do feromônio. Este primeiro teste serviu para constatar a hipótese de capina química nas trilhas de forrageamento por parte das formigas cortadeiras. Tal fato suporta o grande sucesso evolutivo das formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* por suprir duas necessidades fundamentais na atividade de forrageamento: a orientação e a limpeza da trilha. Assim, a dupla função dos compostos implicaria em economia de tempo e energia para uma colônia.

6 - PARTE EXPERIMENTAL

6.1 – Materiais e métodos aplicados na síntese

Durante a realização das etapas desse trabalho, todas as reações químicas foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (ccd), sendo utilizadas cromatofolhas de alumínio MERCK com sílica gel 60 GF₂₅₄ como fase estacionária.

Todos os solventes utilizados nas reações e separações foram de grau técnico, tendo sido previamente tratados de acordo como é indicado por Perrin e Armarego (1988). Os solventes foram evaporados em um evaporador rotatório FISATOM, operando à pressão reduzida.

As análises de CG-EM dos compostos foram feitas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas SHIMADZU modelo QP5050A (LCQUI-UENF) utilizando-se um método com as seguintes especificações:

- Coluna: DB-5, 30 metros, DI 0,25 mm.
- Gás de arraste: Hélio.
- Temperatura do injetor: 200 °C.
- Programa de temperatura para a coluna:
 - Temperatura inicial: 50 °C (1 min).
 - Temperatura final: 230 °C (7 min).
 - Gradiente de temperatura: 15 °C/min (12 min).
- Temperatura do detector: 230 °C.
- Programa de pressão:
 - Pressão inicial: 87,5 kPa (1 min).
 - Pressão final: 171 kPa (7 min).
 - Gradiente de Pressão: 7,0 kPa/min (12 min).
 - Ionização por impacto de elétrons (IE) 70 eV.
 - Obtenção do fragmentograma de íons totais (TIC)

As análises de cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (CG-DIC) dos compostos foram feitas em um cromatógrafo gasoso acoplado a detector de ionização por chama SHIMADZU modelo 17A (LCQUI-UENF) utilizando-se um método com as seguintes especificações:

- Coluna: DB-1, 30 metros, DI 0,25 mm .
- Gás de arraste: Hidrogênio.
- Temperatura do injetor: 200 °C.
- Programa de temperatura para a coluna:
 - Temperatura inicial: 50 °C.
 - Temperatura final: 200 °C (5 min).
 - Gradiente de temperatura: 15 °C/min (10 min).
- Temperatura do detector: 230 °C.
- Programa de pressão:
 - Pressão inicial: 50 kPa.
 - Pressão final: 65 kPa (5 min).
 - Gradiente de Pressão: 1,0 kPa/min (10 min).

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram obtidos nas frequências de 400 MHz e 100 MHz respectivamente em um espectrômetro JEOL Eclipse+ 400 (LCQUI-UENF), utilizando como solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3).

As análises espectroscópicas na região do infravermelho por transformada de Fourier (IV) foram realizadas em um espectrômetro SHIMADZU, modelo FTIR 8300 (LCQUI-UENF). As amostras sólidas foram analisadas em pastilha de KBr, já as amostra líquidas foram analisadas na forma de filme entre pastilhas de NaCl. As medidas de ponto de fusão foram realizadas em um aparelho Fisher-Jonhs, sem correção.

6.1.2 - Procedimentos experimentais

6.1.2.1 - Preparação 2-nitropropan-1-ol (5)

Em um balão de 500 mL, resfriado a 0°C e equipado com agitação magnética, foram dissolvidos 26,80 g (670 mmol) de hidróxido de sódio e 57,85 g (771 mmol) de nitroetano (3) em 150 mL água destilada. A solução foi mantida nesta temperatura até a completa dissolução dos reagentes. Após isto, deixou-se o meio reacional atingir a temperatura ambiente fora do banho de gelo. O meio reacional foi mantido a esta temperatura por 20 min.

Paralelamente, em um Erlenmeyer de 250 mL, equipado com agitação magnética e aquecimento, foram dissolvidos 19,43 g (648 mmol) de paraformaldeído em 20 mL de água destilada, aquecida a 50°C. Ao final da dissolução houve a formação de uma suspensão no meio reacional. Posteriormente, adicionaram-se 10,0 mL (10 mmol) de uma solução de hidróxido de sódio 1 mol/L, dissolvendo todo o precipitado.

A seguir, em banho de gelo, a solução de nitroetano foi resfriada. À esta solução, sob agitação, foi adicionado lentamente (~ 30 min) a solução de formaldeído. Ao término da adição a solução resultante foi mantida à temperatura ambiente, sob agitação, por três horas. Terminado este período, a solução foi posta novamente em banho de gelo, e ao meio reacional foi adicionado lentamente (~ 30 min) 50 mL de ácido acético glacial. Após isto, o meio reacional resultante foi mantido à temperatura ambiente por três horas. Ao final deste período, o meio reacional foi saturado com cloreto de sódio. Após agitação, as fases foram separadas, e extraiu-se a fase aquosa com três porções de 70 mL de éter etílico (3 x 70 mL). O produto desejado foi isolado da fase orgânica após a lavagem com água destilada (3 x 70mL), secagem com sulfato de sódio anidro e remoção dos voláteis em um evaporador rotatório (1 mmHg, 73°C). Depois da destilação obtiveram-se 40,7 g (58 % de rendimento) de um líquido incolor caracterizado como o 2-nitropropan-1-ol (5).

6.1.2.2 - Preparação acetato de 2-nitropropila (6)

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, equipado com agitação magnética, foram colocados 5,00 g (48 mmol) de 2-nitropropan-1-ol (5), 8,00 g (78 mmol) de anidrido acético e 200 mg (1,6 mol) de 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP). Estes foram dissolvidos em 25 mL de diclorometano. O meio reacional foi mantido sob agitação durante 15 h, à temperatura ambiente. Ao final deste período, foram adicionados 5,0 mL de metanol ao meio reacional, e este foi agitado por mais 2 h. A seguir, o meio resultante foi vertido em um funil de separação, onde recebeu a adição de 60,0 mL de uma solução de bicarbonato de sódio aquoso (2,0 mol/L). Após intensa agitação, as fases foram separadas, e a fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 30 mL). A fase orgânica foi reunida e purificada por cromatografia em sílica gel. Do filtrado recolhido, o produto foi isolado após a remoção dos voláteis em evaporador rotatório (1 mmHg, 60°C). O líquido incolor obtido foi destilado fornecendo 5,08 g (72% de rendimento). Este foi caracterizado como o acetato de 2-nitropropila (6).

6.1.2. 3 - Preparação do cloridrato do éster metílico da glicina (8)

Em um balão de fundo redondo de 250 mL, equipado com aquecimento e agitação magnética, foram dissolvidos 10,00 g (133,20 mmol) de glicina (7) em 100 mL de metanol acidificado com HCl gasoso (10%, m/m). O meio reacional foi mantido sob agitação e refluxo durante 10 min. A seguir, o meio resultante foi resfriado em banho de gelo e sal. Este foi deixado em repouso por aproximadamente 1 h. Após este período, foi observado a formação de um precipitado branco. Em um funil de Buchner, o precipitado foi filtrado, e posteriormente lavado com 10 mL de metanol gelado e seco ao ar. Após isto, obtiveram-se 10,25 g (61% de rendimento) de um sólido branco, que foi caracterizado como o cloridrato do éster metílico da glicina (8).

6.1.2. 4 - Preparação do éster metílico da *N*-formilglicina (9)

Em um balão de duas bocas de 100 mL, equipado com agitação magnética, placa de aquecimento, funil de adição com pressão equalizada e condensador de refluxo, colocaram-se 45 mL de formiato de metila. Em seguida, foram adicionados 9,17 g

(73 mmol) do cloridrato do éster metílico da glicina (9). O sistema foi aquecido à temperatura de refluxo. Nesta temperatura, foram adicionado lentamente 15 mL de trietilamina. A temperatura do banho foi mantida em cerca de 50°C por 20 h. Ao final deste período, o meio reacional foi filtrado em um funil de Buchner. O precipitado resultante foi lavado com 10 mL de diclorometano. Os voláteis da fração líquida foram evaporados em um evaporador rotatório. O produto foi obtido a partir da destilação sob pressão reduzida (1mmHg-95°C) do óleo resultante, fornecendo 6,47 g (75% de rendimento) de um óleo incolor caracterizado como o éster metílico da *N*-formilglicina (9).

