

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PROPESP
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA – MBT

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE NOVOS DERIVADOS
DE NEONICOTINÓIDES EM *Anopheles darlingi* ROOT, 1926 (DIPTERA:
CULICIDAE)**

ROCHELly DA SILVA MESQUITA

Manaus - AM
Setembro – 2012

ROCHELLY DA SILVA MESQUITA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE NOVOS DERIVADOS
DE NEONICOTINÓIDES EM *Anopheles darlingi* ROOT, 1926 (DIPTERA:
CULICIDAE)**

ORIENTADOR: Dr. WANDERLI PEDRO TADEI
CO-ORIENTADORA: Dr^a. ANA MENA BARRETO BASTOS

Dissertação apresentada à Universidade do Estado do Amazonas – UEA como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

Manaus - AM
Setembro – 2012

Ficha Catalográfica

M582a Mesquita, Rochelly da Silva
Avaliação da atividade inseticida de novos derivados de
neonicotinóides em *Anopheles darling* Root, 1926 (Diptera: Culicidae)/
Rochelly da Silva Mesquita. -- Manaus: Universidade do Estado do
Amazonas, 2012.

xv, 102f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado Amazonas
- Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos
Naturais da Amazônia, 2012. Orientador: . Dr.Wanderli Pedro
Tadei. Co-orientadora: Dra. Ana Mena Barreto Bastos.

Ficha catalográfica elaborada por
Maria Eliana N. Silva – CRB- 11/248

Aos meus pais Reginaldo Mesquita e Isabel Oliveira, por todo carinho, esforço e incentivo à minha educação e ao meu irmão Herbert Mesquita, pela fidelidade e companheirismo, com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e as graças alcançadas.

À Universidade do Estado do Amazonas – UEA e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais do Amazonas pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Dr. Wanderli Pedro Tadei pela orientação, apoio e confiança para a realização deste trabalho. Em meio às conversas descontraídas e críticas construtivas proporcionou meu crescimento profissional.

À Dr^a. Ana Mena Barreto Bastos pela co-orientação, os ensinamentos e a paciência ao longo desses anos, a qual sou grata pela oportunidade de aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos colegas de turma do mestrado: Adriano Nobre, André Araújo, Átila de Souza, Auricélia Matos, Carla Duarte, Daisy Monassa, Daniele Lobo, Daniele Rachel, Débora Guimarães, Eliane Silva, Gabriela Merola, Gláucia da Costa, Lorena Cursino, Manoel Jeffreys, Marla Pontes, Suelen Lima e Taís Xavier que juntos compartilhamos disciplinas, conhecimento e alegria.

A toda equipe do Laboratório de Malária e Dengue – INPA: Acilino de Souza, Carlos Praia, Edineuza Vidal, Elias Pacheco, Francisco Ribeiro “Catita”, Gervilane Ribeiro, Glaúbio Fernandes, Henrique Blaise, Joaquim Carlos, João Bosco, Muana Araújo, Raimundo Nonato, Rodrigo Fogaça, Roseli Cordeiro pela grande ajuda na identificação das espécies, nas coletas, na realização dos experimentos e na convivência diária. Em especial aos amigos Augustto Aleksey, Érika Gomes, Keillen Monick, Lorena Coelho, Rejane Simões, Rafaela Bordalo e Waléria Dasso que, além das constantes ajudas para a realização do trabalho proporcionaram momentos de alegria e de grande amizade.

À Adrielle Macedo, André Sampaio e Lívia Ibernnon do Laboratório de Pesquisa e Produção do IFAM, pela ajuda nos experimentos de síntese dos compostos e a troca de conhecimento.

Ao Dr. Afonso de Souza e ao Felipe Moura que permitiram as análises de espectrometria de massas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de massas situado no Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

Aos meus familiares que mesmo distantes geograficamente, sempre torceram pelas minhas conquistas e, principalmente aos meus pais Reginaldo Mesquita e Isabel Oliveira, meu irmão

Herbert Mesquita e meu tio Francisco Mesquita pelo apoio e por compreenderem minha ausência nesta fase difícil que passamos juntos, em meio aos problemas de saúde de minha mãe.

Aos amigos Any de Andrade, Cileode Lima, Daiana Torres, Darla Araújo, Débora Guimarães, e Énio Pereira, pelos momentos de alegria, apoio e conversas edificantes.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o
melhor fosse feito. Não sou o que deveria
ser, mas não sou o que era antes.
Martin Luther

RESUMO

Dentre as estratégias de controle da malária, o uso dos inseticidas químicos constitui em um dos procedimentos mais utilizados para o combate ao vetor. O controle de insetos requer um maior número de substâncias biologicamente ativas, como alternativas viáveis, associadas a outras práticas de controle. Neste trabalho foi realizada síntese de novas substâncias, com atividade inseticida, derivadas de neonicotinóides, uma nova classe de inseticidas químicos. As reações de síntese dos compostos ocorreram por meio de reações de adição, de redução e nitração. Os produtos foram caracterizados de acordo com o ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de massas, RMN de ^1H e ^{13}C . Para a avaliação da atividade inseticida dos compostos sintetizados e do imidacloprido (Provado[®] - produto comercial do neonicotinóide) foram realizados bioensaios seletivos e de dose com larvas de *A. darlingi*, para avaliar a toxicidade dos compostos e posterior cálculo de CL_{50} . A toxicidade contra os mosquitos adultos foi avaliada por meio de provas biológicas de garrafa. Utilizando os dados de espectrofotometria, foi sugerida a estrutura de três compostos: 3-ácido piridinacarboxílico 6-cloro 2-carbotioamida hidrazina, 3-hidroxipiridina 6-cloro 2-aminotimetil hidrazina e possíveis isômeros de 5-nitrobenzoil 3-ácido piridinacarboxílico 6-cloro 2-carbotioamida hidrazina. Dentre eles, apenas 3-ácido piridinacarboxílico 6-cloro 2-carbotioamida hidrazina não apresentou atividade larvicida. Os bioensaios de dose para os compostos sintetizados e para o imidacloprido apresentaram valores de χ^2 não significativos, indicando que os dados se ajustaram ao modelo de *probit*, nos intervalos de leitura. Os valores da CL_{50} foram de 503 ppm e 0,17 ppm respectivamente para o composto 2 e para o imidacloprido, após 24 horas de exposição. Nos testes de prova biológica de garrafa, não se detectou mortalidade dos mosquitos para os produtos sintetizados. Portanto, as diferentes modificações estruturais das moléculas derivadas de neonicotinóides mostraram baixa eficiência inseticida dos produtos sintetizados, que pode estar relacionado aos radicais substituintes da molécula, que contribuíram para alterar a atividade biológica, quando comparada ao composto comercial, imidacloprido.

Palavras-chave: neonicotinóides, atividade larvicida, *Anopheles darlingi*, síntese de compostos, imidacloprido.

ABSTRACT

Amongst malaria control strategies, the use of chemical insecticides constitutes, so far, one of the most utilized methods for fighting its vector. Insect control methods call for a larger number of biological active substances for being utilized as feasible alternatives, as associated to other control procedures. The present work undertook the synthesis of new insecticide activity bearing substances derived from neonicotinoids, a new class of chemical insecticides. Compound synthesis responses occurred through addition, reduction and nitration reactions. Products were characterized according to their melting point, infrared spectroscopy, mass spectroscopy, RMN of ^1H and ^{13}C . So as to evaluate the insecticidal activity of synthesized compounds and imidacloprid (Provado[®] - neonicotinoid commercial product), selective and dose bioassays were carried out with *A. darlingi* larvae for assessing compound toxicity and subsequent calculation of the CL_{50} , through the use of the POLO-PC[®] software. The toxicity against adult mosquitoes was evaluated by means of bottle biological proofs. Using data acquired through spectrophotometry, three compounds were suggested: 3- piridincarboxilic acid 6-chloro 2-hidrazine carbotioamide, 3-hidroxi piridine 6-chloro 2- hidrazine aminetiometil and possible isomers of 5-nitrobenzoil 3- piridinacarboxilic acid 6-chloro 2-carbotioamide hidrazine. Amongst these, only 3- piridinacarboxilic acid 6-chloro 2-carbotioamide hidrazine failed to present larvicidal activity in the selective bioassays. Dose bioassays for synthesized compounds as well as imidacloprid presented non-significant χ^2 values, indicating that data adjusted itself to the *probit* model, within the reading gaps. The CL_{50} values showed to be 503 ppm and 0.17 ppm for compound 2 and imidacloprid, respectively, following 24 h of exposure. Bottle biological proof tests detected no mosquito mortality for the synthesized products. Therefore, different structural modifications of the molecule derived from neonicotinoids showed the synthesized products low insecticidal efficiency, which may be related the molecule's substituting radicals that contributed for altering the biological activity, when compared to the commercial compound, imidacloprid.

Keywords: neonicotinoids, larvicidal activity, *Anopheles darlingi*, compounds synthesis, imidacloprid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular do DDT.....	27
Figura 2: Estrutura molecular do malation.....	28
Figura 3: Estrutura molecular do carbaril (A) e do propoxur (B), ambas pertencem aos carbamatos.....	29
Figura 4: Estrutura molecular da alfacipermetrina (A), cipermetrina (B), deltametrina (C) e lambdacyalotrina (D).....	31
Figura 5: Estrutura molecular da nicotina.....	32
Figura 6: Estrutura molecular dos principais inseticidas derivados de neonicotinóid.....	34
Figura 7: Região protonada no inseticida imidacloprido (íons positivos nos átomos de nitrogênio) e na molécula de acetilcolina.....	37
Figura 8: Imagem de satélite da zona leste da cidade de Manaus-AM, em destaque, os pontos de coleta dos alados e imaturos: AL01: Cristo Vive Ramal 11; AL02:Raifram; IM01: Carlão; IM02: Ramal 9; IM03: Portela.....	40
Figura 9: Estruturas e respectivas nomenclaturas dos três produtos sintetizados.....	46
Figura 10: Coleta de larvas no campo(A) e bacias de poliestireno contendo as larvas (B)....	49
Figura 11: Gaiolas com mosquitos.....	49
Figura 12: Copos plásticos contendo as desovas.....	50
Figura 13: Realização dos bioensaios seletivos.....	51
Figura 14: Bioensaios de dose.....	52
Figura 15: Impregnação das garrafas (A), distribuição dos mosquitos na garrafa (B) e leitura da mortalidade (C).....	54
Figura 16: Espectro de infravermelho para o composto 1 a partir da rota sintética 1.....	59
Figura 17: Espectro de RMN- ¹ H para o composto 1 a partir da rota sintética 1.....	61
Figura 18: Estrutura proposta para a tiossemicarbazida identificada a partir da rota sintética 1.....	58
Figura 19: Espectro de RMN- ¹³ C para o composto 1 a partir da rota sintética 1.....	63
Figura 20: Espectro de infravermelho para o composto 1 a partir da rota sintética 2.....	65
Figura 21: Espectro de RMN- ¹ H para o composto 1 a partir da rota sintética 2.....	67
Figura 22: Espectro de RMN- ¹³ C para o composto 1 a partir da rota sintética 2.....	69
Figura 23: Estrutura molecular e posição dos hidrogênios e carbonos do composto 1.....	70
Figura 24: Espectro de massas em MS ⁴ do íon quasi-molecular em m/z 211 [M-H] ⁻ por ESI-IT-MS para o composto 1 sintetizado a partir da rota sintética 2.....	71

Figura 25: Espectro de infravermelho para o composto 2.....	73
Figura 26: Espectro de RMN- ¹ H para o composto 2.....	75
Figura 27: Espectro de RMN- ¹³ C para o composto 2.....	77
Figura 28: Estrutura molecular e posição dos hidrogênios e carbonos do composto 2.....	78
Figura 29: Espectro de massas em MS ⁴ do íon quasi-molecular em m/z 213 [M-H] ⁺ por ESI-IT-MS para o composto 2.....	79
Figura 30: Espectro de infravermelho para o composto 3 (rota sintética 1).....	81
Figura 31: Espectro de RMN- ¹ H para o composto 3 (rota sintética 1).....	82
Figura 32: Espectro de infravermelho para o composto 3 (rota sintética 2).....	84
Figura 33: Espectro de RMN- ¹ H para os isômeros do composto 3 (rota sintética 2).....	87
Figura 34: Espectro de RMN- ¹³ C para isômeros do composto 3 (rota sintética 2).....	90
Figura 35: Possíveis estruturas moleculares para os isômeros do composto 3 nas posições <i>orto</i> (A), <i>para</i> (B) e <i>meta</i> (C).....	91
Figura 36: Espectro de massas em MS ⁴ do íon quasi-molecular em m/z 179 [M-H] ⁻ por ESI-IT-MS para o composto 3.....	92
Figura 37: Representação gráfica da mortalidade das larvas para o composto 2 (A), 5composto 3 (B) e imidacloprido (C) nas diferentes concentrações.....	99
Figura 38: Aspecto morfológico das larvas após exposição do composto 2 (A), composto 3 (B) e imidacloprido (C).....	100
Figura 39: Percentual de mortalidade dos mosquitos adultos para o imidacloprido.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pontos de coleta dos alados e imaturos com as respectivas coordenadas geográficas.....	41
Tabela 2: Principais bandas de absorção do espectro de infravermelho para o composto 1 (rota sintética 1).....	58
Tabela 3: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ¹ H para o composto 1 (rota sintética 1) em solvente DMSO d ₆ , 500MHz.....	60
Tabela 4: Principais bandas de absorção do espectro de infravermelho para o composto 1 a partir da rota sintética 2.....	64
Tabela 5: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ¹ H para o composto 1 sintetizado a partir da rota sintética 2 em solvente DMSO d ₆ , 500MHz.....	66
Tabela 6: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ¹³ C para o composto 1 formado a partir da rota sintética 2 em solvente DMSO d ₆ , 126MHz.....	68
Tabela 7: Principais bandas de absorção do espectro de infravermelho para o composto 2.....	72
Tabela 8: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ¹ H para o composto 2.....	74
Tabela 9: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ¹³ C para o composto 2.....	76
Tabela 10: Principais bandas de absorção do espectro de infravermelho para o composto 3 (rota sintética 2).....	83
Tabela 11: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ¹ H para o composto 3 na posição <i>orto</i> em solvente DMSO d ₆ , 500MHz.....	85
Tabela 12: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ¹ H para o composto 3 na posição <i>para</i> em solvente DMSO d ₆ , 500MHz.....	86
Tabela 13: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ¹ H para o composto 3 na posição <i>meta</i> em solvente DMSO d ₆ , 500MHz.....	86
Tabela 14: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ¹³ C para o composto 3 (rota sintética 2) na posição <i>orto</i> em solvente DMS d ₆ , 126MHz.....	88
Tabela 15: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ¹³ C para o composto 3 (rota sintética 2) na posição <i>para</i> em solvente DMS d ₆ , 126MHz.....	89

Tabela 16: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ¹³ C para o composto 3 (rota sintética 2) na posição <i>meta</i> em solvente DMS d ₆ , 126 MHz.....	89
Tabela 17: Percentual de mortalidade das larvas observada nos bioensaios seletivos para os diferentes compostos.....	96
Tabela 18: Cálculo da CL ₅₀ para os diferentes compostos.....	97
Tabela 19: Absorbância dos compostos 2 e 3 nas frequências de 252 e 237nm, respectivamente.....	102

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Rota sintética para preparação do ácido cloronicotínico.....	41
Esquema 2: Rota sintética para preparação do composto 1.....	42
Esquema 3: Rota sintética da reação de redução do composto 1 para o composto 2.....	44
Esquema 4: Síntese do composto 3.....	44
Esquema 5: Processo de obtenção de KClO_3 em excesso e ácido cloronicotínico.....	57

LISTA DE SÍMBOLOS

DDT: dicloro-difenil-tricloroetano

AChE: enzima acetilcolinesterase

nAChR: receptores de acetilcolina

E: configuração molecular em lados opostos

Z: configuração molecular para o mesmo lado

K: potássio

Na: sódio

CL₅₀: concentração letal mediana

mL: mililitros

°C: graus Celsius

mol: molaridade

pH: potencial hidrogeniônico

cm: centímetros

mg: miligramas

cm⁻¹: centímetro a menos um

MHz: megahertz

T: tonelada

RMN: ressonância magnética nuclear

m/z: íon massa-carga

λ: comprimento de onda

nm: nanômetro

ppm: partes por milhão

min: minutos

SC: suspensão concentrada

DMSO: dimetilsulfóxido

μL: microlitros

μg: micrograma

δ: deslocamento químico

χ²: qui-quadrado

IC: intervalo de confiança

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS.....	V
EPÍGRAFE.....	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ESQUEMAS.....	XV
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XVI
1.INTRODUÇÃO.....	19
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1Distribuição geográfica e principais <i>vectores da malária</i>	22
2.2Controle da Malária.....	24
2.3 Classificação dos inseticidas químicos.....	25
2.3.1 Organoclorados.....	27
2.3.2 Organofosforados.....	28
2.3.3 Carbamatos.....	29
2.3.4 Piretróides.....	29
2.4 Nova classe de inseticidas: neonicotinóides.....	31
2.4.1Mecanismo de ação.....	36
3. OBJETIVO GERAL.....	38
3.1Objetivos específicos.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Local e desenvolvimento das etapas do trabalho.....	39
4.2 Localidades de coleta dos anofelinos.....	39
4.3 Síntese do ácido cloronicotínico.....	40
4.4 Síntese do composto 3-ácido piridinacarboxílico 6-cloro 2-carbotioamidahidrazina.....	42
4.4.1 Rota sintética 1.....	42
4.4.2 Rota sintética 2.....	43
4.5 Síntese do composto 3-hidroxi piridina 6-cloro 2-aminotiometilhidrazina.....	43

4.6 Síntese do composto 5-nitrobenzoil 3-ácido piridinacarboxílico 6-cloro 2-carbotioamidahidrazina.....	44
4.6.1Primeira rota proposta.....	44
4.6.2Segunda rota proposta.....	45
4.7 Caracterização dos compostos sintetizados.....	46
4.7.1Determinação dos pontos de fusão.....	46
4.7.2Espectroscopia na região do infravermelho.....	47
4.7.3Ressonância magnética nuclear de ¹ H e ¹³ C.....	47
4.7.4Espectrometria de massas.....	47
4.8Manutenção de anofelinos no laboratório.....	48
4.9Avaliação da atividade larvicida.....	50
4.9.1Bioensaios seletivos.....	50
4.9.2 Bioensaios de dose.....	51
4.10Avaliação da atividade adulticida.....	52
4.10.1Prova biológica de garrafa modelo – CDC.....	52
4.11 Análise de dados.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Síntese do ácido cloronicotínico.....	56
5.2 Síntese do composto 1.....	57
5.2.1 Rota sintética 1.....	57
5.2.2 Rota sintética 2.....	64
5.3 Síntese do composto 2.....	71
5.4 Síntese do composto 3.....	79
5.4.1Rota sintética 1.....	79
5.4.2Rota sintética 2.....	83
5.5Avaliação da atividade larvicida.....	94
5.5.1Bioensaios seletivos.....	94
5.5.2Bioensaios de dose.....	97
5.6Avaliação da atividade adulticida.....	101
6.CONCLUSÕES.....	104
7.REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	106

1. INTRODUÇÃO

A incidência de casos de malária, nos últimos dez anos, reduziu 17% em todo o mundo, devido à intensificação do uso de medidas de controle, prevenção e tratamento da doença. Embora os dados registrados indiquem essa redução, a malária continua sendo um problema de saúde pública, em diversos países das regiões tropicais e subtropicais, principalmente no continente Africano (WHO, 2011). No Brasil, cerca de 99,7% dos casos de malária foram registrados em 2010 na região amazônica, correspondendo a 263.323 casos no país, conforme os registros do SIVEP-Malária, 2011.

Contudo, a doença adquiriu maior importância epidemiológica a partir da década de 60, com o surgimento das intensas migrações para a Amazônia, que ocorreram de forma desordenada, em virtude da construção de rodovias, hidrelétricas, assentamentos agropecuário, exploração mineral, entre outros. O rápido crescimento populacional e as intensas modificações ambientais provocaram surtos de malária que alteraram o grau de incidência dessa doença (DEANE, 1986; TADEI *et al.*, 1988).

O principal vetor da malária humana no Brasil é *Anopheles darlingi* Root, 1926. A espécie apresenta elevado nível de antropofilia e endofagia, em relação às outras espécies da região amazônica. Em virtude disso, *A. darlingi* é a espécie mais relacionada às alterações ambientais decorrentes das ações antrópicas, favorecendo a transmissão da malária (DEANE, 1986; TADEI *et al.*, 1993; PÓVOA *et al.*, 2000; TADEI *et al.*, 2010).

Os estudos entomológicos realizados na região amazônica mostram as frequências e a distribuição das espécies de interesse epidemiológico, em áreas alteradas, que constituem a base para a implementação das ações de controle vetorial (TADEI *et al.*, 1988; 1993; PÓVOA *et al.*, 2001). Em consonância aos dados entomológicos, as ações de controle utilizam as medidas tradicionais de combate ao vetor baseada na termonebulização, borrifação intradomiciliar, aplicação de biolarvicidas nos criadouros, busca ativa e tratamento adequado dos casos, sempre considerando o diagnóstico precoce da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Durante as campanhas de erradicação da malária que ocorreram em vários países, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendava a borrifação intradomiciliar do inseticida químico dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), que durante muitos anos foi eficaz no controle do vetor, em extensas áreas do planeta. Entretanto, Barata (1995) e Loiola *et al.*

(2002) relataram que, em decorrência das condições ambientais da região amazônica, a campanha de erradicação fracassou, inviabilizando o sucesso do controle da doença.

O programa da malária, preconizado pela OMS, está focado no combate do parasito em paralelo ao vetor, por meio do controle integrado. Dentre as estratégias de controle, o uso de inseticidas químicos contribui para o desenvolvimento de espécies resistentes (WHO, 2011).

De acordo com Suarez *et al.* (1990), o primeiro relato de resistência fisiológica ao DDT em relação ao *A. darlingi* foi observado no nordeste da Colômbia. Com o crescente número de espécies resistentes ao DDT, desde o seu uso abusivo, havia uma necessidade de novos produtos alternativos.

Além do mais, o DDT apresenta longa persistência no solo e na água, influenciando diretamente na cadeia alimentar e, conseqüentemente, provocando danos à saúde humana. Assim como os inseticidas organoclorados, estudos realizados com os organofosforados demonstram que porções moleculares destes produtos podem aderir ao tecido adiposo, mesmo após duas semanas de aplicação (NUNES e TAJARA, 1998; CRINNION, 2000).

De acordo com Santos *et al.* (2007) e Kaneco (2011), a porção contendo ácido e álcool nos piretróides são rapidamente e completamente excretados na urina, dentre vários dias após administração, em razão da maior solubilidade em água. Em uma exposição prolongada e em doses elevadas, seja oral, dermal ou mesmo por inalação, os piretróides podem apresentar efeitos carcinogênicos.

Além dos piretróides, o surgimento de outras moléculas bioativas derivadas de extratos vegetais desencadeou um novo método promissor de controle, tanto das formas imaturas – larvicidas, como dos insetos adultos – adulticidas.

De um modo geral, estas substâncias naturais ainda possuem limitações para a utilização intensa no controle vetorial, de forma que a baixa persistência (em decorrência da instabilidade molecular) e elevado custo interferem na efetividade dos produtos (SALEHZADEH *et al.*, 2002; SIMAS *et al.*, 2004; ALBERT e GALLARDO, 2005).

Em razão dos inúmeros danos causados ao meio ambiente e à saúde humana, com o uso crescente de inseticidas químicos, novos produtos vêm surgindo acompanhados de novas estratégias e tecnologias. Neste sentido, surge a nanotecnologia como uma nova ferramenta que trás propostas de encapsulamento de produtos, ampliando o espectro de ação dos mesmos, potencializando assim a sua atividade, o que resulta na redução de produtos liberados ao meio ambiente (DURÁN *et al.*, 2006). Casida e Quistad (1998) relatam que a busca de novas

moléculas para o controle de insetos e pragas está relacionada com a segurança à saúde e ao ambiente, sendo necessário analisar produtos que vêm surgindo, levando em consideração o seu mecanismo de ação, especificidade, degradação no meio ambiente e, conseqüentemente, os impactos causados à saúde humana.

No entanto, atualmente continuam relativamente escassos os estudos que tratam da busca de novos compostos por sínteses, quando comparados à necessidade de novos produtos alternativos para serem incorporados nos atuais programas de controle (ZAIM e GUILLET, 2002; ROSE, 2001).

A partir da década de 70, os neonicotinóides surgiram como uma nova classe química de inseticidas sintéticos, a partir do extrato natural da nicotina. As modificações realizadas na estrutura química deste produto natural, objetivaram a estabilidade molecular no sentido de aumentar a eficácia destes novos inseticidas até então sintetizados (YAMAMOTO *et al.*, 1992; JESCHKE e NAUEN 2008).

Os casos de toxicidade humana por meio dos inseticidas neonicotinóides não são extensivamente descritos na literatura, em razão dos baixos números de casos registrados, como descrevem Mohamed *et al.* (2009). Todavia, os efeitos provocados pelos neonicotinóides por longos períodos de exposição podem variar, tais como, dores abdominais, taquicardia, tonturas, náuseas e vômitos. Em casos mais graves, já foram relatados insuficiência respiratória, convulsões e, em poucos casos, morte, o que pode ser levado em consideração que na maioria das vezes os casos mais graves possivelmente ocorreram por intoxicação oral, como relataram Proença *et al.* 2009.

Contudo, análogos de neonicotinóides têm sido desenvolvidos, com o objetivo de ampliar o leque de moléculas sintéticas com atividade biológica. O potencial inseticida desta classe está relacionado com a capacidade de desencadear excitação no sistema nervoso dos insetos, ou seja, alteração na entrada e saída de íons de sódio e potássio no interior das células nervosas, ocasionando a morte do inseto (BUCKINGHAM *et al.*, 1997; TOMIZAWA e CASIDA, 2002; MILLAR e DENHOLM, 2007).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Distribuição geográfica e principais vetores da malária

A malária é uma doença parasitária, endêmica em várias regiões do globo terrestre e de ampla distribuição geográfica. Ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, faixa que concentra grande número populacional. Atualmente, cerca de 3,3 bilhões de pessoas estão em locais de risco de contrair a doença, sendo registrados de 149 a 274 milhões de novos casos, com aproximadamente 655.000 mortes (WHO, 2011).

Embora o continente africano seja responsável por 81% dos casos de malária, quando comparado aos anos anteriores observa-se que houve uma redução do número de casos. Estima-se que em 2010 ocorreram cerca de 174 milhões de casos na região africana, a outra parcela fica por conta dos continentes Americano e Asiático (WHO, 2011).

A malária é uma doença causada por protozoários pertencentes à família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885. Dentre as espécies de plasmódio causadoras de malária, cinco se destacam por parasitarem o homem: *Plasmodium vivax* Grassi e Feletti, 1890; *Plasmodium falciparum* Welch, 1897; *Plasmodium malariae* Laveran, 1881; *Plasmodium ovale* Stephens, 1922 e *Plasmodium knowlesi* Knowles e Das Gupta, 1932 (FORATTINI, 2002; SINGH *et al.*, 2004).

O *P. ovale* acomete principalmente o continente africano seguido do continente asiático. Enquanto que o *P. knowlesi* durante muito tempo foi considerado uma malária simiana (tendo como hospedeiros os macacos), atualmente na Ásia há vários registros de malária acometendo o homem por esse plasmódio (SINGH *et al.*, 2004).

No Brasil ocorrem três espécies de plasmódio capazes de causar infecção ao homem: *P. vivax*, espécie mais frequente e representa cerca de 86,8% dos casos. *P. falciparum* é responsável por 13,1% dos casos sendo a forma mais grave e letal da doença. *P. malariae* apresenta o menor número de casos em relação às outras espécies predominantes no país (SIVEP-Malária, 2011).

Os parasitos são transmitidos ao homem pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* Meigen, 1818, que pertencem à ordem Diptera, família Culicidae, sendo as principais espécies vetoras, no Novo Mundo, representadas pelos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* (FORATTINI, 2002).

No Brasil são conhecidas cerca de 50 espécies de anofelinos e, na Amazônia brasileira, as que apresentam importância vetorial são pertencentes ao subgênero *Nyssorhynchus*. Dentre elas, *A. darlingi* é a principal espécie transmissora de malária humana na Amazônia. Já as espécies *Anopheles albitarsis* Lynch Arribalzaga, 1878, *Anopheles nuneztovari* Gabaldon, 1940, *Anopheles triannulatus* Neiva e Pinto, 1922 e *Anopheles oswaldoi*, Peryassu, 1922 apresentam-se como possíveis vetores ocasionais, mesmo em alta densidade (DEANE, 1986; TADEI e DUTARY-THATCHER, 2000).

A. darlingi está distribuída geograficamente desde o sul do México até o norte da Argentina. A espécie apresenta acentuada antropofilia, tendo preferência em realizar o repasto sanguíneo (hematofagia) no homem. A transmissão da malária pode ocorrer dentro (endofilia) ou fora (exofilia) dos domicílios mesmo em baixa densidade, representando parâmetros importantes para a capacidade vetorial da espécie (DEANE, 1986, 1989; TADEI *et al.*, 1993; PÓVOA *et al.*, 2000).

Atualmente no Brasil, a malária está praticamente confinada à região amazônica e *A. darlingi* é a espécie que melhor e mais rapidamente se beneficia das alterações que o homem produz no ambiente silvestre (com a abertura de novas estradas, a construção de usinas hidrelétricas, exploração de minerais e combustíveis fósseis). Portanto, a alteração do abrigo natural dos anofelinos e os locais de reprodução das espécies coloca o homem em maior contato com os vetores (DEANE 1948, 1986; TADEI *et al.*, 1998).

Os anofelinos possuem desenvolvimento holometábolo, ou seja, sua metamorfose é completa, dividida em quatro estágios: ovo, larva (com 4 estádios), pupa e adulto. Os ovos são depositados na superfície da água e, após a eclosão, passam pelos estádios larvais até o estágio de pupa. Após esta fase, o mosquito adulto emerge estando pronto para a reprodução e dispersão, completando assim seu desenvolvimento. Os imaturos desenvolvem-se em criadouros de diversas características, tais como em águas limpas, ensolaradas ou pouco ensolaradas, próximos à vegetação ou detritos flutuantes na superfície da água (LOURENÇO DE OLIVEIRA *et al.*, 1989; TADEI, 1993; FORATTINI, 2002).

A transmissão da malária, em áreas endêmicas da região, está relacionada a fatores bioecológicos e dentre os quais pode-se destacar, as variações de águas pretas (ácidas) e águas brancas (ligeiramente básicas), os ciclos de enchente e vazante que proporcionam uma maior diversidade e densidade de anofelinos específicos de cada localidade, com diferentes padrões comportamentais (TADEI e DUTARY-THATCHER, 2000; TADEI *et al.*, 2010).

2.2 Controle da Malária

Segundo Deane (1986), as primeiras referências de casos de malária no país ocorreram em 1587, não sendo encontrado nenhum registro de epidemia nas primeiras décadas após a colonização. Por outro lado, no início do século XX uma grande epidemia foi registrada na região amazônica durante a construção da ferrovia Madeira-Mamoré e no ciclo da borracha.

Outra epidemia ocorreu em meados da década de 30 no nordeste brasileiro, após a invasão do *Anopheles gambiae* Giles, 1926. Vários esforços foram concentrados com o objetivo de erradicar o vetor da malária no país, como preconizava a OMS (SILVEIRA e REZENDE, 2001; COURA *et al.*, 2006; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

Dentre as estratégias adotadas para a erradicação da malária na década de 60, a aplicação intradomiciliar do DDT visava à redução da morbidade e as perdas socioeconômicas provocadas pela grande epidemia da doença. Esta aplicação, recomendada pela OMS, gerou um impacto significativo no combate à malária nas regiões nordeste, sul e sudeste do país, naquele momento (SILVEIRA e REZENDE, 2001; LOIOLA *et al.*, 2002).

Na região amazônica, a campanha de erradicação da malária fracassou em decorrência aos fatores ambientais, epidemiológicos, sociais e econômicos. Em consequência disso, ao final da década de 80, a região era responsável por cerca de 90% dos casos registrados no país (BARATA, 1995; LOIOLA *et al.*, 2002).