6.1.2.5 - Preparação do isocianoacetato de metila (10)

Em um balão de duas bocas de 100 mL equipado com agitação magnética, banho de gelo e sal, atmosfera de nitrogênio e funil de adição com pressão equalizada, foram colocados 6,00 g (51,30 mmol) do éster metílico da *N*-formilglicina (9) e 18,00 mL (130 mmol) de trietilamina. Estes foram dissolvidos em 50 mL de diclorometano. A seguir, foram adicionados lentamente (~ 30 min) 5,00 mL de oxicloreto de fósforo. Esta adição foi feita sem que a temperatura do meio ultrapassasse 0°C. Durante a adição foi observado um progressivo avermelhamento do meio reacional. Terminada a adição, o banho de gelo e sal foi substituído por um banho de gelo e água e o meio foi mantido sob agitação por mais uma hora. Ao término deste período, foi adicionada lentamente uma solução de 10 g de carbonato de sódio em 40 mL de água destilada de modo que a temperatura do meio reacional não ultrapassasse 30°C. Após a adição as fases se separaram, e estas foram mantidas sob agitação por mais 30 min. Posteriormente foram adicionados 50 mL de água destilada e a fase aquosa foi separada da fase orgânica. A solução resultante foi vertida em um funil de separação e extraída com diclorometano (2 x 25 mL). O produto foi isolado das fases orgânicas reunidas após a lavagem desta com 50 mL de uma solução saturada de cloreto de sódio, secagem com carbonato de potássio anidro e remoção dos voláteis em um evaporador rotatório. O líquido resultante foi destilado sob pressão reduzida (55°C, 1 mmHg), fornecendo 2,37 g (70% de rendimento) de um óleo marrom que foi caracterizado como o isocianoacetato de metila (10).

6.1.2.6 - Preparação 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (1)

Em um balão de fundo redondo de 25 mL equipado com agitação magnética e atmosfera de nitrogênio, foram colocados 3 mL de TMBE, 445,9 mg (4,5 mmol) de isocianoacetato de metila (10) e 662,1 mg (4,5 mmol) de acetato de 2-nitropropila. À solução, agitada vigorosamente, foi adicionada lentamente (~ 90 min) 1036,6 mg (9 mmol) de *N,N,N',N'*-tetrametil-guanidina (11) dissolvidas em 4 mL de TMBE. Durante a adição manteve-se a temperatura do meio reacional entre 10-20°C. Após a adição, o meio foi mantido sob agitação por mais 2 horas. Ao término deste período, os voláteis foram evaporados em um evaporador rotatório e o líquido obtido purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, com pentano 50% em dicloroetano. Após a evaporação dos eluentes, o produto foi recristalizado em hexano resultando em 375 mg (60 % de rendimento) de um sólido branco, caracterizado como o 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (1).

6.2 - Materiais e métodos aplicados nos ensaios biológicos

O estudo da atividade herbicida de dois dos compostos presentes no feromônio de formigas cortadeiras, o 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (1) e a 3-etil-2,5-dimetilpirazina (2), seguiu as metodologias tradicionais para testes de herbicidas descritas por Brasil (1992) e Barbosa (2003). Somente o teste de inibição contra grama não acompanhou estes padrões. Isto porque este teste foi projetado pelo grupo com o intuito de aproximar-se ao máximo das condições reais de uma trilha de forrageamento.

Todos os compostos testados foram dissolvidos em soluções-veículo. Esta também foi aplicada como tratamento testemunha (branco) em todos os ensaios biológicos. A composição da solução veículo era: butanona (200 μ L), xileno (200 μ L) e tween 80 (200 μ L) diluídos em 1 L água destilada.

Todos os testes foram realizados em casa de vegetação e foram efetuadas cinco repetições para cada tratamento. Os resultados decorrentes dos ensaios foram submetidos à cálculos estatísticos de análise de variância e comparação das médias pelo teste de Tukey. Estes foram realizados utilizando o programa Origin[®], versão 7.5 (*OriginLab Corporation*).

Os reagentes e padrões empregados, assim como sua origem e pureza, foram os seguintes:

- 4-metil-2-pirrolcarboxilato de metila (1), sintetizado por nós, $\geq 99\%$, por CG-DIC.
- 3-Etil-2,5(6)-dimetilpirazina (2), *Acros Organics*, 99%.
- Ácido 2-pirazinocarboxílico (12), *Acros Organics*, 99%.
- Alachlor (13), *Agan Chemical Manufacturers LTD*, 99%, no primeiro teste realizado em grama.
- 2,4-D (14), *Fluka*, $\geq 90\%$, nos testes realizados com milho, pepino e no segundo teste de inibição em grama.

6.2.1 - Bioensaios para testes de atividade alomonal herbicida em milho e pepino em pós e pré-emergência

Na verificação do potencial alomonal herbicida contra milho e pepino, usaram-se sementes de milho da variedade híbrida UENF 506-6 e sementes de pepino da variedade Aodai (Feltrin), ambas com germinação mínima de 95%.

Para a realização dos testes foram usados vasos plásticos de 10 cm de diâmetro e 12 cm de altura, contendo areia. Em cada vaso foram plantadas 5 sementes, estes foram irrigados diariamente com 30 mL da solução nutritiva de Clark (1975). Dez dias após o plantio as quatro plantas mais raquíticas de cada vaso foram eliminadas, restando a mais saudável.

Iniciado o teste, os vasos eram borrifado com 2,0 mL de uma solução veículo contendo 100 ppm (1,0 g/L) do composto a ser testado. Nos tratamentos em pré-emergência, os vasos eram borrifados uma única vez, imediatamente após o plantio, este foi finalizado após trinta dias. Já nos tratamentos em pós-emergência, os vasos receberam os tratamentos vinte dias após o plantio e posteriormente três reaplicações, uma a cada cinco dias. Cinco dias após a última aplicação o teste foi concluído, resultando em um total de quarenta dias.

6.2.2 - Bioensaios para testes de atividade alomonal herbicida em grama

Para os testes de verificação do potencial alomonal herbicida em grama, usaram-se placas de grama do tipo Esmeralda, espécie *Zoysia japonica* (ITOGRASS).

As placas de grama eram cortadas nas medidas de 18 cm de comprimento por 15 cm de largura e plantadas em bandejas de alumínio nas mesmas dimensões contendo solo natural, coletado no campus da UENF.

Após um período de estabilização de quinze dias, foram confeccionadas trilhas artificiais medindo 15 cm de comprimento por 4 cm de largura utilizando tesoura e um gabarito, apenas a parte aérea foi cortada, Fig. 20.



Figura 20 - Trilhas de forrageamento artificial.

As aplicações dos tratamentos testados foram realizadas imediatamente após a confecção das trilhas e repetidas a cada quatro dias, totalizando dez aplicações. Em cada trilha era aplicado 20 mL de uma solução veículo contendo 100 ppm (1,0 g/L) do composto a ser testado.

No primeiro teste, após quarenta e dois dias, foram amostrados do centro de cada trilha, uma parte medindo aproximadamente 16 cm², Fig. 21. Coletou-se as partes aéreas de cada uma dessas porções e estas foram levadas a estufa, a 70°C durante quatro dias. As massas das folhas de cada porção foram medidas separadamente em balança analítica. As massas secas de cada porção, juntamente com a medida de sua respectiva área de amostragem foram analisadas estatisticamente.

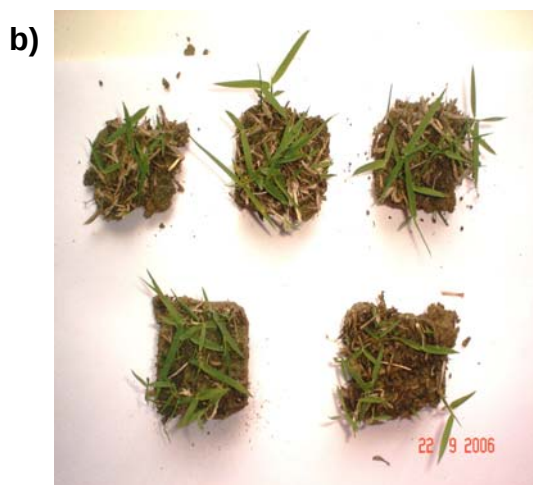


Figura 21 - Amostras da trilha retirada onde foi observada a rebrota após quarenta e dois dias de tratamento com solução veículo (a) e com o ácido 2-pirazinocarboxílico (b).