A principal técnica adotada no controle de vetores foi a borrifação intradomiciliar, que foi perdendo força e qualidade visto que, o uso do DDT no Brasil foi suspenso em virtude da sua utilização indiscriminada e os primeiros registros de casos de resistência (BARATA, 1995; LOIOLA *et al.*, 2002).

O primeiro caso de resistência ao DDT foi observado em 1951, na Grécia, Iran e Turquia para o *Anopheles sacharovi* Favre, 1903. De acordo com a OMS, em 1958 havia 38 espécies de anofelinos resistentes a inseticidas. Sendo que 15 espécies tinham adquirido resistência somente ao DDT (WHO, 1970).

Estudos realizados por Suarez *et al.* (1990) compararam a susceptibilidade do *A. darlingi* ao DDT em três localidades da Colômbia, duas na região nordeste (municípios de Quibdo e Riosucio, Choco) e região sudeste (município de Puerto Lleras, Meta). Os resultados afirmaram que os mosquitos coletados em Quibdo foram 14,3 vezes mais susceptíveis que Puerto Lleras, enquanto que Riosucio foi 2,2 vezes mais que Puerto Lleras. Diante disso, fica confirmado em 1988, o primeiro caso de resistência fisiológica de *A.*

darlingi ao DDT.

A partir de 1993, os antigos programas de erradicação da doença foram substituídos pelo Programa de Controle Integrado da Malária (PCIM) que inclui o tratamento clínico do doente e o combate ao mosquito. No Brasil, o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) preconiza o diagnóstico, o tratamento imediato dos doentes e aplicação de medidas seletivas de controle, tendo como consequência imediata a redução significativa do número de casos e mortalidade em relação aos anos anteriores, embora não tenha sido homogênea em toda a região amazônica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; COURA *et al.*, 2006).

Sendo o foco principal o combate aos parasitos e vetores, que conta com um planejamento a cerca das alternativas adotadas à realidade local, permitindo sua execução de forma eficiente e seletiva. Dentre as ações, os inseticidas químicos estão envolvidos na implementação de estratégias adotadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; BRAGA e VALLE, 2007).

2.3 Classificação dos inseticidas químicos

Os inseticidas são compostos químicos utilizados no controle de insetos, que podem ser aplicados de diferentes formas (termonebulização e borrifação intradomiciliar) em concentrações adequadas. Assim, estes inseticidas podem ser classificados de acordo com a natureza química: inorgânica ou orgânica, tendo em vista, que os primeiros registros do uso de produtos químicos para o controle de insetos e pragas datam desde o ano de 2.500 a. C., com o uso basicamente de produtos inorgânicos (ROZENDAAL, 1997; BRAIBANTE e ZAPPE, 2012).

Estes produtos inorgânicos classificam-se em arsenicais (arsênico branco, arseniato de alumínio, cálcio e chumbo), fluorados (criolita, fluoreto de sódio) e miscelânea que consiste em uma mistura de compostos sulfurados (calda sulfo cálcica, sulfurados, carbonatos, entre outros). Utilizados como larvicidas, estes produtos foram considerados de uso proibido, devido à elevada toxicidade, acumulação em meio aquático, elevado custo de produção, principalmente quando aplicados em grandes superfícies, e a baixa eficiência em locais de ocorrência das vegetações e detritos flutuantes na água. Quando aplicados nos criadouros, estes compostos formavam uma película de óleo na superfície da água que acabavam sendo ingeridos pelas larvas, entrando em contato com o sistema digestivo ou ainda através do contato com o trato respiratório das larvas (ROZENDAAL, 1997; HOCHMAN *et al.*, 2002).

As civilizações antigas adotavam principalmente miscelânea para o controle de insetos. Os chineses foram os primeiros a utilizarem os compostos sulfurados e arsenicais como uma prática de controle (ROZENDAAL, 1997; BECKER *et al.*, 2003).

Ainda no século XIX, um produto chamado Verde Paris (Aceto Arsenito de Cobre), foi utilizado no combate às larvas de anofelinos. Este sal inorgânico era aplicado na superfície da água, dos criadouros das formas imaturas, sem o prévio estabelecimento de normas adequadas para a aplicação, provocando sérios problemas ambientais e socioeconômicos (TAUIL *et al.*, 1985; HOCHMAN *et al.*, 2002).

Neste contexto, os compostos inorgânicos foram substituídos por inseticidas químicos orgânicos. Desde então, o combate aos mosquitos tem sido realizado por meio da aplicação destes inseticidas, que podem permanecer ativo por um longo período de tempo no ambiente. A toxicidade dos inseticidas aplicados pode ser estabelecida através da dose mínima necessária para matar o inseto, o que pode variar de acordo com o produto e com a espécie a serem considerados em cada localidade (COOSEMANS e CARNEVALE, 1995; FLOORE, 2006).

Os inseticidas orgânicos, assim denominados devido à presença de átomos de carbono e hidrogênio, apresentam-se como o grupo de maior importância dentre as classes de inseticidas químicos utilizados atualmente, que podem ser divididos em naturais e sintéticos (CASIDA e QUISTAB, 1998; TOMIZAWA e CASIDA, 2003).

Os compostos orgânicos naturais foram muito utilizados na antiguidade destacando-se os de origem vegetal, pois abrangem a maioria desse grupo. Os povos asiáticos utilizavam extratos à base de flores de piretro de algumas espécies de plantas do gênero *Pyrethrum* Zinn, 1757, para combater insetos e pragas, além do extrato de nicotina e rotenona, muito utilizado em países de regiões tropicais até o advento das moléculas sintéticas (ROSE, 2001; BECKER *et al.*, 2003).

A descoberta dos compostos orgânicos sintéticos possibilitou o surgimento de uma variedade de produtos de diferentes classes químicas, com aplicabilidade para o controle de insetos e pragas. Os compostos de aplicação tópica, definidos como inseticidas de contato, dividem-se em hidrocarbonetos clorados ou organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, atuando no sistema nervoso central dos insetos (SCHAEFER e MULLA, 1980; WHO, 1998).

2.3.1 Organoclorados

Considerado o grupo pioneiro dentre os inseticidas sintéticos, estes inseticidas possuem estrutura molecular à base de carbono, hidrogênio e cloro. Derivados do clorobenzeno, ciclo-hexano ou ciclodieno possuem uma relativa facilidade de síntese, conferindo maior persistência no meio, elevada toxicidade, estabilidade de grande parte dos compostos desta classe à ação da luz solar e temperatura ambiente (NUNES e TAJARA, 1998).

O DDT foi sintetizado pela primeira vez em 1874 por Zeidler, embora suas propriedades inseticidas tenham sido descobertas só em 1939 por Paul Muller (Figura 1). A partir de então, o DDT começou a ser utilizado nos programas de controle da malária, devido a sua eficiência no controle de insetos e pragas (WHO, 1998; D'AMATTO, 2002).

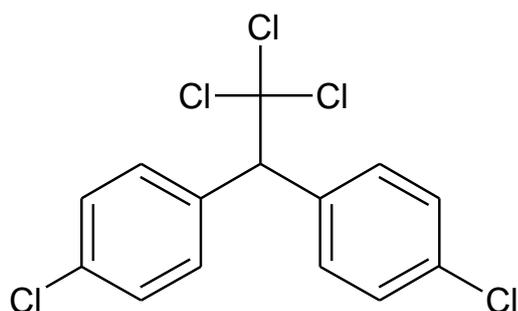


Figura 1: Estrutura molecular do DDT.

Durante a 2ª Guerra Mundial foram desenvolvidos vários modelos de inseticidas organoclorados, destacando aldrin, endrin, BHC, DDT, ensossulfan, heptacloro, lindane, mirex e toxafeno, como os principais. Estes apresentavam grande importância tanto na agricultura quanto no controle de vetores da malária em diversos países (CASIDA e QUISTARD, 1998).

Os organoclorados atuam, inicialmente, nos canais de sódio (Na) e potássio (K) das células nervosas do sistema nervoso central e periférico dos insetos. Os canais abrem-se no momento da transmissão de impulsos nervosos e fecham após a despolarização da célula nervosa (WARE, 2000).

O posicionamento da molécula do inseticida nos canais de Na e K promovem a abertura do canal por um longo período de tempo. Em consequência, potenciais de ação são

desencadeados e repetidos provocando a morte do inseto ou efeito “knockdown” devido à hiperexcitabilidade gerada pelo inseticida (WARE, 2000).

2.3.2 Organofosforados

Constituídos de ésteres orgânicos, ácido fosfórico ou tiossulfônico, esta classe surgiu paralelamente aos organoclorados. Os organofosforados podem ser classificados em alifáticos, derivados de fenil ou heterocíclicos. Os principais inseticidas pertencentes ao grupo são: malation, metil paration, clorpirifos, clorpirifos-metil, fenitrotrion, metamidofos e vidrin (Figura 2) (PLAPP e CASIDA, 1958; WARE, 2000).

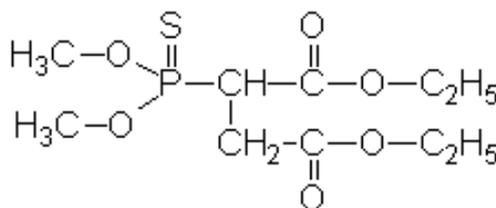


Figura 2: Estrutura molecular do malation.

Estes compostos são amplamente utilizados em saúde pública, embora apresentem algumas desvantagens sobre os organoclorados. Apresentando ação mais rápida, os organofosforados são altamente tóxicos aos organismos aquáticos, em geral apresentam elevada instabilidade química e baixo poder residual, necessitando de maiores aplicações, o que confere maior toxicidade aos insetos e aos mamíferos (RICO *et al.*, 2009).

O mecanismo de ação dos inseticidas organofosforados ocorre através da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) de forma lenta e irreversível, comprometendo o funcionamento do sistema nervoso central dos insetos. A enzima apresenta dois locais distintos, esterático e aniônico, que serve de ligação para a acetilcolina (CASIDA e QUISTAB, 2004b; RIBEIRO e MELLA, 2009; KRISTOFF *et al.*, 2011).

A conformação estrutural das moléculas de organofosforados permite modelar-se ao sítio esterático da enzima AChE por meio do grupamento fosfato, ou seja, reação de fosforilação. O acúmulo de moléculas de acetilcolina na sinapse nervosa leva hiperexcitação do sistema nervoso causando o efeito “knockdown”, desencadeando o processo de paralisia e, conseqüentemente, a morte do inseto (CASIDA e QUISTAB, 2004b; TAIRA *et al.*, 2006).

2.3.3 Carbamatos

Esta classe é constituída de ésteres ácidos derivados do ácido carbâmico apresentando algumas semelhanças aos inseticidas organofosforados. Foram desenvolvidos em 1947 na Suíça, neste grupo destacam-se o carbaril e o propoxur, ambos de uso intradomiciliar (Figura 3A e 3B). Os carbamatos apresentam ação letal rápida sobre os insetos, apesar de um curto poder residual (CASIDA e QUISTAD, 1998; WHO, 1998).

O mecanismo de ação ocorre de forma semelhante aos organofosforados, a enzima AChE é inibida através da reação de carbamilação ao invés da fosforilação. A enzima AChE carbamilada é lentamente hidrolisada e desativada, o que impede a sua atuação no substrato da acetilcolina (CRINNION, 2000; BRAGA e VALLE, 2007).

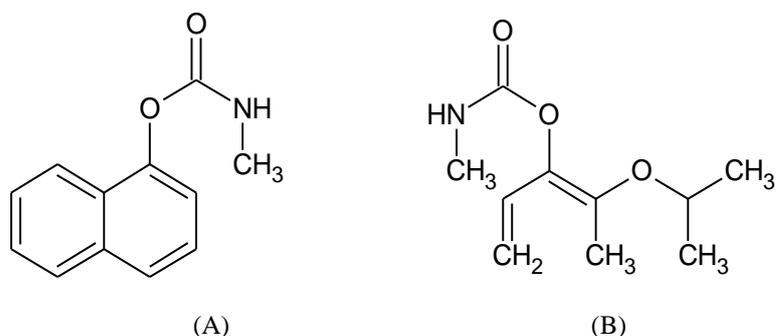


Figura 3: Estrutura molecular do carbaril (A) e do propoxur (B).

2.3.4 Piretróides

Os inseticidas pertencentes a essa classe contém grupos de ésteres derivados das piretrinas, que possuem um conjunto de componentes ativos do extrato de piretro, extraídos a partir de espécies de flores de crisântemo, proveniente dos continentes asiático e africano. Vários estudos procuraram modificar a estrutura química das piretrinas naturais, permitindo reduzir o espectro oxidação e inativação das propriedades inseticidas, quando em contato com a luz solar (ZERBA, 1988; PULMAN, 2010).

A aletrina foi o primeiro inseticida piretróide a ser introduzido nos programas de saúde pública. A aplicação residual da aletrina apresentou maior efetividade no controle aos mosquitos, em decorrência da resistência aos inseticidas anteriormente utilizados nos programas de controle de vetores (ZERBA, 1988; COOSEMANS e CARNEVALE, 1995).

Além da comprovada eficiência, as aplicações com os piretróides necessitam de menores quantidades de produto ativo, com menor risco de contaminação ambiental nas aplicações, sendo pouco ou moderadamente tóxicos aos animais. A ação dos piretróides pode ser potencializada através do sinergismo com diferentes produtos, sejam eles de origem natural ou sintética (SINGH e AGARWAL, 1986).

Com o modo de ação similar ao DDT, agindo diretamente nos canais de sódio e potássio, os piretróides apresentam boa estabilidade sob luz e temperatura ambiente, sendo eficientes no combate a larvas de dípteros, afídeos, lagarta de lepidópteros e alguns coleópteros (ZERBA, 1988; MARTINEZ-TORRES *et al.*, 1998).

O controle químico depende quase que exclusivamente dos piretróides, como alfacipermetrina, cipermetrina, deltametrina ou lambdacyalotrina (Figura 4A, 4B, 4C e 4D). Dentre as estratégias adotadas no controle vetorial, as telas impregnadas com piretróides apresentam-se como instrumentos eficazes (SVS, 2005).

Embora os piretróides apresentem comprovada eficiência no controle de insetos, o uso constante pode levar ao desenvolvimento de populações resistentes, além de proporcionar efeitos tóxicos ao homem, como por exemplo, acúmulo no tecido adiposo, efeitos neurológicos, manifestações cardiovasculares e desenvolvimento de células cancerígenas. Os riscos da ocorrência desses efeitos adversos dependem do composto, da dose e da intensidade de exposição. O que torna importante o manejo dos inseticidas adotados, a busca de novas moléculas bioativas, para que venham contribuir com os produtos atuais (PAUL *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007; PENNETIER *et al.*, 2008).

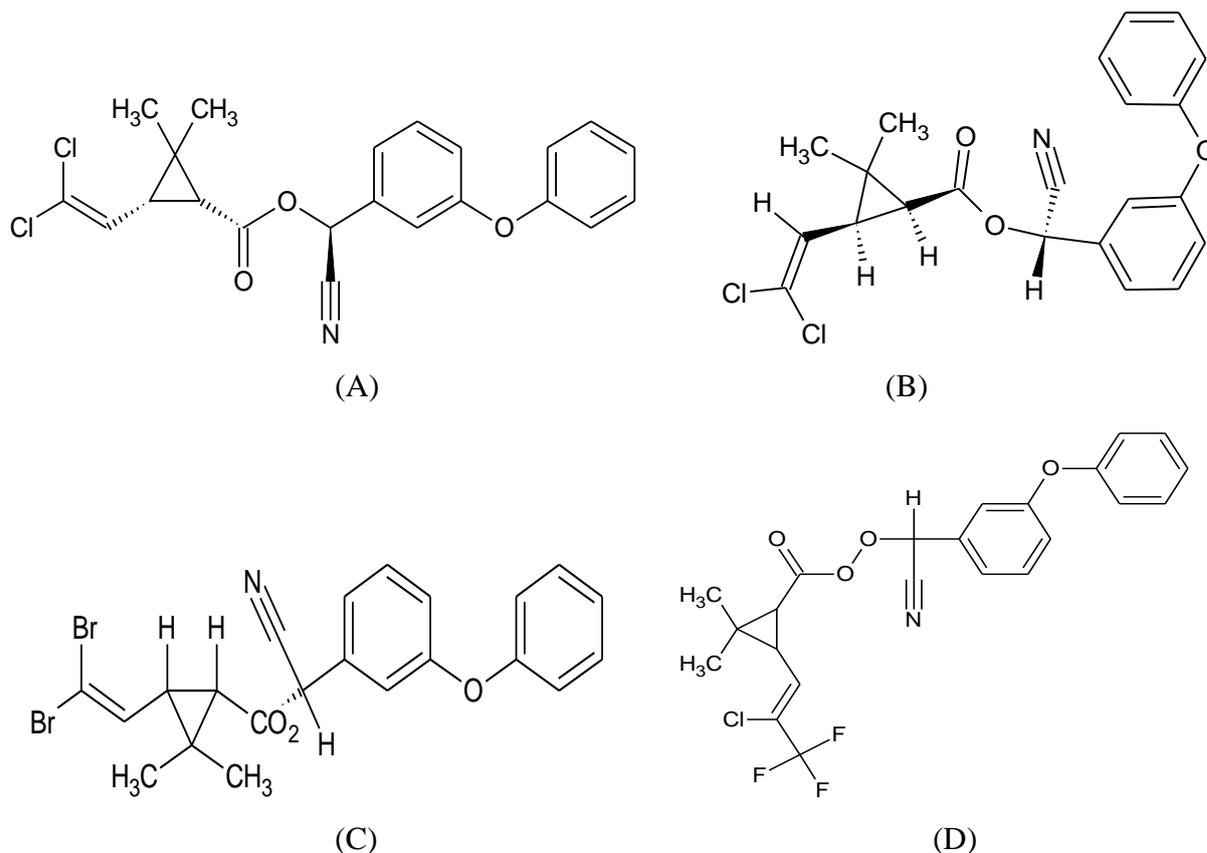


Figura 4: Estrutura molecular da alfacipermetrina (A), cipermetrina (B), deltametrina (C) e lambdacyalotrina(D).

2.4 Nova classe de inseticidas: neonicotinóides

O processo de síntese e elucidação estrutural de inseticidas sintéticos, a partir de extratos vegetais, teve início ainda na década de 20. Deste modo, surgiram vários alcalóides isolados de vegetais com propriedades biológicas. A partir de então, os extratos tiveram suas características estruturais modificadas sinteticamente, a fim de ampliar o espectro de atividade biológica, além de contribuir com a redução dos efeitos de instabilidade molecular, quando comparados aos extratos naturais primários (CASIDA e QUISTAD, 1998; SALEHZADEH *et al.*, 2002; JUNIOR, 2003).

Os baixos investimentos em novos compostos com aplicabilidade comercial vêm diminuindo consideravelmente desde a década de 70, em decorrência não só do mecanismo de resistência, como também do elevado custo de produção de novas moléculas sintéticas com propriedades bioativas (CASIDA e QUISTAD, 1998; ROSE, 2001).

Uma pequena parcela de compostos químicos sintéticos emerge na tentativa de expandir o leque de produtos biologicamente ativos. Os neonicotinóides constituem uma nova classe de inseticidas químicos, desde a década de 70, com um mecanismo de ação diferente dos inseticidas até então sintetizados. Ao agir como agonistas nos receptores de acetilcolinesterase dos insetos, os neonicotinóides “imitam” a molécula de acetilcolina, impedindo sua atuação nos receptores (ELBERT *et al.*, 1998; ZAIM e GUILLET, 2002; ELBERT e NAUEN 2004).

Os neonicotinóides foram sintetizados a partir da nicotina, um alcalóide presente na família Solanaceae, inclusive na *Nicotiana tabacum L.*, popularmente conhecida como fumo ou tabaco (Figura 5). A nicotina atua diretamente nos receptores de acetilcolina (nAChR) dos mamíferos e receptores análogos nos insetos, tornando-se mais tóxico aos mamíferos do que aos insetos (MOREIRA *et al.*, 2006).

Em razão da elevada toxicidade da nicotina em relação aos mamíferos, sucessivas alterações estruturais foram realizadas a fim de reduzir a toxicidade aos organismos não alvo. Este procedimento também poderia reduzir a rápida degradação do alcalóide a luz solar, proporcionando estruturas mais estáveis (KOVGANKO e KASHKAN, 2004; CASIDA, 2011).

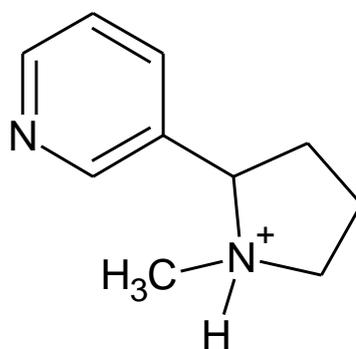


Figura 5: Estrutura molecular da nicotina.

Os derivados de neonicotinóides podem ser classificados como uma importante classe química de inseticidas sintéticos, incorporados recentemente ao mercado global. Atualmente, os produtos são comercializados em cerca de 120 países, principalmente no combate aos insetos sugadores, tais como pulgões, afídeos, moscas brancas, percevejos e um relativo número de coleópteras, entre outros (JESCHKE *et al.*, 2010).

Os principais inseticidas derivados de neonicotinóides surgiram após a síntese de um derivado de nitrometileno, 2-dibromonitrometil 3-metilpiridina, que gerou a molécula de nitiazina. Embora com baixa atividade inseticida, elevada instabilidade química e

fotodegradabilidade quando exposto à luz solar, esta molécula, representa o primeiro protótipo sintetizado (TOMIZAWA e CASIDA, 2003; KOVGANKO e KASHKAN, 2004).

Os resultados obtidos com a aplicação da nitiazina em cultivos de plantas, apresentaram moderada atividade inseticida utilizando como modelo biológico, moscas adultas (*Musca domestica*). Possivelmente, a moderada eficácia do produto estava relacionada à instabilidade molecular da nitiazina, que degradava-se facilmente proporcionando uma baixa atividade inseticida (TOMIZAWA e CASIDA, 2003; JESCHKE e NAUEN, 2008).

Em contínuo processo de otimização estrutural, a nitiazina serviu de base para a obtenção do imidacloprido, o primeiro inseticida neonicotinóide ativo contra afídeos, moscas, cigarrinhas, pulgões, insetos sugadores em geral, com distintas propriedades químicas e biológicas (YAMAMOTO *et al.*, 1995).

Após a síntese e comercialização do imidacloprido na década de 90, a classe química se desenvolveu rapidamente nos dez anos seguintes, surgindo então mais seis compostos ativos tais como: acetamiprido, nitempiram, tiametoxam, tiacloprido, clotianidina e dinotefuran (Figura 6). Divididos em diferentes grupos heterocíclicos classificados em cloropiridina, clorotiazol e tetrahydrofurano das quais fazem associação com outro fragmento estrutural através do grupo metileno (KOVGANKO e KASHKAN, 2004; ELBERT *et al.*, 2008).

Moléculas de nitroguanidinas, nitroiminas ou cianoiminas atuam como farmacóforos nas estruturas de neonicotinóides. Visto que são mais eletronegativos e seletivos à porção catiônica dos receptores nAChR dos insetos, que podem ser atribuída à maior afinidade de ligação das proteínas dos receptores acetilcolina, com os derivados de neonicotinóides em seu determinado sítio ativo (KAGABU, 2008; MATSUDA *et al.*, 2001; CASIDA, 2011).

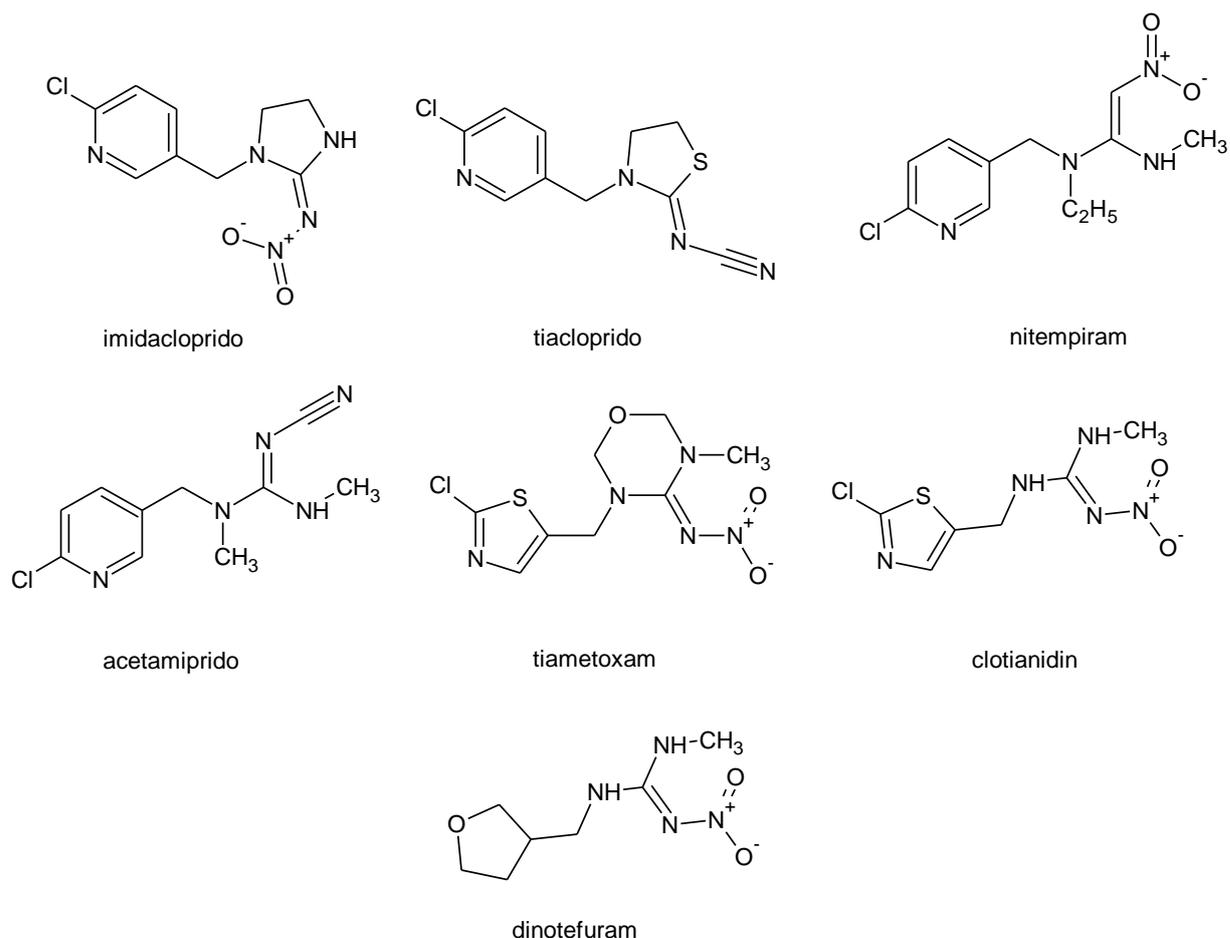


Figura 6: Estrutura molecular dos principais inseticidas derivados de neonicotinóides.

Os produtos imidacloprido, tiacloprido, nitempiram e acetamiprido possuem em comum o grupo heterocíclico 6-cloro 3-metil piridina, que diferenciam entre si pela outra porção estrutural de substituintes das moléculas, a qual podem proporcionar diferentes modos de ação nas enzimas específicas com relação à estrutura da molécula e atividade biológica. Em testes realizados em camundongos, os compostos mencionados apresentaram baixa toxicidade, com diferentes farmacóforos e enzimas envolvidas na interação molecular dos compostos com os receptores biológicos (MATSUDA *et al.*, 2001; FORD e CASIDA, 2006).

O grupo metileno é normalmente visto como a ligação entre o grupo heterocíclico e o farmacóforo. Os grupos farmacóforos podem apresentar diferentes grupos de elétrons retiradores como, por exemplo, CHNO_2 , NHCH_3 , NNO_2 ou NCN que podem influenciar diretamente na toxicidade (KAGABU, 2008; JESCHKE e NAUEN, 2008).

De acordo com os trabalhos de Tomizawa *et al.*(2003) e Hong-Fei *et al.*(2010), grupos de elétrons retiradores NO_2 são vistos como uma importante referência para a atividade inseticida. Além da configuração molecular (*E*) observada em todos os neonicotinóides

comercializados até o momento, a configuração molecular (Z) está presente em vários análogos com igual ou superior atividade inseticida. Em decorrência disso, a configuração estrutural influencia diretamente na ligação com o receptor biológico de forma diferente em ambas as estruturas conformacionais.

As propriedades físico-químicas constituem uma etapa importante para o desenvolvimento de novos produtos, conferindo uma moderada solubilidade em água ou mesmo de caráter hidrofóbico (dependendo do arranjo molecular), as moléculas apresentam relativa fotoestabilidade. Algumas moléculas podem ser substituídas, como por exemplo, nitrometileno por nitroimina ou mesmo cianoimina, evitando assim uma maior absorção de luz e conseqüentemente prolongando o efeito residual destes compostos (TOMIZAWA e CASIDA, 2005; BASU *et al.*, 2006).

Os neonicotinóides apresentam-se moderadamente tóxicos por via oral e de baixa toxicidade dérmica. Assim, estes compostos possuem propriedades físicas e toxicológicas únicas quando comparados com outros inseticidas sintéticos, exceto os piretróides. Tanto os piretróides como os neonicotinóides, apresentam elevado fator de seletividade para insetos em relação aos mamíferos, quando comparado a outras classes de inseticidas (TOMIZAWA e CASIDA, 2003; 2005).

Os efeitos toxicológicos dos neonicotinóides são semelhantes aos da nicotina, embora haja diferenças nas concentrações letais quando avaliadas em ratos de laboratório. Nestes a dose aguda varia em torno de 470-2000 mg/Kg para os neonicotinóides enquanto que, para a nicotina, a dose letal para ratos varia entre 50-60 mg/Kg (TOMIZAWA e CASIDA, 2005; MOHAMED *et al.*, 2009).

Inseticidas da classe de neonicotinóides, como o tiametoxam e o tiacloprido, apresentaram baixos valores de toxicidade, com doses de 0,6-1,2 mg / kg / dia pode-se observar efeitos toxicológicos adversos tais como a provável susceptibilidade de efeitos carcinogênicos em humanos. Em razão de sua elevada solubilidade em água, estes inseticidas podem ainda ser eliminados na urina (TOMIZAWA e CASIDA, 2005; CARVALHO *et al.*, 2011).

Os dados de exposição humana do inseticida imidacloprido relatados por Mohamed *et al.* (2009), Proença *et al.* (2005) e Wu *et al.* (2001) são limitados à exposição ocupacional ou intoxicação acidental, em que foram observados alguns efeitos clínicos tais como, taquicardia, hipertensão, náuseas e vômito. Outros problemas mais graves foram relatados como,

insuficiência respiratória, convulsões e em alguns casos morte, não sendo possível quantificar a dose necessária do imidacloprido, para provocar efeitos mais graves.

Os diferentes análogos de neonicotinóides até então sintetizados, apresentam atividade biológica para uma gama de insetos, além dos bons níveis de segurança aos vertebrados, sendo necessária uma quantidade elevada de composto ativo para provocar sérios efeitos colaterais. Com o largo espectro de uso na agricultura, inseticidas da classe neonicotinóides demonstram grande aplicação em uma variedade de culturas (aplicação foliar e no solo), além do uso no controle de ectoparasitos (JESCHKE *et al.*, 2010; CASIDA, 2011).

Atualmente, o mercado disponibiliza novas formulações de neonicotinóides associados à outras classes inseticidas, como por exemplo, os piretróides, o que permite o uso do seu efeito de sinergismo quando associado, em propagação dos efeitos biológicos (JESCHKE *et al.*, 2010).