O segundo teste de verificação alomonal herbicida contra rebrota na trilha artificial em grama, foi realizado nas mesmas condições experimentais do primeiro. A diferença foi que após quarenta e dois dias, não foi amostrada uma parte da trilha. A trilha inteira foi retirada, Fig. 22, e a parte aérea de toda trilha foi levada à estufa, a 70°C durante quatro dias. Posteriormente, as massas secas da trilha e suas respectivas áreas foram submetidas ao tratamento estatístico.



Figura 22 – Trilhas artificiais retiradas, no segundo teste, onde foi observada a rebrota após quarenta e dois dias de tratamento com solução veículo.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJOS, N.; MOREIRA, D. D. O.; DELLA LUCIA, T. M. C. **Manejo integrado de formigas cortadeiras em reflorestamentos**. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Folha de Viçosa, p.212-241, 1993.

AS PODEROSAS DA TERRA. **Revista Galileu** . n. 158, 1984. Disponível em: < http://revistagalileu.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg_article_print/1,3916,803829-3434-1,00.html >. Acessado em: 20 jul 2007.

ATTYGALLE, A. B.; MORGAN, E. D. **Ant Trail Pheromones**. *Advances in Insect Physiology*, v. 18, p. 1-30, 1985.

BARBOSA, L. C. de A.; DEMUNER, A. J.; MALTHA, C. R. Á.; SILVA, P. S. da; SILVA, A. A. da. **Síntese e avaliação da atividade fitotóxica de novos análogos oxigenados do ácido helmintospórico**. *Química Nova*, v. 26, p. 655-660, 2003.

BARTON, D. H. R.; ELLIOTT, J. D.; GÉRO S. D. **The synthesis and properties of a series of strong but hindered organic bases**. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, p. 1136 -1137, 1981.

BARTON, D. H. R.; KERVAGORET, J.; ZARD, S. Z. **A Useful Synthesis of Pyrroles From Nitroolefins**. *Tetrahedron*, v. 21, p. 7587-7598, 1990.

BATISTA-PEREIRA, L. G. **Bioensaios para avaliação de substâncias químicas sobre os insetos**. In: CORRÊA, A. G. E VIEIRA, P. C. **Produtos naturais no controle de insetos**. 2. ed. São Carlos: EdUFSCar, p.105-120, 2007.

BHATTACHARYA, A., CHERUKURI, S., PLATA, R. E., PATEL, N., TAMEZ, V. JR., GROSSO, J A., PEDDICORDB, M., PALANISWAMYB, V. A. **Remarkable solvent effect in Barton–Zard pyrrole synthesis: application in an efficient one-step synthesis of pyrrole derivatives**. *Science Direct*, v.47, p. 5481-5484, 2006.

BIRCH, M. C.; HAYNES, K. F. **Insect pheromones**. *Studies on Biology*, n. 147, p.1-60, 1982.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. p. 85-138.

CHERRET, J. M. **History of the leaf-cutting ant problem**. In LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Ed.). **Fire ants e leaf-cutting ants: biology and management**. Boulder: Westview Press, 1986. p. 10-17 *apud* HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**, Cambridge: Belknap, 1990.

CLARK, R. B. **Characterization of phosphates in intact maize roots**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 23, p. 458-460, 1975.

CROSS, J. H.; BYLER, R. C.; RAVID, U.; SILVERSTEIN, R. M.; ROBINSON, S. W.; BAKER, P. M.; de OLIVEIRA, J. S.; JUTSUM, A. R.; CHERRETT, M. J. **The major component of the trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa* Forel. 3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine.** *Journal of Chemical Ecology*, v. 5, p. 187-203, 1979.

DELLA LÚCIA, T. M. C.; ANJOS, N.; SILVA, A. M.; BARCELOS, J. A. V.; BENTO, J. M. S.; FOWLER, H. G.; FORTI, L. C.; FREITAS, G. D.; MORAES, E. J.; MOREIRA, D. D. O.; OLIVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, M. A.; PINHÃO, M. A. S.; VILELA, E. F. YASSU, W. K. **As formigas cortadeiras.** Viçosa: Folha de Viçosa, p.212-241, 1993.

DICKE, M.; SABELIS, M. W. **Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds.** *Functional Ecology*, v. 2, p. 131-139, 1988.

DOLEZAL, M.; HARTL, J.; MILETÍN, M.; MACHÁČEK, M.; KRÁLOVÁ, K. **Synthesis and photosynthesis-inhibiting activity of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids.** *Chemical Papers*, v. 53, p. 126-130, 1999.

EICHLER, M. L. **Ecologia: de ciência à metáfora psicológica.** *Ciências & Cognição*, v. 6, p.256-261, 2005.

FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C (Org). **Produtos Naturais no Controle de Insetos.** 2 ed. São Carlos: EdUFSCar, 2001, p. 9-19.

FERREIRA, J. T.; ZARBIN, P. H. G. **Amor ao primeiro odor: a comunicação química entre os insetos.** *Química e Sociedade*, n.7, 1998. Disponível em: <[http:// www.sbq.org.br/divcientificas/DIV-DED/qnesc/qnesc-07.htm](http://www.sbq.org.br/divcientificas/DIV-DED/qnesc/qnesc-07.htm)>. Acessado em: 15 jul. 2007.

FEUER, H.; MILLER, R. **Michael Type Additions with Secondary Nitro Olefins Prepared *In Situ*.** *Journal of Organic Chemistry*, v. 26, p. 1348-1357, 1961.

FORTI, L. C.; CROCOMO, W. B.; GUASSU, C. M. de O. **Bioecologia e controle das formigas cortadeiras de folhas em florestas implantadas.** Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, Boletim Didático, n.4, 1987.

FOWLER, H. G.; PEREIRA-DA-SILVA, V.; FORTI, L. C.; SAES, N. B. **Population Dynamics of Leaf-Cutting Ants: A Brief Review** *In* LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Ed.). **Fire ants e leaf-cutting ants: biology and management.** Boulder: Westview Press, 1986. p. 123-146.

FURNISS, B. S.; HANNAFORD, A. J.; SMITH, P. W. G.; TATCHELL, A. R. (Rev.). **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry.** 5th ed. London: Logman, 1989. p. 762.

GRIMALDI, D.; AGOSTI, D. **A formicine in New Jersey Cretaceous amber (Hymenoptera: Formicidae) and early evolution of the ants.** *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 97, p. 13678-13683, 2000.

HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry.** Academic Press. New York, 1989.

HARTMAN, G. D.; WEINSTOCK, L. M. **Thiazoles From Ethyl Isocyanoacetate And Thiono Esters: Ethyl Thiazole-4-Carboxylate.** *Organic Syntheses*, v. 6, p. 620, 1988.

HERBIVORY. Disponível em: <<http://www.unibielefeld.de/biologie/oekosystembiologie/doc/oeko27.html>>. Acessado em: 25 jul. 2007.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants.** Cambridge: Belknap, 1990. p. 326, 596, 600.

HÖLLDOBLER, B. **The chemistry of social regulation:** Multicomponent signals in ant societies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 92, p. 19, 1990.

HOWARD, J. J. **Costs of trail construction and maintenance in the leaf-cutting ant *Atta columbica*.** *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 49, p. 348-356, 2001.

JAFFÉ, K.; HOWSE, P. E. **The mass recruitment system of leaf-cutting ant *Atta cephalotes*.** *Animal Behavior*, v. 27, p. 930-939, 1979.

KARLSON, P. e BUTENANDT. A. **Pheromones (Ectohormones) in insects.** *Annual Review of Entomology*, v. 4, 39-58, 1959.

KARLSON, P. e LUSCHER, M. **Pheromones a new term for a class of biologically active substances.** *Nature*, 1959, 183, 155 -176.

KUDLANKY. **Some other insects I raise.** Disponível em: <http://kudlanky.com/soubory/jiny_hmyz_an.htm>. Acesso em: 20 jul 2007.

LAW, J. H. e REGNIER, F. E. **Pheromones.** *Annual Review of Biochemistry*, v. 40, 533 - 548, 1971.

LIMA, C. A.; DELLA LÚCIA, T. M. C.; SILVA, N. dos A. **Formigas Cortadeiras: Biologia e Controle.** Viçosa: UFV - Pró-Reitoria de Extensão e Cultura (Boletim de Extensão, 44), p. 1-28, 2001.

MANDAVA, N.B. **Handbook of Natural Pesticides: Methods. Theory, Practice, and Detection**, v.1, Boca Raton, FL: CRC Press, p.201-230, 1982.

MIKHEYEV, A. S., MUELLER, U., ABBOT, P. **Cryptic sex and many-to-one coevolution in the fungus-growing ant symbiosis.** *Proceedings of national Academic of science*, v. 103, n. 28, 10702-10706, 2006.

MOSER, J. C. **Trails of the leafcutters**, *Natural history*, 1967, 76, 32-35 apud KLEINEIDAM, C. J.; OBERMAYER, M.; HALBICH, W.; RÖSSLER, W. **A Macroglomerulus in the Antennal Lobe of Leaf-cutting Ant Workers and its Possible Functional Significance**, *Chemical Senses*, 2005, 30, 383-392.

MOSER, J.C.; SILVERSTEIN, R. M. **Volatility of trail marking substance of the town ant**. *Nature*, v 215, p. 206-207, 1967.

NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. **Semiochemichals: a review of the terminology**. John Wiley, New York, p. 13 -23, 1981.

NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. **Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions**. *Journal of Chemical Ecology*, v. 2, p. 211-220, 1976.

PAYNE, T. L., BIRCH, M.C. & Kennedy, C.E.J. (eds). **Mechanisms in Insect Olfaction**. London, Clarendon Press, p. 201-208, 1986 In: CORRÊA, A. G. E VIEIRA, P. C. **Produtos naturais no controle de insetos**. 2. ed. São Carlos: EdUFSCar, p.105-120, 2007.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of laboratory chemicals**, 3rd ed. Oxford: Pergation, 1988. p. 67, 107, 145, 217, 284.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M., **The role of fungos in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.)**. *Ecological Entomology*, 1979, v. 4, p. 151-160 apud HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Cambridge: Belknap, 1990, p. 598.

ROCKWOOD, L. L.; HUBBELL, S. P. **Host-plant selection, diet diversity, and optimal foraging in a tropical leafcutting ant**. *Oecologia*, v. 74, p. 55-61, 1987.

SCHULTZ, T. R. **In search of ant ancestors**. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 97, p. 14028-14029, 2000.

SCHWEITZER, B. A.; LOIDA, P. J.; CAJACOB, C. A.; CHOTT, R. C.; COLLANTES, E. M.; HEGDE, S. G.; MOSIER, P. D.; PROFETA S. **Discovery of Imidazole Glycerol Phosphate Dehydratase Inhibitors through 3-D Database Searching**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 12, p. 1743 - 1746, 2002.

SCHWEITZER, F.; LAO, K.; FAMILY, F. **Active random walkers simulate trunk trail formation by ants**. *BioSystems*, v. 41, p. 153-166, 1997.

SIGMA-ALDRICH. **Strong and Hindered Bases in Organic Synthesis**. *Aldrich Chemfiles*, v. 3, n. 1, 2003.

SIMBERLOFF D.; STILING, P. **How Risky Is Biological Control? Reply** *Ecology*, v. 79, n. 5, p. 1834 -1836, 1998.

SYKES, P. **A guidebook to mechanism in organic chemistry**. 6th ed. Cambridge: Logman, 1985. p. 283.

THOMAS, J. C. **Formigas cortadeiras; instruções básicas para o controle**. EMATER-PR (Dossiê Técnico), p. 1-26, 1990.

TODA FRUTA. **Himenópteros nocivos**. Disponível em:

<http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=12511>. Acessado em: 22 jul 2007.

TUMLINSON, J. H.; SILVERSTEIN, R. M.; MOSER, J. C.; BROWNLEE R. G.; RUTH, J. M. **Identification of the Trail Pheromone of a Leaf-cutting Ant, *Atta texana***. *Nature*, v. 234, p. 348-349, 1971.

VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. **Feromônios de Insetos**; Biologia, Química e emprego no manejo de pragas, Viçosa: UFV - Imprensa Universitária, 1987, p. 14 - 95.

VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Feromônios de Insetos**: Biologia, Química e Aplicação. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2003, p. 11 -77.

VOGT, R.G.; RIDDIFORD, L.M. **Pheromone reception: a kinetic equilibrium**. In: PAYNE, T. L., BIRCH, M.C. & Kennedy, C.E.J. (eds). **Mechanisms in Insect Olfaction**. London, Clarendon Press, p. 201-208, 1986 In: CORRÊA, A. G. E VIEIRA, P. C. **Produtos naturais no controle de insetos**. 2. ed. São Carlos: EdUFSCar, p.105-120, 2007.

WILSON, E. O. **Chemical communication in the social insects - Insect Societies are Organized Principally by Complex Systems of Chemical Signals**. *Science*, 149, 1064-1071, 1965.

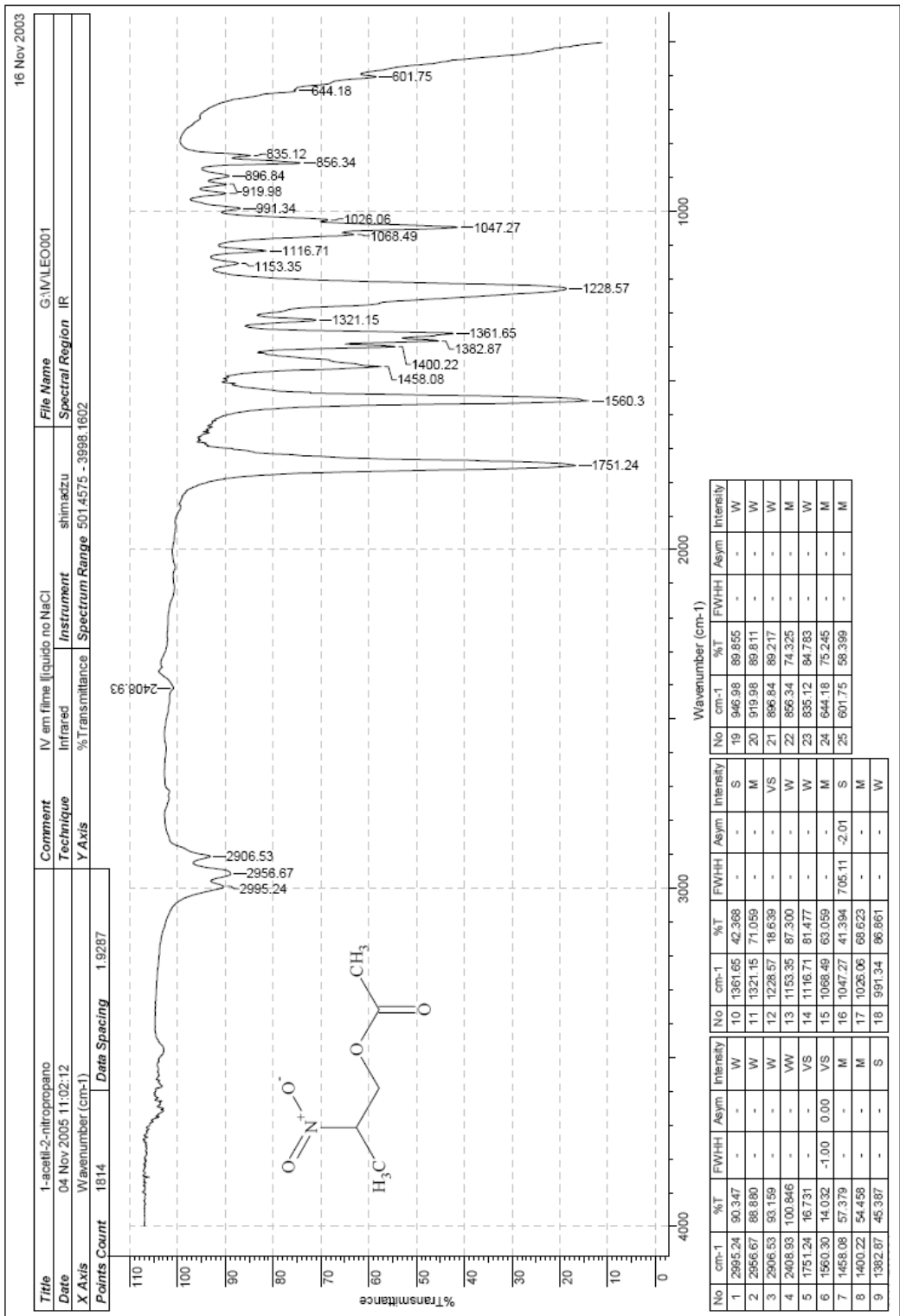
WILSON, E.O. **The Insects Societies**. Cambridge: Havard University Press, 1971 *apud* ATTYGALLE, A. B.; MORGAN, E. D. **Ant Trail Pheromones**. *Advances in Insect Physiology*, v. 18, p. 1-30, 1985.