2.4.1 Mecanismo de ação

A principal função do sistema nervoso é transmitir informações ao corpo por meio de impulsos nervosos, tornando-se um importante alvo do mecanismo de ação de grande parte dos inseticidas de contato. Todavia, quando a membrana do axônio é previamente estimulada por impulsos nervosos, os canais de potássio (K) da membrana se fecham e os canais de sódio (Na) se abrem permitindo um fluxo de Na para o interior da célula, provocando despolarização até atingir um potencial próximo ao potencial de equilíbrio de Na (GUEDES, 2007).

Quando esse potencial de ação é atingido, o processo torna-se inverso, ou seja, os canais de Na se fecham e os canais de K se abrem restabelecendo o potencial elétrico de repouso. O processo é repetido ao longo da membrana até a extremidade, ao atingir as sinapses, o impulso é transmitido por meio da liberação de neurotransmissores excitatórios acetilcolina produzido na membrana pré-sináptica, que desencadeiam novos potenciais de ação (GUEDES, 2007).

Em virtude deste mecanismo, os inseticidas neonicotinóides atuam mimetizando o neurotransmissor acetilcolina e competindo com seus receptores localizados na membrana pós-sináptica, mesmo possuindo estruturas completamente diferentes, ao contrário da acetilcolina que é susceptível à hidrólise enzimática da acetilcolinesterase, ou seja, catalisada pela enzima acetilcolinesterase que utiliza água para quebra da molécula em outras duas. O

análogo de neonicotinóides permanece ligado aos receptores pós-sinápticos da acetilcolina levando a hiperexcitação do sistema nervoso provocando paralisia e morte do inseto (GUEDES, 2007).

Embora a nicotina e neonicotinóides apresentem estruturas parcialmente similares, a principal diferença entre ambos ocorre em seu mecanismo de ação, pois a nicotina apresenta uma região protonada, que interage com receptores biológicos dos mamíferos em pH fisiológico. Nas mesmas condições, os neonicotinóides não apresentam região protonada, favorecendo o perfil toxicológico dessa classe (CASIDA e QUISTAB, 2004a; TOMIZAWA e CASIDA, 2005; BASU *et al.*, 2006).

Em termos fisico-químicos, a seletividade dos neonicotinóides está relacionada à interação dos receptores com determinadas porções moleculares dos inseticidas. Moléculas de NO₂ ou CN tendem a formar ligações de hidrogênio com a porção protonada da acetilcolina, nos receptores biológicos, garantindo um melhor desempenho do inseticida, em virtude da formação de ligações fortes. A Figura 7 ilustra a região protonada tanto no inseticida imidacloprido como na molécula acetilcolina (ISHAARA *et al.*, 2007; JESCHKE e NAUEN, 2008).

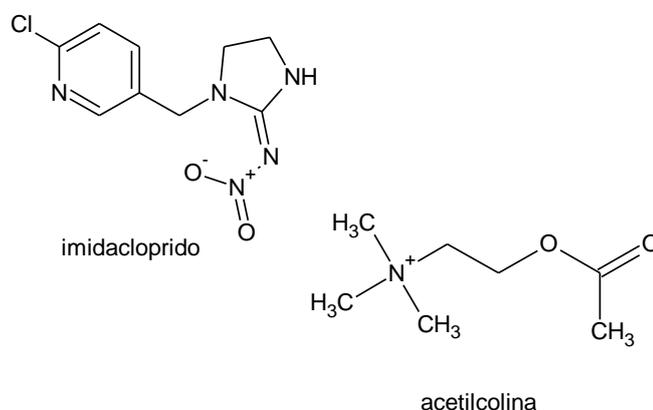


Figura 7: Região protonada no inseticida imidacloprido (íons positivos nos átomos de nitrogênio) e na molécula de acetilcolina.

Atualmente, os piretróides são a única classe química de inseticidas utilizada no controle vetorial. No entanto, o controle de insetos vetores requer um maior número de substâncias biologicamente ativas, como alternativas viáveis e associadas à outras práticas de controle. Considerando os poucos estudos realizados com estes análogos, principalmente no que diz respeito aos vetores dos parasitas causadores da malária, o presente trabalho propôs a síntese de moléculas derivadas de neonicotinóides e avaliação da atividade inseticida contra larvas e adultos de *A. darlingi*.

3. OBJETIVO GERAL

Sintetizar, caracterizar e avaliar a eficácia de compostos derivados de neonicotinóides, contra *Anopheles darlingi*.

3.1 Objetivos específicos

- Sintetizar compostos derivados de neonicotinóides;
- Caracterizar os compostos sintéticos quanto ao ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho, espectrometria de massas, espectroscopia do ultravioleta-visível, ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .
- Realizar bioensaios seletivos para detectar a atividade larvicida dos compostos sintetizados.
- Realizar bioensaios de dose para determinar a concentração letal mediana – CL_{50} .
- Avaliar a atividade adulticida por meio de provas biológicas de garrafa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e desenvolvimento das etapas do trabalho

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA e no Laboratório de Pesquisa e Produção do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – IFAM.

A procedência e grau de pureza dos reagentes utilizados foram as seguintes: ácido cloronicotínico (Sigma Aldrich[®]; 99%); 6-cloro 3-metil piridina (Sigma Aldrich[®]; 97%); permanganato de potássio (Merck[®]; 99%); álcool etílico (Nuclear[®]; 95%); ácido clorídrico (CRO[®]; 37%); benzeno (Química Fina LTDA[®]; 99,7%); tiossemicarbazida (Sigma Aldrich[®]; 99%); éter etílico (Nuclear[®]; 96%); borohidreto de sódio (Sigma Aldrich[®]; 96%); ácido nítrico (Impex[®]; 65%); ácido sulfúrico (Nuclear[®]; 98%); cloreto de cálcio anidro (Anidrol[®]; 96%); diclorometano (CRO[®]; 99%) e DMSO (Nuclear[®]; 99,5%).

A caracterização dos compostos sintetizados quanto às análises de infravermelho, ultravioleta-visível, Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C foram realizadas no Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA. Enquanto que as análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de cromatografia e espectrometria de massas situado no Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

As análises de ponto de fusão dos produtos foram realizadas no Laboratório de Pesquisa e Produção do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – IFAM.

Os espécimes utilizados nos experimentos foram identificados no Laboratório de Malária e Dengue – INPA. Os bioensaios larvicidas e adulticidas utilizados para avaliar a eficácia das substâncias sintetizadas, foram realizados no Laboratório de Malária e Dengue - INPA.

4.2 Localidades de coleta dos anofelinos

As larvas e os adultos de *A. darlingi* utilizados neste trabalho foram coletados em pontos de ocorrência na área periurbana de Manaus, situados na estrada do Puraquequara e no ramal do Brasileirinho, ambos localizados na Zona Leste da cidade (Figura 8). Os pontos de coletas selecionados estão descritos na Tabela 1, bem como as respectivas coordenadas geográficas.



Fonte: Google Earth Pro.

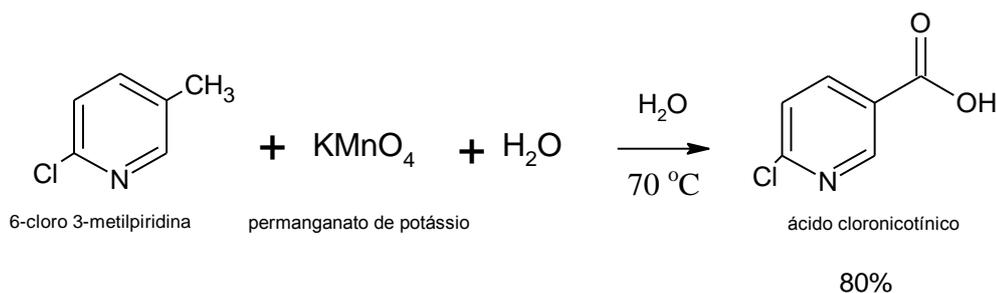
Figura 8: Imagem de satélite da zona leste da cidade de Manaus-AM, em destaque, os pontos de coleta dos alados (AL) e imaturos (IM): AL02: Cristo Vive Ramal 11; AL03: Raifram; IM01: Carlão; IM02: Ramal 9; IM08: Portela.

Tabela 1: Pontos de coleta dos alados e imaturos com as respectivas coordenadas geográficas.

Pontos de coleta	Localidade	Latitude	Longitude
Alado - AL01	Cristo Vive KM 11 - Brasileirinho	-03° 01' 48.90000"	-59° 51' 01.60000"
Alado - AL02	Raifram Ramal 7 - Brasileirinho	-03° 02' 08.70000"	-59° 52' 16.80000"
Imaturo - IM01	Carlão - Puraquequara	-03° 02' 46.33000"	-59° 52' 53.90000"
Imaturo - IM02	Ramal 9	-03° 03' 33.90000"	-59° 52' 23.20000"
Imaturo - IM03	Portela - Puraquequara	-03° 03' 04.80000"	-59° 53' 36.90000"

4.3 Síntese do ácido cloronicotínico

A rota sintética do ácido cloronicotínico como mostra o Esquema 1, seguiu o método sugerido por Vogel (1971) utilizando como reagente de partida, o 6-cloro 3-metil piridina. Em um balão volumétrico foram adicionados 5 mL de 6-cloro 3-metil piridina, juntamente com 50 mL de água destilada sob agitação magnética. O balão contendo a solução foi imerso em água quente a uma temperatura constante de 70°C. Após a homogeneização foram adicionados à solução, 10 porções iguais de 14 mmol de permanganato de potássio.



Esquema 1: Rota sintética para preparação do ácido cloronicotínico.

Cada porção foi adicionada somente quando a cor da porção anterior havia desaparecido (de violeta para marrom-escuro), totalizando um período de quatro horas. A solução foi mantida a 70°C durante as cinco primeiras adições e, a 85-90 °C durante as cinco últimas. Entretanto, ao adicionar a última porção de permanganato de potássio, a temperatura

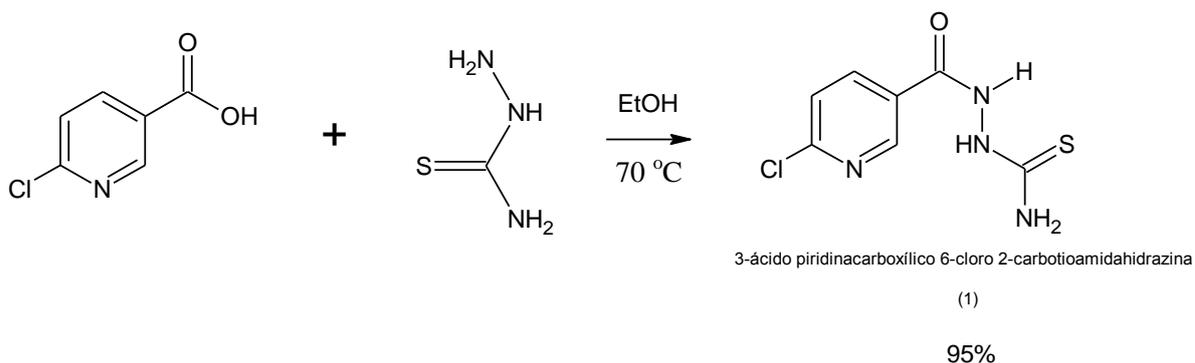
foi elevada para 95°C, permanecendo assim por um período de três horas, sendo obtida uma solução de coloração marrom escuro.

A solução resultante foi filtrada com água quente abundante, seguida de sucção à vácuo. Após a filtração foi obtida uma solução possivelmente contendo água e ácido cloronicotínico, considerando que o ácido é totalmente solúvel em água, como afirma Black *et al.* (1948). O filtrado teve o pH ajustado para 3,2 com a adição de 5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado.

Em virtude da solubilidade do ácido cloronicotínico na água, a remoção da água ocorreu através da destilação. Nesta etapa, foi adicionado 85 mL de benzeno à solução resultante. Em seguida, o balão contendo água e ácido cloronicotínico foi imerso em água quente a uma temperatura de 80 °C, por cerca de 12 horas (até quando não se recolheu mais solvente). Ao final do aquecimento foi recolhida uma solução com aspecto oleoso e volume final de 10 mL.

4.4 Síntese do composto 3-ácido piridinacarboxílico 6-cloro 2-carbotioamida hidrazina

A síntese do composto 3-ácido piridinacarboxílico 6-cloro 2-carbotioamida hidrazina (1) seguiu os métodos descritos por Beraldo (2003) e Bastos (2004), com algumas alterações. O Esquema 2 apresenta a rota sintética de preparação do composto 1, na proporção 1:1. Todavia, a rota sintética 1 utilizou o ácido cloronicotínico previamente sintetizado no laboratório, enquanto que a rota sintética 2 ocorreu com o ácido cloronicotínico adquirido comercialmente.



Esquema 2: Rota sintética para preparação do composto 1.

4.4.1 Rota sintética 1

A uma solução etanólica foram adicionados 4 mmol de tiossemicarbazida sob agitação magnética e aquecimento a 70 °C. Após a diluição, foram adicionados 5 mL do ácido

cloronicotínico sintetizado anteriormente. O processo ocorreu em um sistema de refluxo por um período de oito horas e, após esse tempo, a mistura de reação foi resfriada lentamente. O sólido obtido foi filtrado com álcool etílico e éter etílico com sucção à vácuo e seco em estufa a uma temperatura de 60-70 °C, por cerca de 24 horas. Depois de seco foi isolado um pó de aspecto cristalino e coloração amarelo claro.

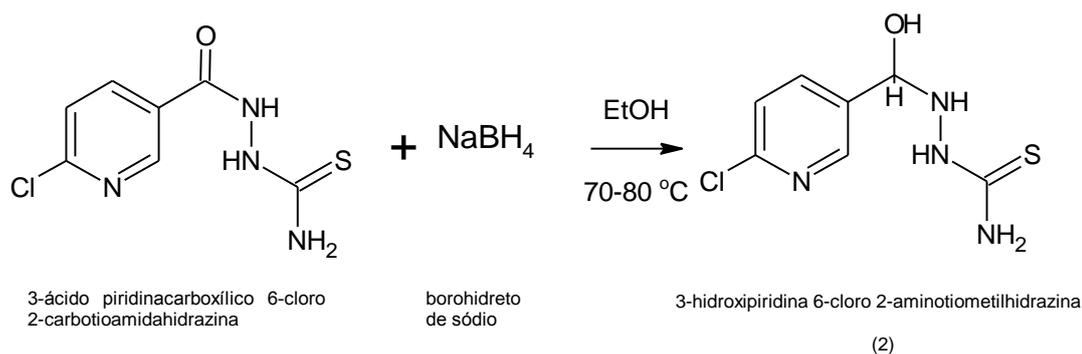
4.4.2 Rota sintética 2

Em um sistema de refluxo, adicionaram-se 3 mmol de tiossemicarbazida em meio etanólico sob agitação magnética e aquecimento à temperatura de 75°C. Após a dissolução, foram adicionados 3 mmol de ácido cloronicotínico (obtido comercialmente) e agitado por aproximadamente 12 horas. Após esse tempo, a solução foi resfriada lentamente e filtrada com álcool etílico e éter etílico com sucção à vácuo. O precipitado formado foi seco em estufa, a uma temperatura de 70-80°C, por cerca de 24 horas, resultando em um pó de aspecto amorfo e coloração amarelo claro.

4.5 Síntese do composto 3-hidroxi piridina 6-cloro 2-aminotimetil hidrazina

Na síntese do composto 3-hidroxi piridina 6-cloro 2-aminotimetil hidrazina (2) seguiu-se a metodologia descrita por Esteves-Souza *et al.* (2004), que utilizou borohidreto de sódio (NaBH₄) como reagente de redução. Um balão volumétrico contendo uma solução etanólica de 0,4 mmol do composto 1, foi imerso em banho de gelo sob constante agitação magnética. A seguir foram adicionados lentamente, 2 mmol de NaBH₄ mantidos no sistema de agitação por cerca de 30 minutos (Esquema 3).