WILSON, E.O. **The Insects Societies**. Cambridge: Havard University Press, 1971 *apud* VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Feromônios de Insetos**: Biologia, Química e Aplicação. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001. p. 74.

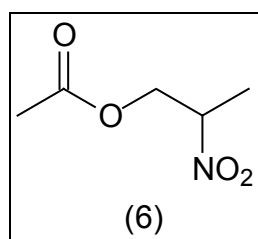
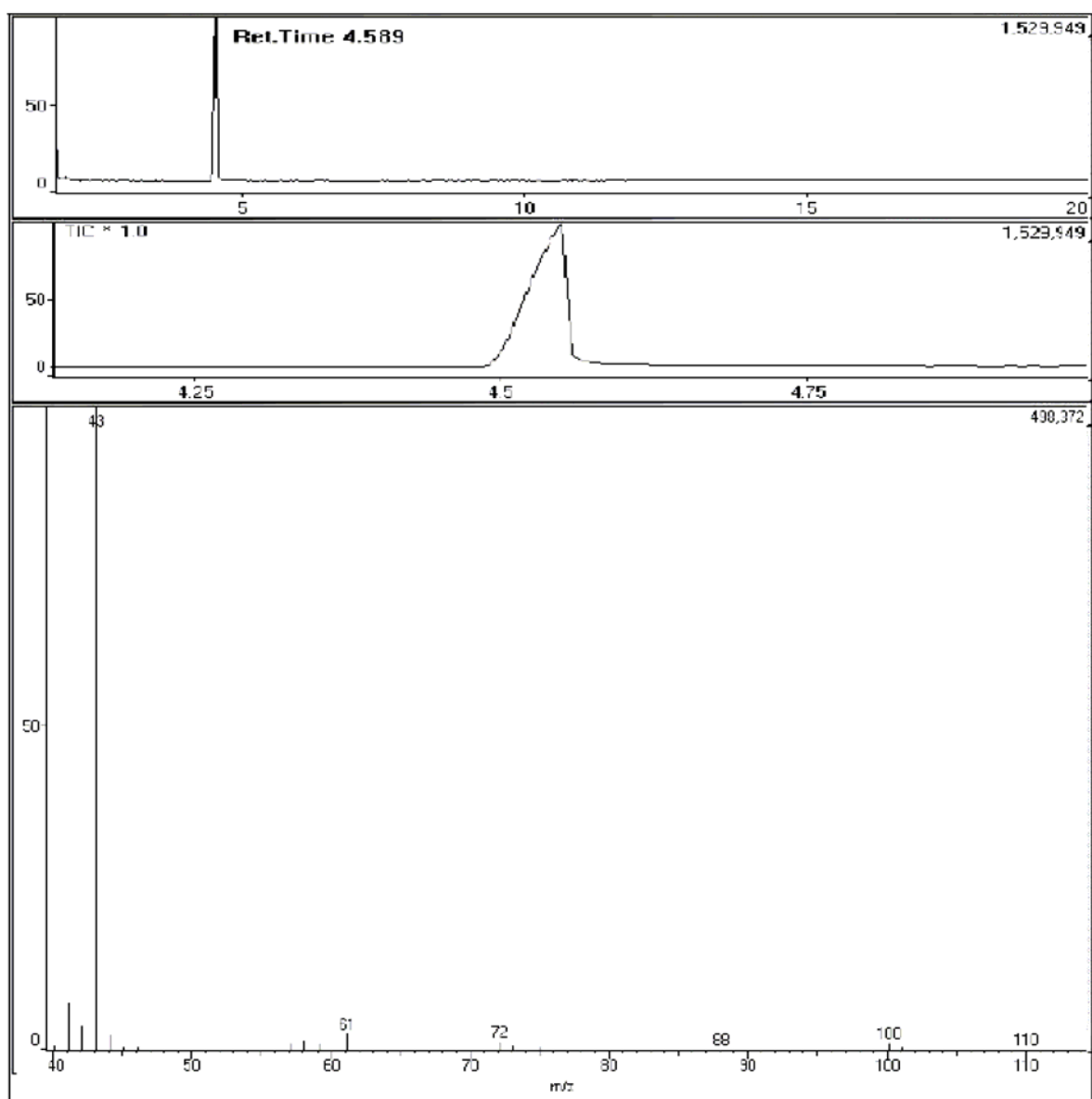
YAMAGATA, N.; FUJIWARA-TSUJII, N.; YAMAOKA, R.; MIZUNAMI M. **Pheromone communication and the mushroom body of the ant, *Camponotus obscuripes* (Hymenoptera: Formicidae)**, *Naturwissenschaften*, v. 92, p. 532-536, 2005.

8 – APÊNDICE

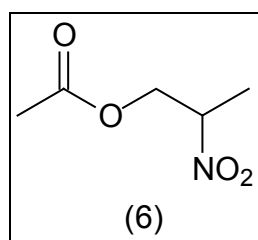
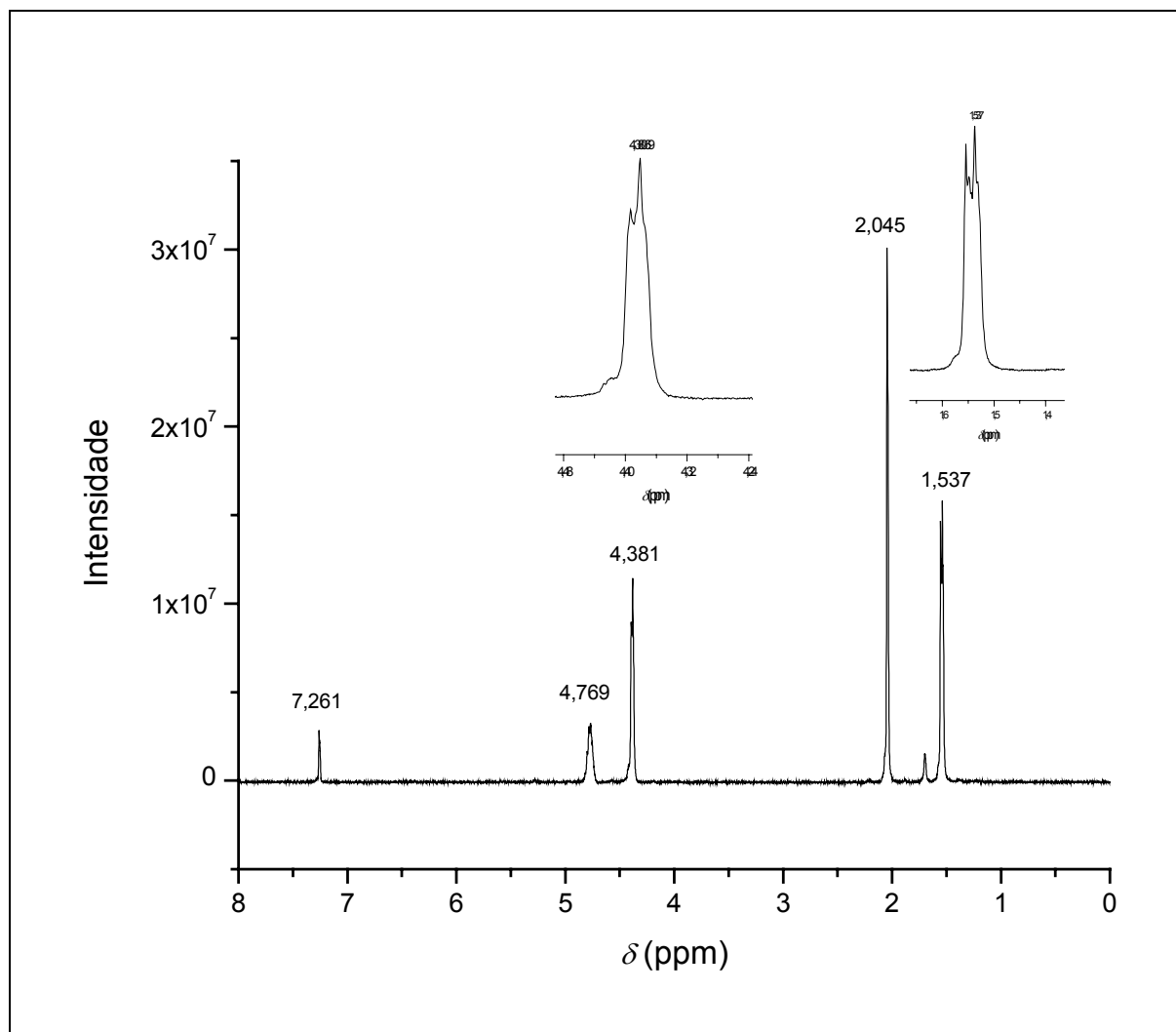
APÊNDICE A – Espectro de infravermelho do acetato de 2-nitropropila (6).



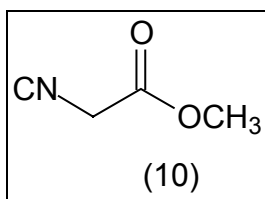
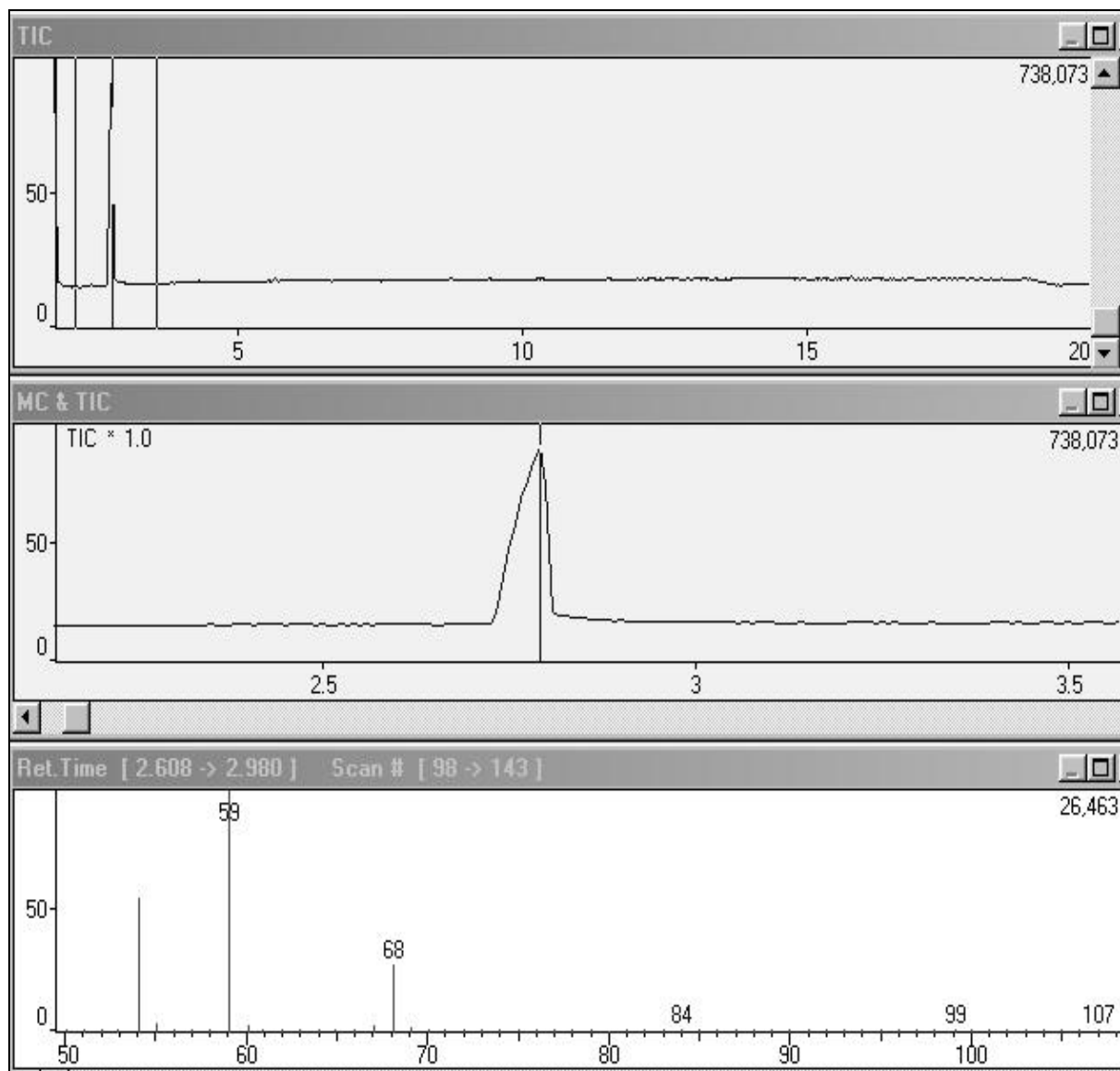
APÊNDICE B – Análise cromatográfica com espectro de massas do acetato de 2-nitropropila (6).



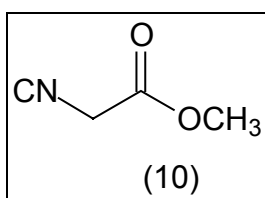
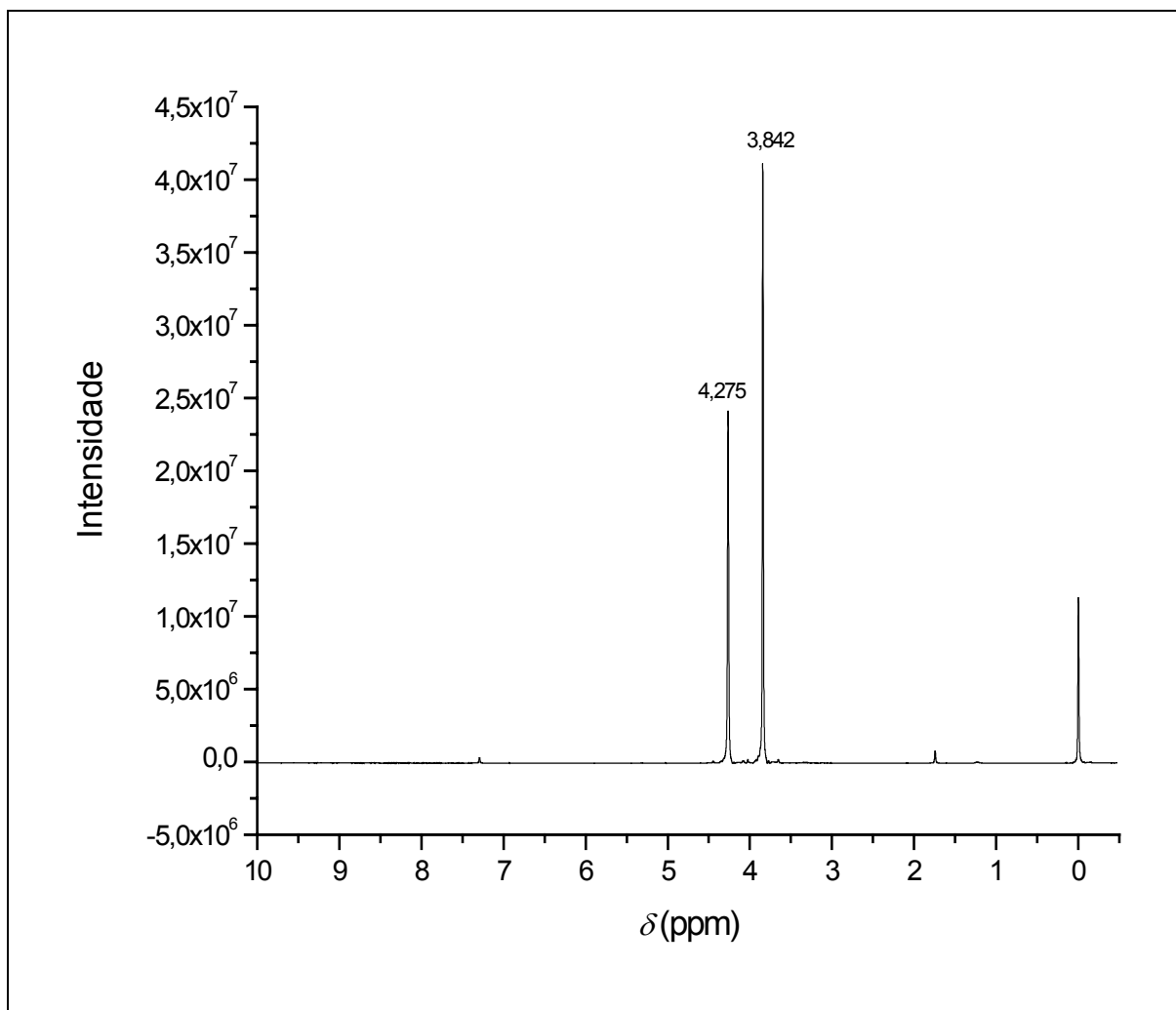
APÊNDICE C – Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do acetato de 2-nitropropila (6).