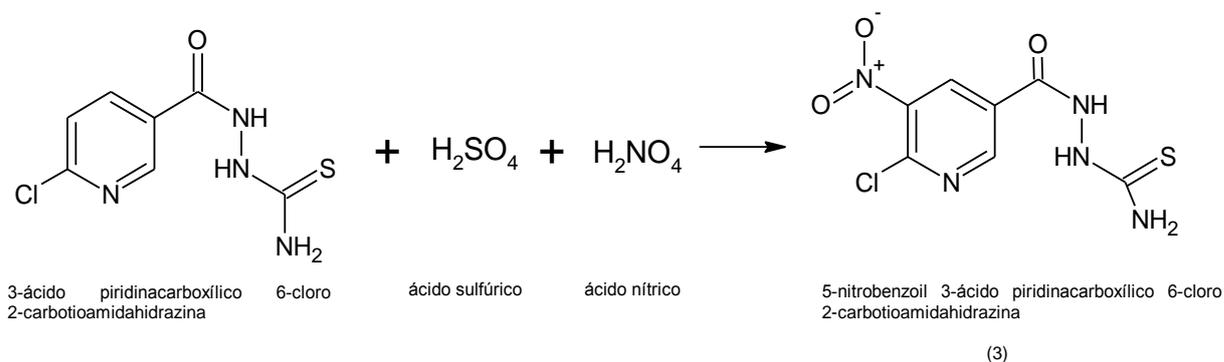
Após esse tempo, a solução foi mantida em um sistema de refluxo e aquecida à temperatura de 75-80°C por aproximadamente 8 horas. Ao final desta etapa, o solvente foi evaporado e lentamente resfriado, ao atingir a temperatura ambiente foram adicionados 2 mL de água destilada. A solução foi mantida em repouso por 12 horas, em seguida foi filtrada com álcool etílico e éter etílico com sucção à vácuo, depois seco em estufa por um período de 24 horas a uma temperatura de 70-80°C, sendo isolado um pó de aspecto amorfo e coloração esbranquiçada.



Esquema 3: Rota sintética da reação de redução do composto 1 para o composto 2.

4.6 Síntese do composto 5-nitrobenzoil 3-ácido piridinacarboxílico 6-cloro 2-carbotioamida hidrazina

Foram realizadas duas tentativas de obtenção do composto 5-nitrobenzoil 3-ácido piridinacarboxílico 6-cloro 2-carbotioamida hidrazina (3), as duas rotas sintéticas seguiram o procedimento de reação de nitração com ácido nítrico (HNO_3) catalisada com ácido sulfúrico (H_2SO_4), de acordo com o método descrito por Vogel (1971) (Esquema 4).



Esquema 4: Síntese do composto 3.

4.6.1 Primeira rota proposta

Em um balão volumétrico foram adicionados 17,5 mL de ácido nítrico concentrado juntamente com 17,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, durante o processo de adição, a mistura foi mantida em banho de gelo sob agitação magnética até a total dissolução. Ao atingir baixas temperaturas (10°C), 0,3 mmol do composto 1 foram adicionados em pequenas porções, o processo de agitação seguiu por cerca de quatro horas.

Ao final desta etapa, o balão contendo a solução foi mantido em um sistema de refluxo imerso em água quente à temperatura de 60°C , por cerca de 45 minutos. A solução resultante

foi resfriada lentamente para adição de água à temperatura ambiente. Em seguida foi retirado o sobrenadante, correspondente a mistura de ácidos.

Com a retirada do sobrenadante adicionou-se 4,5 mmol de cloreto de cálcio anidro, com o objetivo de retirar a água emulsionada na solução. O balão contendo uma solução turva foi imerso em água quente a 60 °C por 30 minutos, para torná-la límpida. Após o aquecimento, a solução resultante foi filtrada com álcool etílico e éter etílico com sucção à vácuo. O precipitado filtrado foi seco em estufa a uma temperatura de 70-80°C, por um período de 24 horas, sendo isolado um pó de aspecto amorfo e coloração branca.

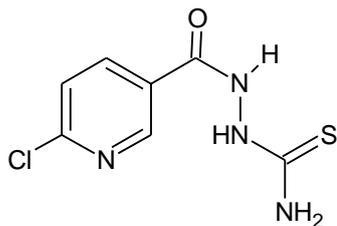
4.6.2 Segunda rota proposta

Em um balão volumétrico foram adicionados 17,5 mL de ácido nítrico concentrado juntamente com 17,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, durante o processo de adição, a mistura foi mantida em banho de gelo sob agitação magnética até a total dissolução. Ao atingir baixas temperaturas (10°C), 0,3 mmol do composto 1 foram adicionados em pequenas porções, o processo de agitação seguiu por cerca de quatro horas.

Após esse tempo, a solução foi mantida em repouso por cerca de 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, verteu-se a solução contida no frasco em um Becker contendo 500 mL de gelo picado.

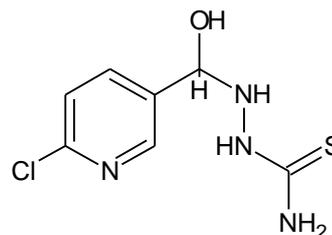
Após 12 horas de repouso, a solução foi filtrada com cerca de 30 mL de diclorometano e água gelada com sucção à vácuo. O precipitado formado foi seco em estufa a uma temperatura de 70-80°C, por um período de 24 horas, sendo isolado um pó de aspecto amorfo e coloração laranja.

A Figura 9 mostra as estruturas (nomenclatura atribuída de acordo com o SciFinder[®]) dos três possíveis produtos obtidos após a síntese e o produto comercial imidacloprido.



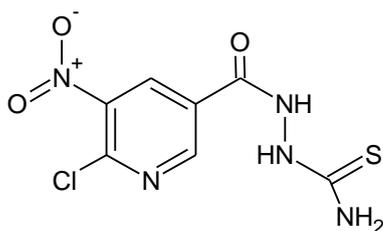
3-ácido piridinacarboxílico 6-cloro 2-carbotioamidahidrazina

(1)



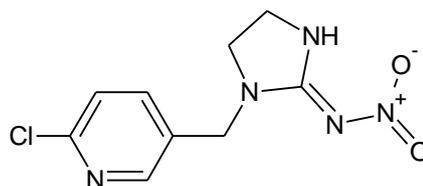
3-hidroxi-piridina 6-cloro 2-aminotioamidahidrazina

(2)



5-nitrobenzoil 3-ácido piridinacarboxílico
6-cloro 2-carbotioamidahidrazina

(3)



1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamina

imidacloprido

Figura 9: Estruturas e respectivas nomenclaturas dos três produtos sintetizados e o produto comercial.

4.7 Caracterização dos compostos sintetizados

4.7.1 Determinação do ponto de fusão

O ponto de fusão de uma substância corresponde ao intervalo de temperatura entre a fase sólida e a fase líquida. A partir da decomposição, o ponto de fusão pode não corresponder a uma temperatura exata, mas a uma temperatura de transição da fase sólida para líquida.

A determinação dos valores de ponto de fusão para os compostos sintetizados foram obtidos em um equipamento da marca GEHAKA modelo PF 1500 FARMA. As amostras sólidas previamente secas foram inseridas e compactadas em capilares de vidro com uma coluna de amostra entre 2,5-3,5 cm de comprimento. Os capilares foram inseridos no aparelho a uma taxa de subida de 1 °C/min com uma faixa de temperatura variando de 80 – 360 °C.

4.7.2 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia de absorção no infravermelho tem por finalidade analisar a quantidade de energia absorvida através das vibrações moleculares em função da frequência. As vibrações moleculares provocam absorção de energia, que permitem dizer que houve uma alteração do momento de dipolo da molécula. A partir das bandas de absorção é possível identificar os principais grupos funcionais presentes na molécula (SILVERSTEIN, 2000).

As amostras foram analisadas em pastilhas de KBr preparadas com 1 mg de amostra e 100mg do sal, previamente secos em mufla. Para a leitura das amostras foi utilizado o equipamento da marca ABBE modelo FTLA 2000 com leituras na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.7.3 Ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear corresponde à espectroscopia de absorção que, sob condições apropriadas, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequências, de acordo com as características estruturais da amostra. A absorção ocorre no núcleo da molécula que apresenta número de spin igual a $\frac{1}{2}$, sendo os mais utilizados o hidrogênio (^1H) e o carbono (^{13}C). Com isso é possível gerar um gráfico de frequência dos picos de absorção em função da intensidade, o que possibilita identificar a possível estrutura da molécula (SILVERSTEIN, 2000).

Para as análises de RMN ^1H e RMN ^{13}C foram pesadas 25 mg de cada amostra e dissolvidas em 600 μL de solvente dimetilssulfóxido deuterado (DMSO- d_6). Para a leitura das amostras foi utilizado um espectrômetro de ressonância magnética nuclear modelo Unity Inova 500 fabricante Varian. Os espectros foram obtidos na frequência de 500 MHz e 126 MHz em um espectrômetro de RMN de 11,7 T, respectivamente.

4.7.4 Espectrometria de massas

Através do espectrômetro de massas, moléculas na fase vapor são bombardeadas por um feixe de elétrons de alta energia. O impacto dos elétrons é registrado como um espectro de íons separados na base da razão massa/carga (m/z). Um espectro de massas é um gráfico que contém as massas dos fragmentos positivos nas suas concentrações relativas, tendo em vista que o pico mais intenso do espectro é chamado de pico base (SILVERSTEIN, 2000).

Os espectros foram adquiridos através de um espectrômetro de massas do tipo íon trap LCQ FleetTM (Thermo Scientific) equipado com uma fonte de eletrospray, operando nos modos positivo e negativo, programado para monitorar a faixa de m/z 100-1000. As amostras foram diluídas a 5 ppm em metanol grau HPLC e aplicadas por infusão direta através da bomba seringa do próprio equipamento. Foram utilizados os seguintes parâmetros de operação: spray voltage: 5 kV; sheath gás: 10 arb; aux gás: 5 arb; sweep gás: 0 arb; capillary temp: 200 °C; capillary voltage: 25 V ; tube lens: 110 V; syringe pump: 10 µL min.

4.7.5 Espectroscopia do ultravioleta-visível

A absorção molecular na região do ultravioleta (UV) e do visível está relacionada ao comprimento de onda (λ) da radiação e a estrutura do composto. Os comprimentos de onda são expressos em nanômetros (nm) que equivalem a 10 cm^{-6} . A região de interesse do UV está entre 200 e 400nm, enquanto que a do visível está entre 400 e 800nm. Ao absorver uma quantidade de energia, os elétrons passam de um estado de baixa energia (estado fundamental) para um estado de alta energia (estado excitado), originando a dissociação ou ionização da molécula. Os espectros são registrados em solventes que não absorvem energia (SOLOMONS e FRYHLE, 2005).

Foram pesados cerca de 1 mg da amostra e dissolvido em 10mL de solvente apropriado (água ou metanol) e, em seguida, submetido a análise por espectrometria UV-visível, no equipamento da marca SHIMADZU UV-1650PC.

4.8 Manutenção de anofelinos no laboratório

As larvas foram coletadas nas margens dos criadouros, com auxílio de conchas entomológicas, sendo armazenadas em baldes plásticos e transportadas ao insetário do laboratório de Malária e Dengue (INPA). Os imaturos foram mantidos no insetário a uma temperatura de $26 \pm 2^\circ \text{ C}$ e umidade relativa entre 70 – 80%, em bacias de poliestireno e alimentadas com ração de peixe (Tetramim[®] e Goldfish[®]) na proporção 1:1 (Figura 10).



(A)



(B)

Figura 10: Coleta de larvas no campo (A) e bacias de poliestireno contendo as larvas (B).

Os estádios larvais foram acompanhados até o estágio de pupa, onde completa seu ciclo aquático até a emergência do mosquito adulto. Os mosquitos adultos foram alimentados com solução açucarada a 10%, e identificados de acordo com as chaves taxonômicas de Gorham *et al.*(1967) e Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). As espécies de *A. darlingi* foram separadas de acordo com o sexo, sendo apenas as fêmeas com idade de 3-4 dias utilizadas nos testes de prova de garrafa (Figura 11).



Figura 11: Gaiola com mosquitos.

Os mosquitos adultos foram coletados pelo método de atração humana com proteção (FORATTINI, 2002). Os espécimes alados foram coletados ao entardecer, com auxílio de aspiradores entomológicos. Os mosquitos foram transferidos para copos parafinados com capacidade de 500 mL, cobertos com filó e algodão e mantidos em caixas de isopor cobertos

com uma camada de papel umedecido, para manutenção da umidade e posteriormente transportados ao Laboratório de Malária e Dengue (INPA).

Os mosquitos foram identificados de acordo com as chaves taxonômicas de Gorham *et al.*(1967) e Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). Após a identificação, os alados foram alimentados com sangue de pato doméstico (*Cairina moschata*) para maturação dos ovos, e colocados individualmente em copos revestidos com papel filtro umedecidos e cobertos com tecido filó, para oviposição (Figura 12).

Diariamente, os copos foram verificados de acordo com a oviposição. Os ovos depositados foram colocados em copos descartáveis contendo água e alimento para eclosão das larvas, até atingirem o 3º estágio, a qual foram utilizadas nos bioensaios.



Figura 12: Copos plásticos contendo as desovas.

4.9 Avaliação da atividade larvicida

Os bioensaios larvicidas seguiram o protocolo de Dulmage *et al.*(1990). Foram realizados bioensaios seletivos, com o objetivo de detectar toxicidade acima de 50% para os compostos contra larvas de *A. darlingi*.

As concentrações que apresentaram mortalidade igual ou superior a 50% foram utilizadas nos bioensaios de dose para cálculo da concentração letal mediana (CL₅₀).

4.9.1 Bioensaios seletivos

Na realização dos bioensaios seletivos, para cada composto sintetizado foram preparadas as seguintes concentrações: 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 e 500 ppm. As respectivas

massas foram pesadas em balança analítica (modelo BP210D e marca Sartorius®) e diluídas a 400 µL em solvente DMSO.

Paralelamente, foram realizados bioensaios com o produto comercial imidacloprido (1[6-cloro 3-metilpiridina] -N-nitro-2-imidazolidina) nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 3 e 4 ppm.

Inicialmente, foi preparada uma solução estoque na concentração de 10ppm, 0,5 µL de ingrediente ativo dissolvido em 10 mL de água destilada, considerando que o formulado apresentou-se como uma suspensão concentrada solúvel em água. Para as sucessivas concentrações, foram retiradas alíquotas da solução mãe e posteriormente diluídas.

Nos bioensaios seletivos foram utilizadas as larvas no início do 3º estágio, com três réplicas de cada concentração e três réplicas constituindo o controle (DMSO e água destilada).

Em cada copo descartável com capacidade de 50 mL foram colocados 10 mL de água destilada, 10 larvas de 3º estágio, alimento em pó e 100 µL da concentração testada (Figura 13). As leituras de mortalidade foram realizadas nos intervalos de 24h e 48h.



Figura 13: Realização dos bioensaios seletivos.

4.9.2 Bioensaios de dose

Na montagem dos bioensaios de dose, a partir das concentrações utilizadas nos bioensaios seletivos, foram separadas as concentrações que apresentaram mortalidade igual ou maior que 50%.

Os testes foram realizados nas concentrações de 250; 500; 750 e 1000 ppm para os compostos sintetizados, e 0,5; 0,2 e 0,1 ppm para o imidacloprido.

Nos bioensaios de dose foram utilizadas larvas de 3º estágio, cada concentração tinha cinco réplicas e mais cinco réplica para o controle (Figura 14). Os experimentos foram repetidos em três dias alternados.

Para cada copo descartável com capacidade de 150 mL, foram adicionados 50 mL de água destilada, 20 larvas de 3º estágio, alimento em pó e a respectiva dose da solução avaliada (100 µL da concentração dos compostos sintetizados e 500 µL para o produto comercial). As leituras de mortalidade foram realizadas nos intervalos de 24 e 48 horas.



Figura 14: Bioensaios de dose.

4.10 Avaliação da atividade aduítica

A avaliação da atividade aduítica seguiu o protocolo de Brogdon e McAllister (1998). Os testes de prova biológica de garrafa permitiram verificar a toxicidade dos compostos contra mosquitos adultos, utilizando o modelo proposto pelo Center of Disease Control (CDC).

4.10.1 Prova biológica de garrafa modelo - CDC

Para as provas biológicas foram utilizadas garrafas de vidro com tampas de rosca e capacidade de 250 mL (marca Schott Duran®). As garrafas foram lavadas com sabão neutro e água corrente, em seguida foram mergulhadas em bacias com água limpa, por cerca de uma hora. Após esse tempo as garrafas, foram novamente lavadas com acetona e álcool etílico. Em seguida, foram autoclavadas e secas em estufa a uma temperatura de 50°C por um período de 30 minutos.