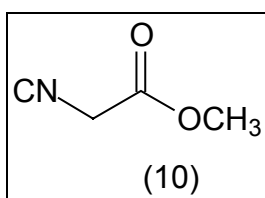
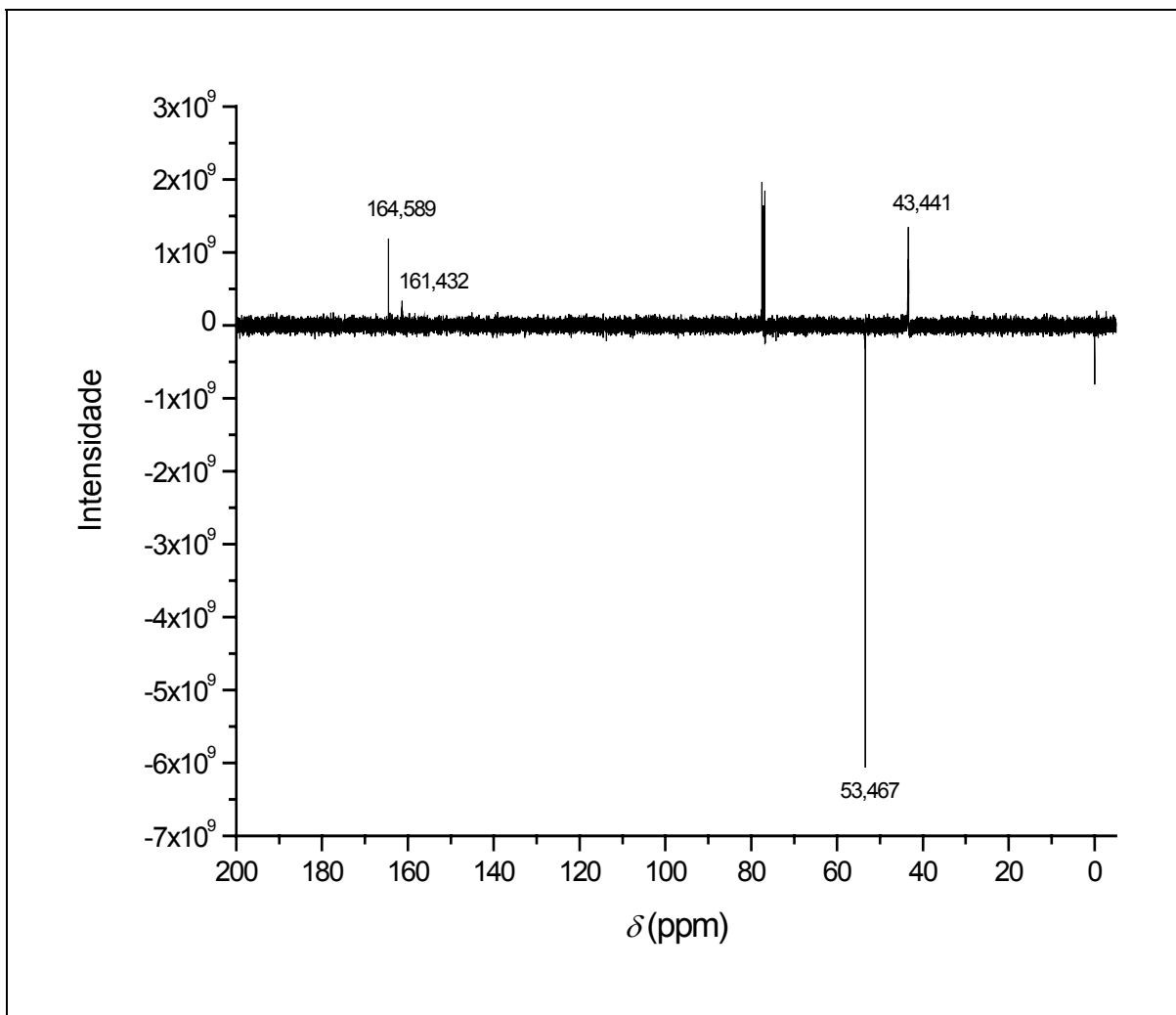
APÊNDICE D – Análise cromatográfica com espectro de massas do isocianoacetato de metila (10).



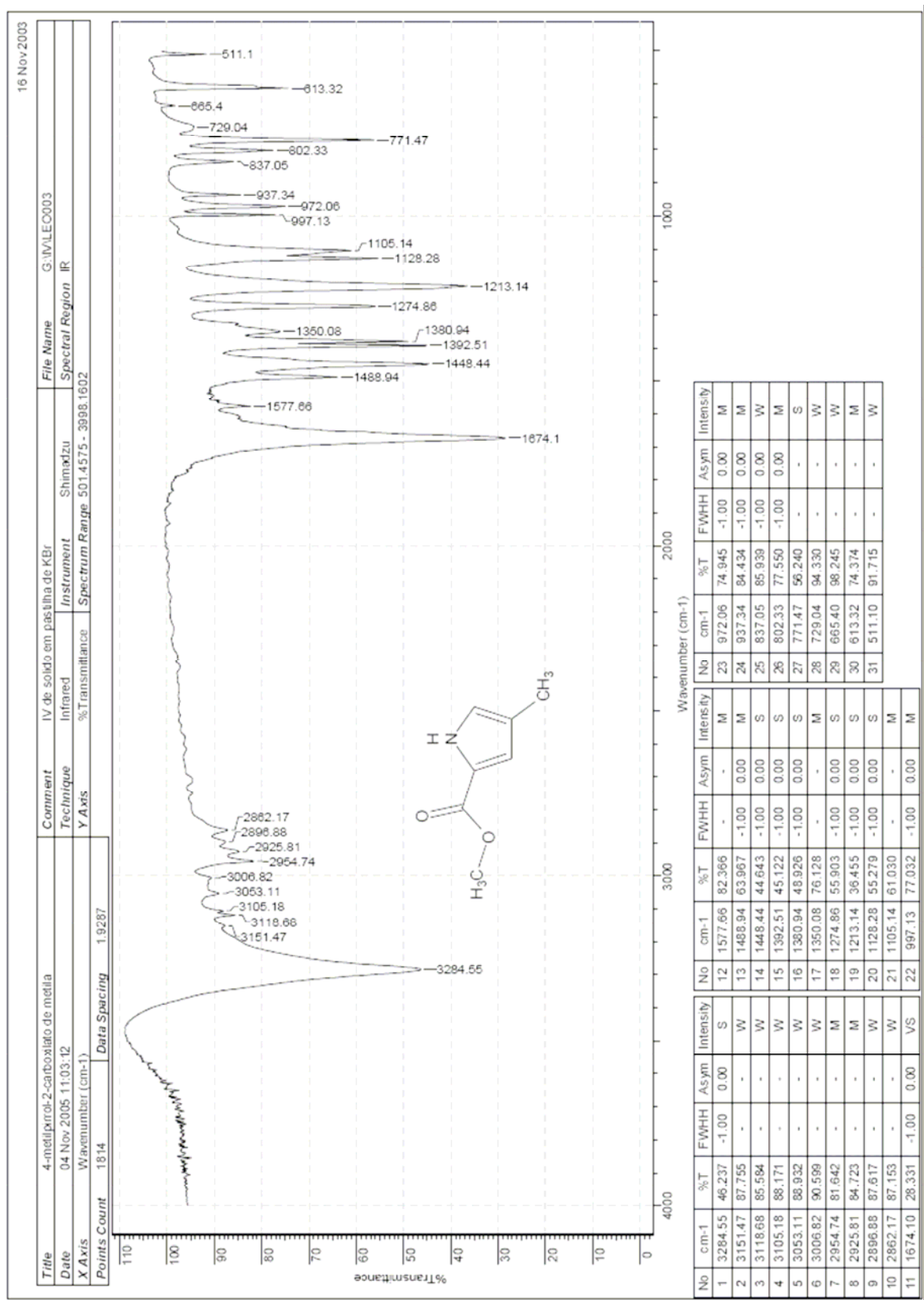
APÊNDICE E – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do isocianoacetato de metila (10).



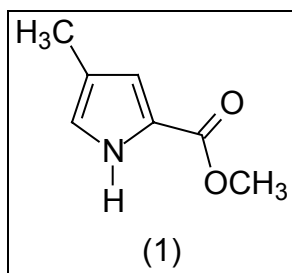
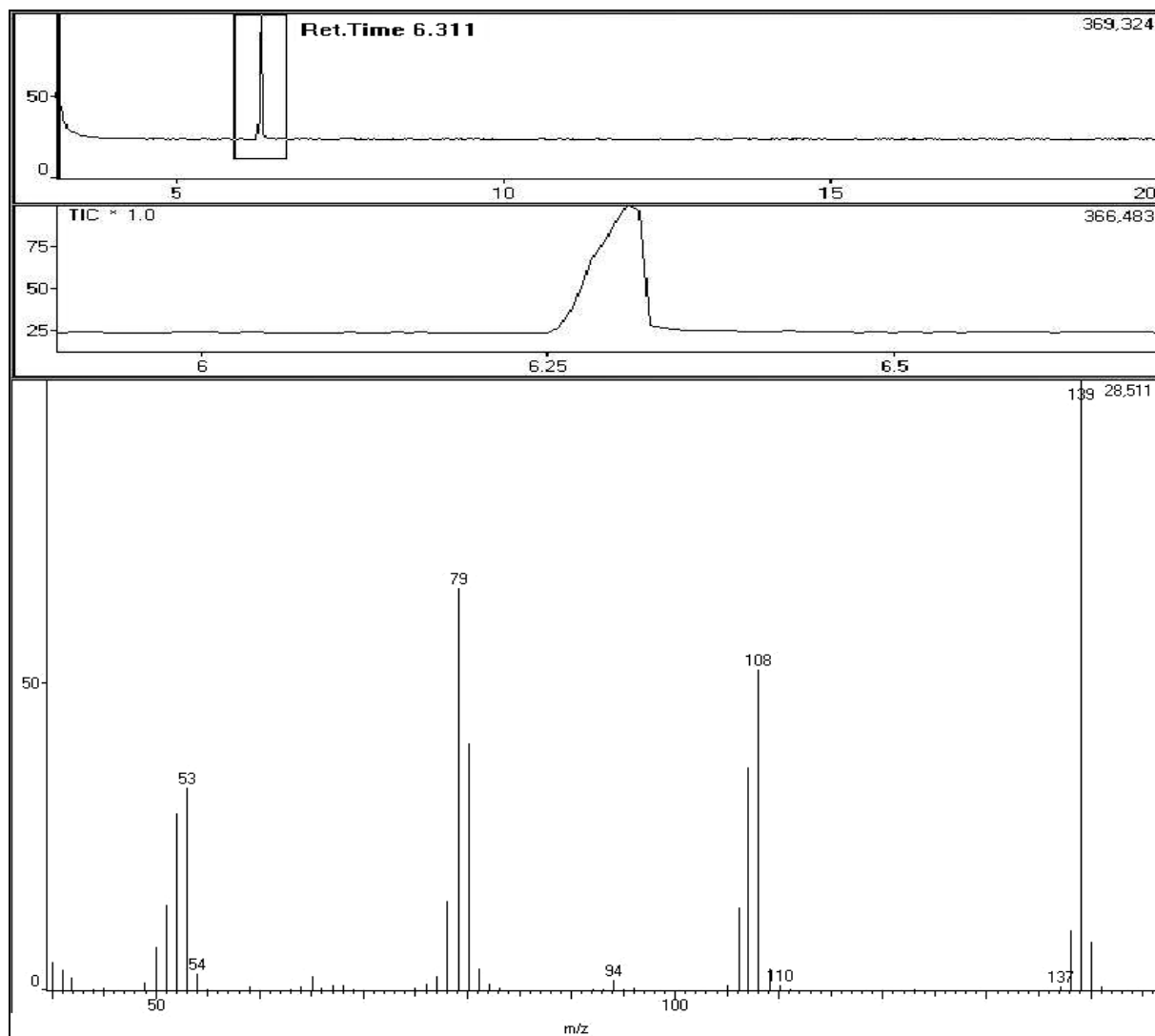
APÊNDICE F – Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do isocianoacetato de metila (10).



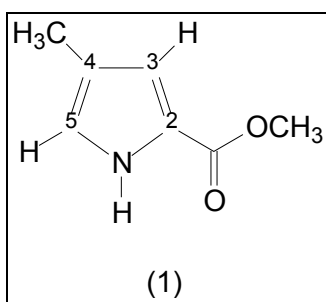
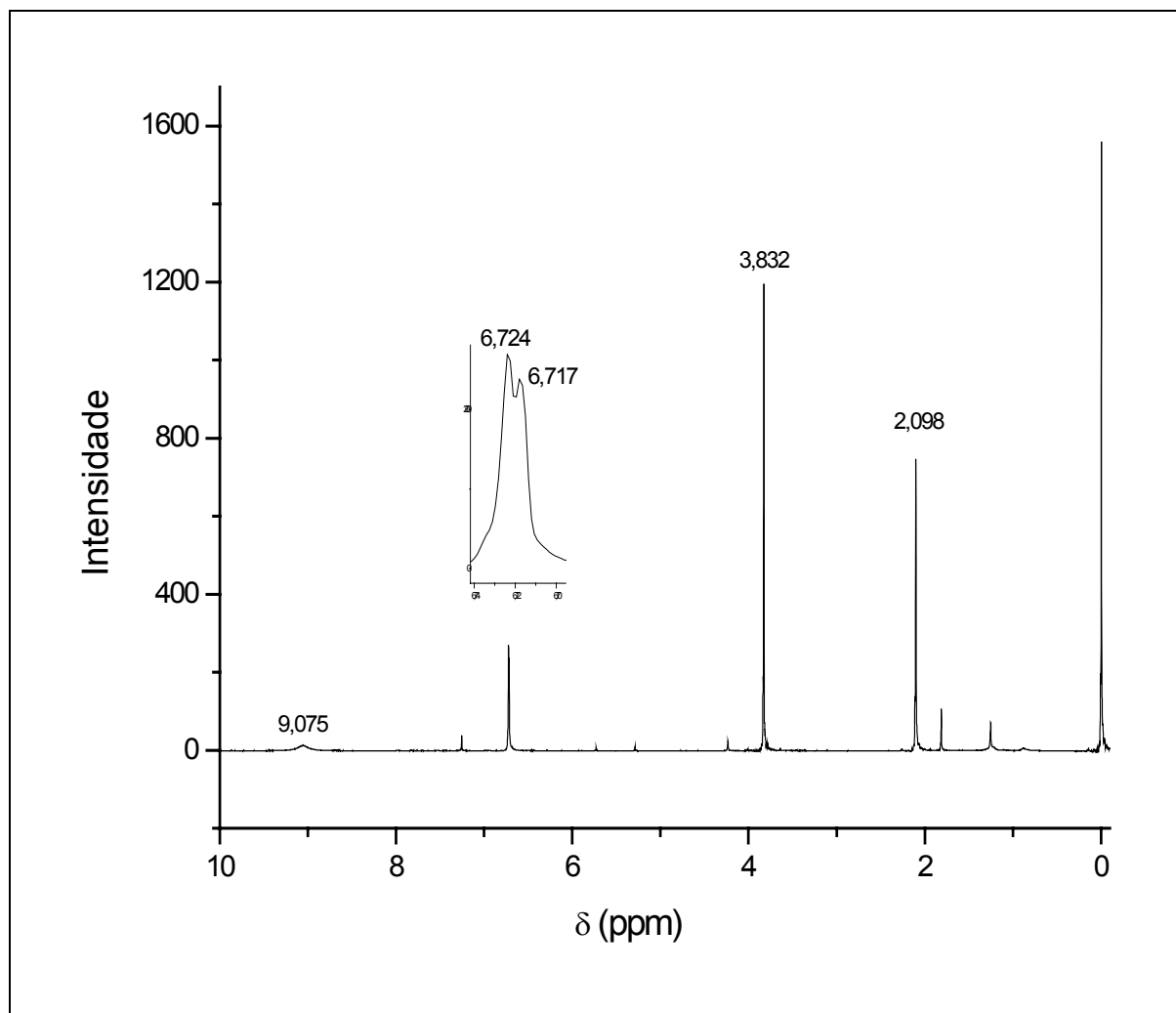
APÊNDICE G – Espectro de IV do 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (1) (pastilha de KBr).



APÊNDICE H – Análise cromatográfica com espectro de massas do 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (1).



APÊNDICE I – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (1).



APÊNDICE H – Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (1).