Após essa etapa, as garrafas foram devidamente identificadas e etiquetadas conforme as respectivas tampas para cada concentração impregnada. Adicionou-se em cada garrafa, 1mL da solução contendo o produto a ser testado, previamente dissolvido em acetona. Foram avaliadas as dosagens de 25; 50; 75 e 100 µg para os produtos sintetizados, considerando a acetona apenas um solvente veiculador nos testes. Para o imidacloprido, foram avaliadas as seguintes dosagens: 0,025; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,5µg.

Ao adicionar a solução nas garrafas, as mesmas foram tampadas e homogeneizadas com movimentos na horizontal (superfície plana) e vertical, para completar o processo de impregnação. O processo de homogeneização continuou com as garrafas destampadas, até que não se verificasse qualquer quantidade de solvente nas garrafas. Posicionadas na horizontal, as garrafas foram mantidas destampadas e cobertas com papel toalha para proteção e secagem, por um período de 12 horas, até a realização dos testes.

Em virtude dos testes terem ocorrido no período da manhã, os mosquitos foram alimentados na noite anterior com solução açucarada a 10%, separados em grupos de 15 mosquitos em cada copo parafinado.

Os testes foram constituídos em três réplicas de garrafas para cada dosagem, incluindo o controle, contendo apenas o solvente. Em cada garrafa colocou-se 15 mosquitos fêmeas distribuídos em um tempo mínimo de 1 minuto para cada garrafa. Assim, as garrafas foram mantidas na horizontal sobre a bancada e avaliadas a cada 15 minutos decorrido o início do experimento, totalizando o tempo final de 90 minutos.

Ao final do experimento, os mosquitos vivos foram transferidos para os respectivos copos parafinados cobertos com tecido filó, embebidos com solução açucarada e mantidos em caixa de isopor com uma camada de papel umedecido. A mortalidade foi verificada após 24 horas do início do teste (Figura 15).



(A)



(B)



(C)

Figura 15: Impregnação das garrafas (A), distribuição dos mosquitos nas garrafas (B) e leitura de mortalidade (C).

4.11 Análise de dados

O cálculo das concentrações letais medianas (CL_{50}), foi realizado por meio da análise de *probit* (FINNEY, 1971) com auxílio do programa POLO PC[®] (LeOra Software, 1987), a partir dos dados obtidos com os bioensaios.

A eficiência dos compostos foi avaliada estatisticamente por meio de retas de regressão linear para todos os intervalos de leitura, utilizando os valores de mortalidade esperada e obtida das concentrações e *probit* gerados pela equação abaixo:

$$Y = (\alpha + 5) + \beta \cdot \log x$$

Onde: y : *probit*

α : coeficiente linear (parameter dose ppm)

β : coeficiente angular (sloper)

x : concentração

Os dados de mortalidade no grupo controle foram corrigidos quando o número de larvas mortas foi maior que 5% e menor que 20%, pela fórmula de Abbott (1925).

$$\text{Fórmula} = \frac{\% \text{ de mortalidade no tratamento} - \% \text{ de mortalidade do controle}}{100\% - \% \text{ de mortalidade do controle}}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

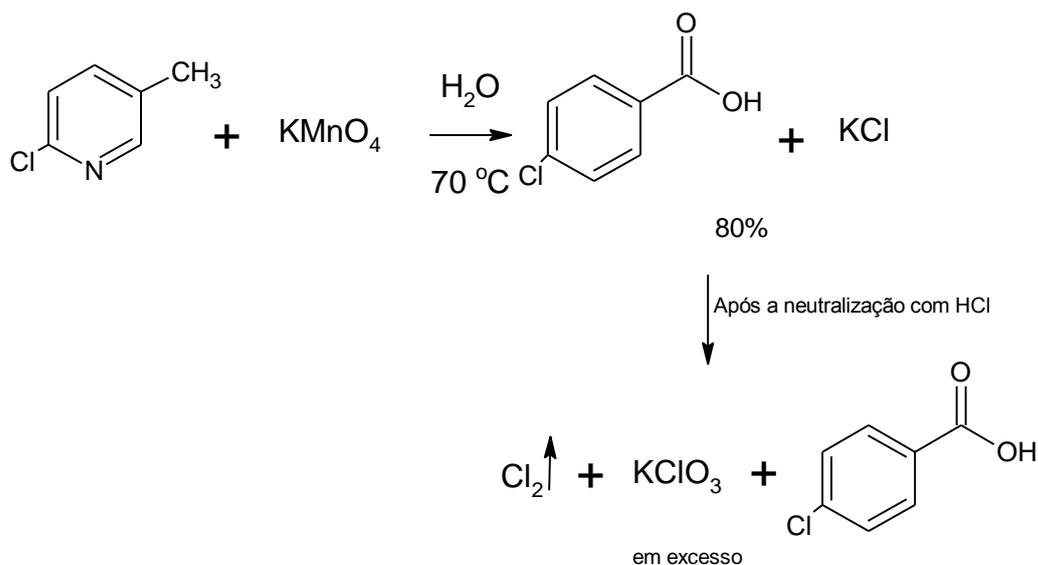
5.1 Síntese do ácido cloronicotínico

A reação de oxidação da α -picolina (6-cloro 3-metil piridina) com permanganato de potássio (KMnO_4) para a formação do ácido cloronicotínico, objetivou verificar a sequência de síntese para a formação deste ácido (Esquema 5).

Ao concluir o processo de reação foi possível recolher uma solução de aspecto oleoso e coloração amarelada, totalizando cerca de 10 mL do volume total. A partir dessa solução, uma alíquota de 5 mL foi retirada para dar continuidade à síntese do composto 1, enquanto que a outra porção seria caracterizada. No entanto, esta porção resultante da síntese do ácido foi deixada em repouso, por cerca de 24 horas, sendo constatado que a solução havia evaporado.

Provavelmente esta evaporação ocorreu em função de que esta solução já continha excesso de KMnO_4 acumulado durante o processo de neutralização com HCl . Ao aquecer a solução no processo de destilação, ocorreu a formação de clorato de potássio (KClO_3) como impureza em meio ácido. No final do processo de aquecimento, possivelmente ocorreu a formação de cloro livre que depois de 24 horas evaporou, restando apenas alguns cristais na parede do frasco no qual estava armazenada a solução.

Black *et al.* (1948) obteve o ácido nicotínico por meio da oxidação com KMnO_4 , entretanto, após o processo de aquecimento e evaporação do benzeno, houve a formação de um sólido que posteriormente foi seco e caracterizado como ácido nicotínico. Sendo assim, seguiu-se a mesma metodologia, com algumas modificações, visando obter o ácido cloronicotínico. Todavia, durante o processo ocorreu a formação de cloreto de potássio (KCl) como impureza na solução, e ao ser realizado o processo de neutralização do composto, houve a formação de KClO_3 em excesso, não sendo possível obter o ácido cloronicotínico.



Esquema 5: Processo de obtenção de KClO_3 em excesso e ácido cloronicotínico.

5.2 Síntese do composto 1

5.2.1 Rota sintética 1

Como mencionado anteriormente, após o processo de síntese do composto ácido cloronicotínico, uma alíquota foi retirada para a preparação do composto 1. O precipitado formado apresentou rendimento de 84,5% e ponto de fusão $180,6 - 184,2^\circ\text{C}$. De acordo com Wileasn e Suprunch (1968), o ponto de fusão característico das tiossemicarbazidas apresentam-se próximo de 183°C . Entretanto, a faixa de temperatura de fusão obtida para o produto sintetizado indica que provavelmente não há a presença do anel aromático na molécula, mostrando que não foi possível a formação do ácido cloronicotínico.

As principais bandas do espectro de infravermelho para a determinação das funções orgânicas presentes na estrutura do produto, são mostradas na Tabela 2. Ibrahim *et al.* (1997) descreveram que, a faixa de 3460 cm^{-1} (simétricos) e 3275 cm^{-1} (assimétricos), podem ser atribuídas ao estiramento ν (NH_2) quando o estiramento ν (NH) apresentar-se na faixa de $3100-3250\text{ cm}^{-1}$ logo, no espectro apresentado na Figura 16, a absorção na região de $3366,8\text{ cm}^{-1}$ está atribuída ao estiramento ν (NH_2) enquanto que a banda observada no espectro em $3178,5\text{ cm}^{-1}$, corresponde ao estiramento ν (NH).

A ausência de bandas fortes na faixa intermediária abaixo de 1300 cm^{-1} , indica a região de deformação angular fora do plano das bandas de estiramento. A vibração ν ($\text{C}=\text{S}$), observada na região de 800 cm^{-1} no espectro, é menos intensa e localiza-se em frequências

mais baixas, diferentemente das absorções associadas às carbonilas ($1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) que são mais polares e consideravelmente mais fortes. Sendo que os estiramentos ν (C=S) são mais susceptíveis a efeitos de acoplamento (SILVERSTEIN, 2000).

Tabela 2: Principais bandas de absorção do espectro de infravermelho para o composto 1 (rota sintética 1).

Estiramentos ν	Intensidade dos picos*	Experimental (cm^{-1})	Literatura** (cm^{-1})
NH ₂	m	3366,8	3370
NH	m	3178,5	3170
C=S	f	800.0	830 - 780

*F=forte; m=média e f=fraca. **WILEASN e SUPRUNCH, 1968; IBRAHIM *et al.*, 1997; SILVERSTEIN, 2000.

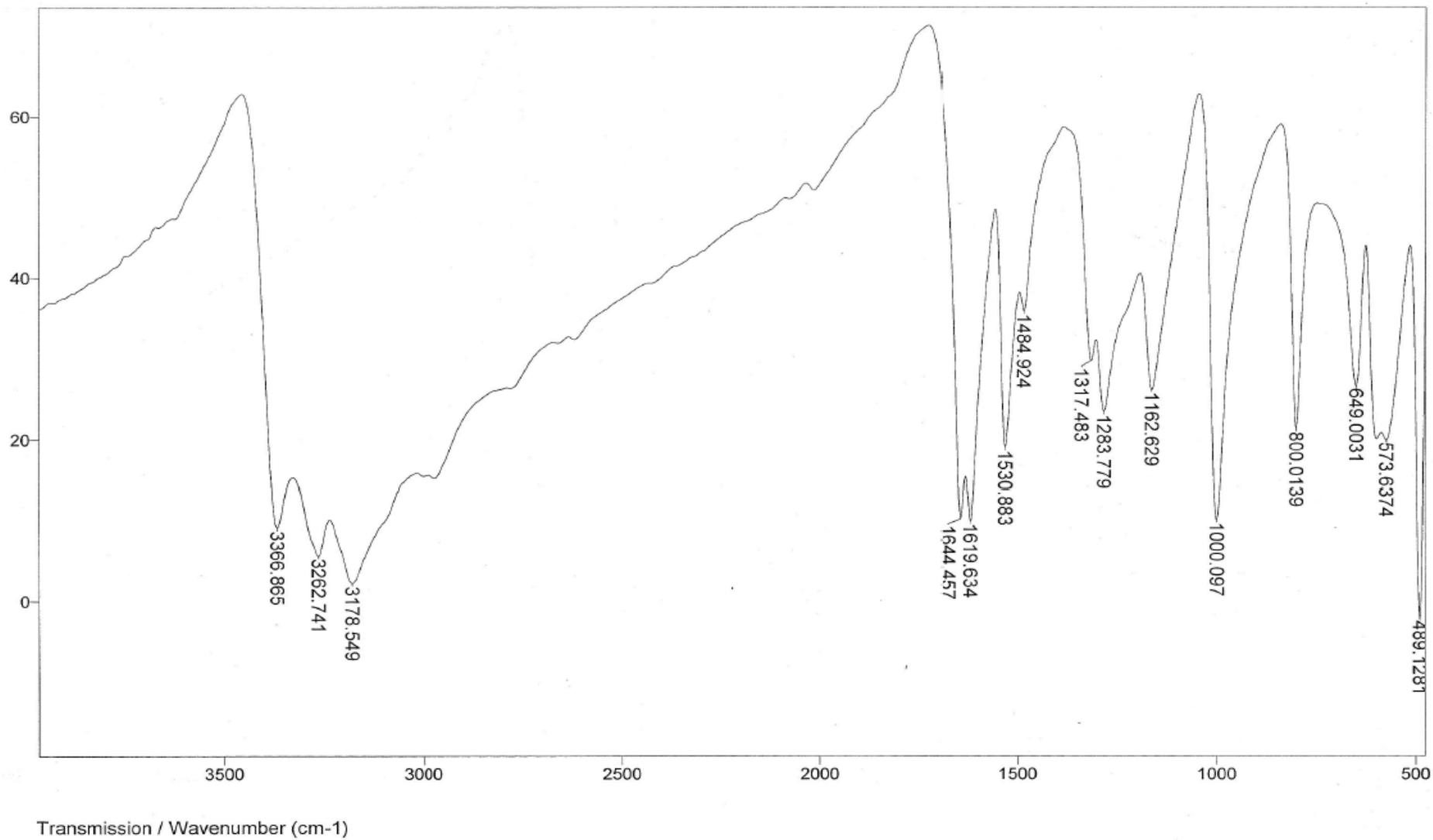


Figura 16: Espectro de infravermelho para o composto 1 a partir da rota sintética 1.

De acordo com os dados obtidos no espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO), como mostra a Figura 17, pode-se verificar a ausência de picos característicos de anéis aromáticos (região entre δ 6 e 7 ppm), indicando a não formação do composto desejado.

Os sinais localizados na região à direita do espectro indicam os átomos com os núcleos menos blindados (menos protegidos) da molécula, enquanto que os sinais distribuídos do lado esquerdo referem-se aos átomos mais blindados (mais protegidos) (SILVERSTEIN, 2000).

Conforme descritos na Tabela 3, os picos que aparecem em δ 3,31 ppm e δ 4,46 ppm são representados por singletos agudos (característicos de aminas), que indicam a presença de hidrogênios no grupo NH_2 situados na posição 4. O mesmo grupo foi relatado por Leite *et al.* (2004) na região de δ 3,63 ppm representado por um singlete agudo.

Os singletos largos e de baixa intensidade caracterizados nas regiões de δ 7,17 e 7,52 ppm, apresentam um desacoplamento de hidrogênios, representando os dois hidrogênios do grupo NH_2 mais próximos do grupo (C=S), Arantes (2009) descreveu o mesmo grupo para as regiões de δ 7,56 e 7,41. O singlete que aparece na região de δ 8,59 ppm, representa o grupo NH, também descrito por Arantes (2009) na região de 6,86, em virtude da presença de um grupo metil, diferentemente do composto apresentado, mostrando um grupamento amino.

Tabela 3: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ^1H para o composto 1 (rota sintética 1) em solvente DMSO d_6 , 500MHz.

Posição do hidrogênio na molécula	Multiplicidade	Deslocamento químico δ (ppm)	Número de Hidrogênios
H-4	Singlete	3,31	1
H-4	Singlete	4,46	1
H-1	Singlete largo	7,17	1
H-1	Singlete largo	7,52	1
H-3	Singlete	8,59	1

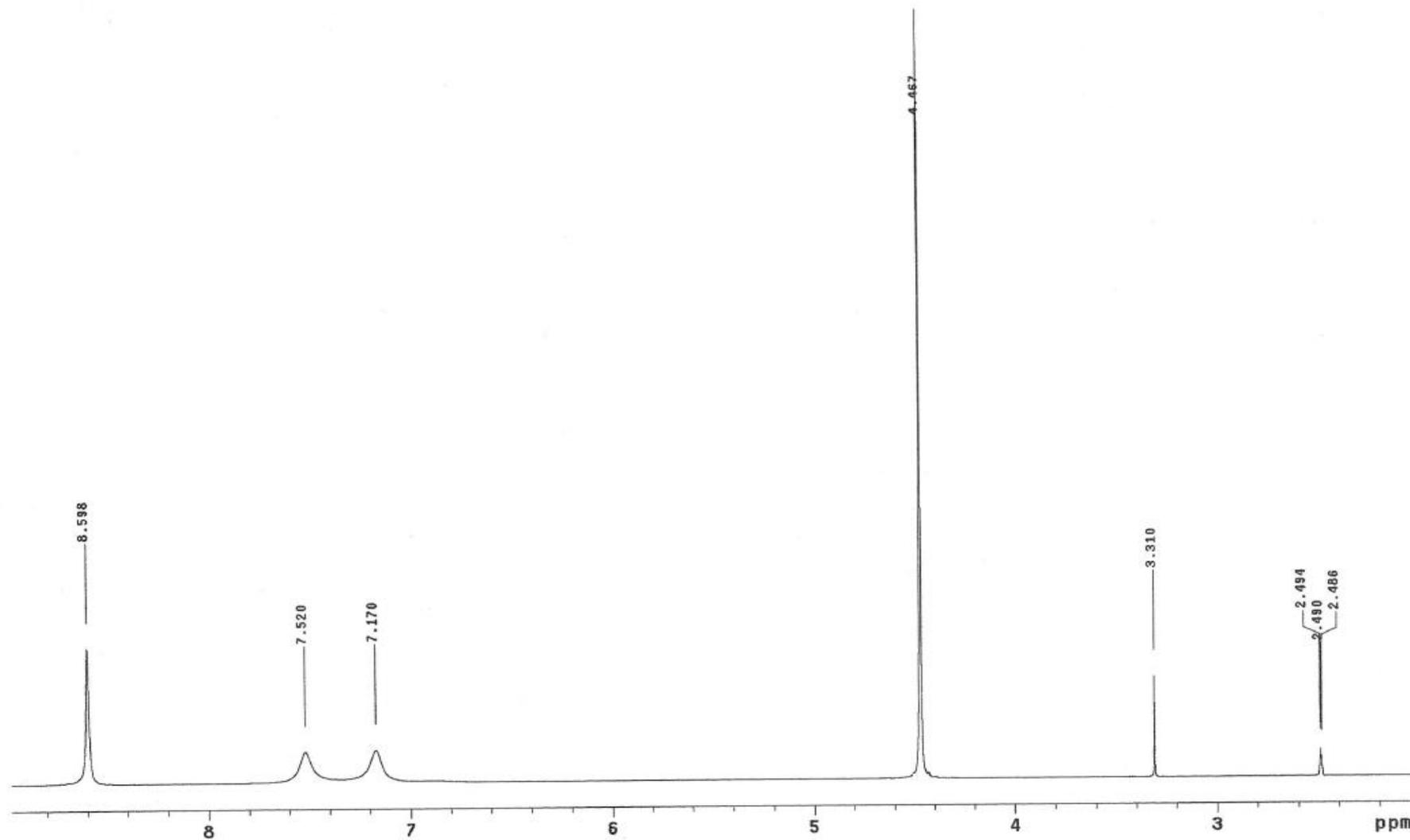


Figura 17: Espectro de RMN-¹H para o composto 1 a partir da rota sintética 1.

A Figura 19 mostra o espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, DMSO) que, de acordo com os dados analisados a partir do RMN de ^1H , confirmam que não ocorre a presença do ácido cloronicotínico na estrutura da molécula.

Além do sinal típico do solvente na região próximo de δ 40 ppm, o espectro apresenta um único sinal na região de δ 180,6 ppm, atribuído ao grupo C=S da molécula tiossemicarbazida. Todavia, Arantes (2009) afirma que sinais localizados próximos de δ 180,9 ppm podem apresentar configuração *cis* para as tiossemicarbazidas, enquanto que sinais próximos de δ 184,0 ppm podem caracterizar configurações *trans* para as tiossemicarbazidas, que muitas vezes pode ser explicado com a variação de temperatura do meio reacional.

Maciel *et al.* (1998) descreveram o deslocamento do sinal de C=S para a região de δ 179,0 (o pico mais deslocado do espectro). Em virtude da molécula tornar-se mais protegida nesta porção estrutural, provocando um deslocamento do sinal para o campo mais alto do espectro, quando comparado à outros grupos como por exemplo, C=O que apresentaram diferenças na energia de transição, quando observadas.

As análises dos espectros da molécula indicam que a síntese do composto 1 por meio da síntese do ácido cloronicotínico, não ocorreu nas condições do experimento, evidenciando a presença apenas da tiossemicarbazida utilizada como reagente de preparação do composto (Figura 18).

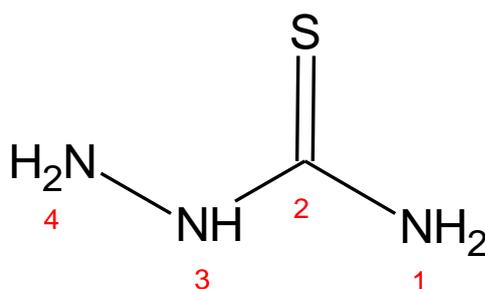


Figura 18: Estrutura proposta para a tiossemicarbazida identificada a partir da rota sintética 1.

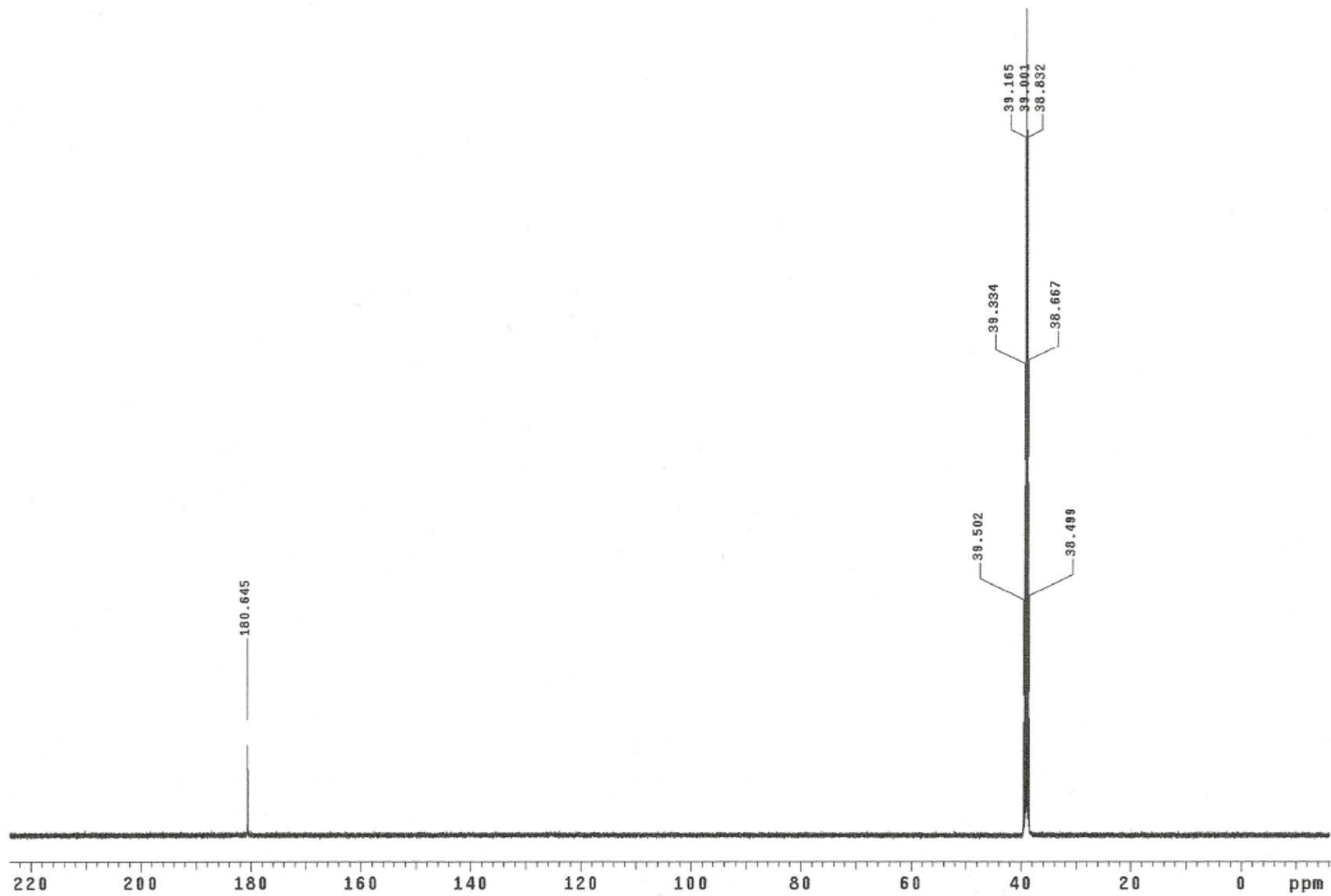


Figura 19: Espectro de RMN- ^{13}C para o composto 1 a partir da rota sintética 1.

5.2.2 Rota sintética 2

O processo de obtenção do composto 1 através da rota sintética 2, por meio do ácido cloronicotínico comercial, ocorreu de forma simples proporcionando rendimentos de 90%. O sólido obtido apresentou aspecto cristalino, coloração esbranquiçada e ponto de fusão na faixa de 210,3 – 211,6 °C.

Quando comparado ao produto obtido por meio da rota sintética 1, verificou-se um aumento da faixa de temperatura de fusão. Isto indica que as interações intermoleculares do composto obtido na rota sintética 2 são mais intensas, requerendo maior energia para romper essas interações, como descrito por Bastos (2004).

A Tabela 4 mostra as principais absorções no espectro de infravermelho apresentado na Figura 20. O deslocamento da região de 791,5-968,6 cm^{-1} pode ser atribuído à deformação no plano do anel piridínico. Casas *et al.* (2000) atribuíram a mesma deformação no plano do anel piridínico à faixa de 606-576 cm^{-1} .

A banda 1605,7 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento de ν (C=O), tendo em vista que Pandeya *et al.* (2000) atribuíram a região de 1640-1630 cm^{-1} ao mesmo estiramento. A absorção na região de 3355,1 cm^{-1} está atribuída ao estiramento ν (NH₂), observa-se que Ibrahim *et al.* (1997) atribuíram à faixa de 3460 cm^{-1} (simétricos) e 3275 cm^{-1} (assimétricos), em virtude do estiramento ν (NH) apresentar-se na faixa de 3100-3250 cm^{-1} , que no espectro aparece na região de 3178,5 cm^{-1} .

Tabela 4: Principais bandas de absorção do espectro de infravermelho para o composto 1 a partir da rota sintética 2.

Estiramento ν	Intensidade dos picos*	Experimental (cm^{-1})	Literatura** (cm^{-1})
C=O	F	1605,7	1640 – 1630
NH	f	3178,1	3170
Anel piridínico	f/m	791,5 - 968,6	606 - 576
NH ₂	f	3355,1	3460 (simétrico) 3275 (assimétrico)

*F=forte; m=média e f=fraca. ** IBRAHIM *et al.*, 1997 CASAS *et al.*, 2000; PANDEYA *et al.*, 2000.

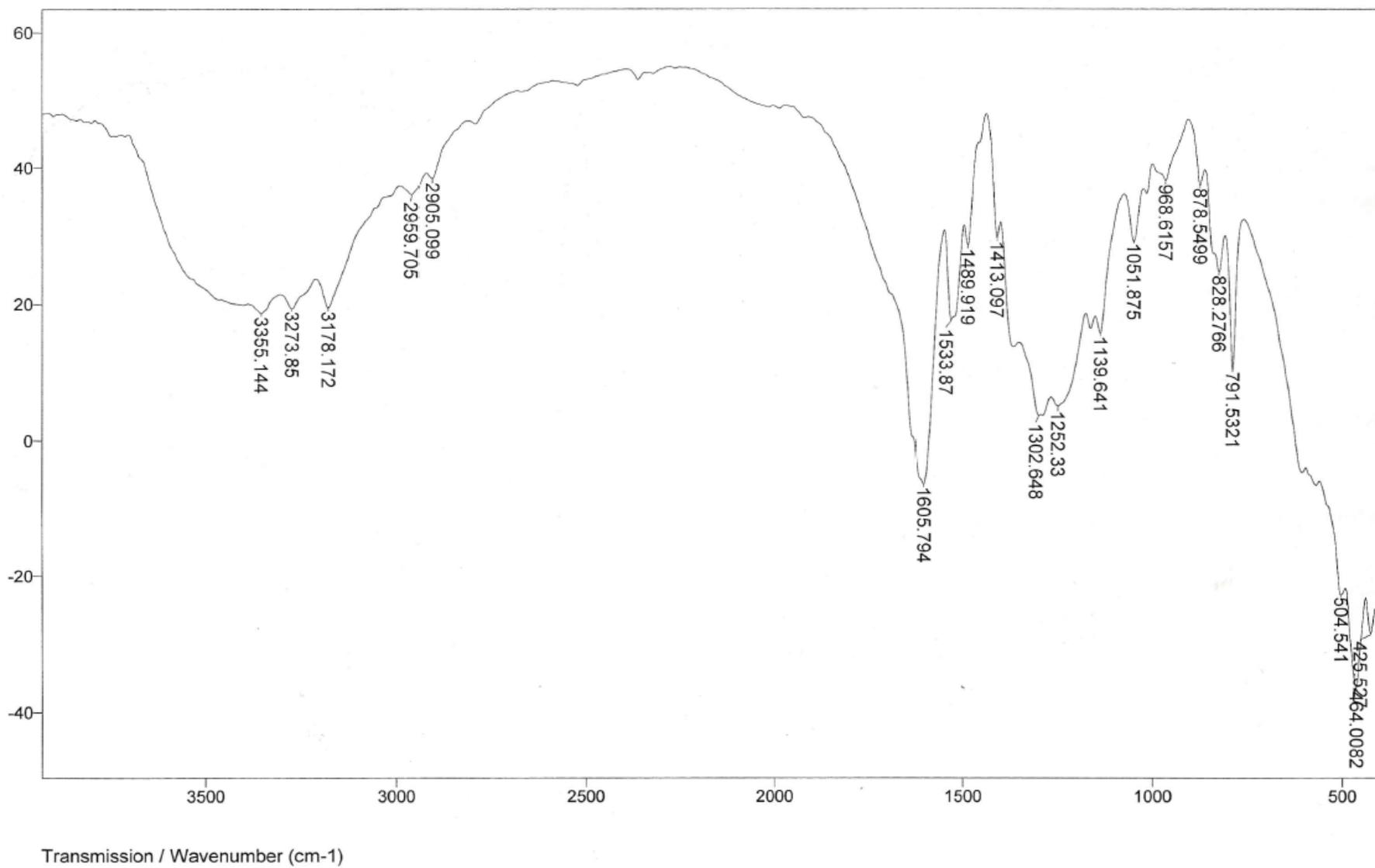


Figura 20: Espectro de infravermelho para o composto 1 a partir da rota sintética 2.

Conforme o espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) mostrado na Figura 21, a maioria dos sinais estão situados acima de δ 7 ppm, o que caracteriza a presença do anel aromático, como descreveram Dimmock *et al.* (2000).

Na Tabela 5 estão listadas as atribuições e deslocamento químico dos sinais de RMN de ^1H para o composto 1. Os hidrogênios referentes ao anel aromático estão distribuídos em δ 8,59; δ 8,01 e δ 6,48 ppm conforme as constantes de acoplamento. Pandeya *et al.* (2000) relataram os hidrogênios do anel aromático com a presença do bromo como um dos substituintes no anel aromático, na região de δ 7,2 – 7,4.

A presença dos singletos em δ 8,87 e 9,37 ppm representam o grupo NH nas posições 3 e 4, Leite *et al.* (2004) atribuíram aos hidrogênios do grupo amino NH, as regiões δ 8,24 e 8,00 às respectivas posições descritas (8 e 9).

Tabela 5: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ^1H para o composto 1 sintetizado a partir da rota sintética 2 em solvente DMSO d_6 , 500MHz.

Posição do hidrogênio na molécula	Multiplicidade do fragmento molecular	Deslocamento químico δ (ppm)	Constante de acoplamento J (Hz)	Número de Hidrogênios
H _{arom.} - 2	Dubleto	8,59	0,5	1
H _{arom.} - 4	Dubleto	8,01	8,25 e 0,5	1
H _{arom.} - 5	Dubleto	6,48	8,25	1
H-4	Singleto	9,37	-	1
H-3	Singleto	8,87	-	1
H-2	Singleto	7,82	-	1
H-2	Singleto	7,53	-	1

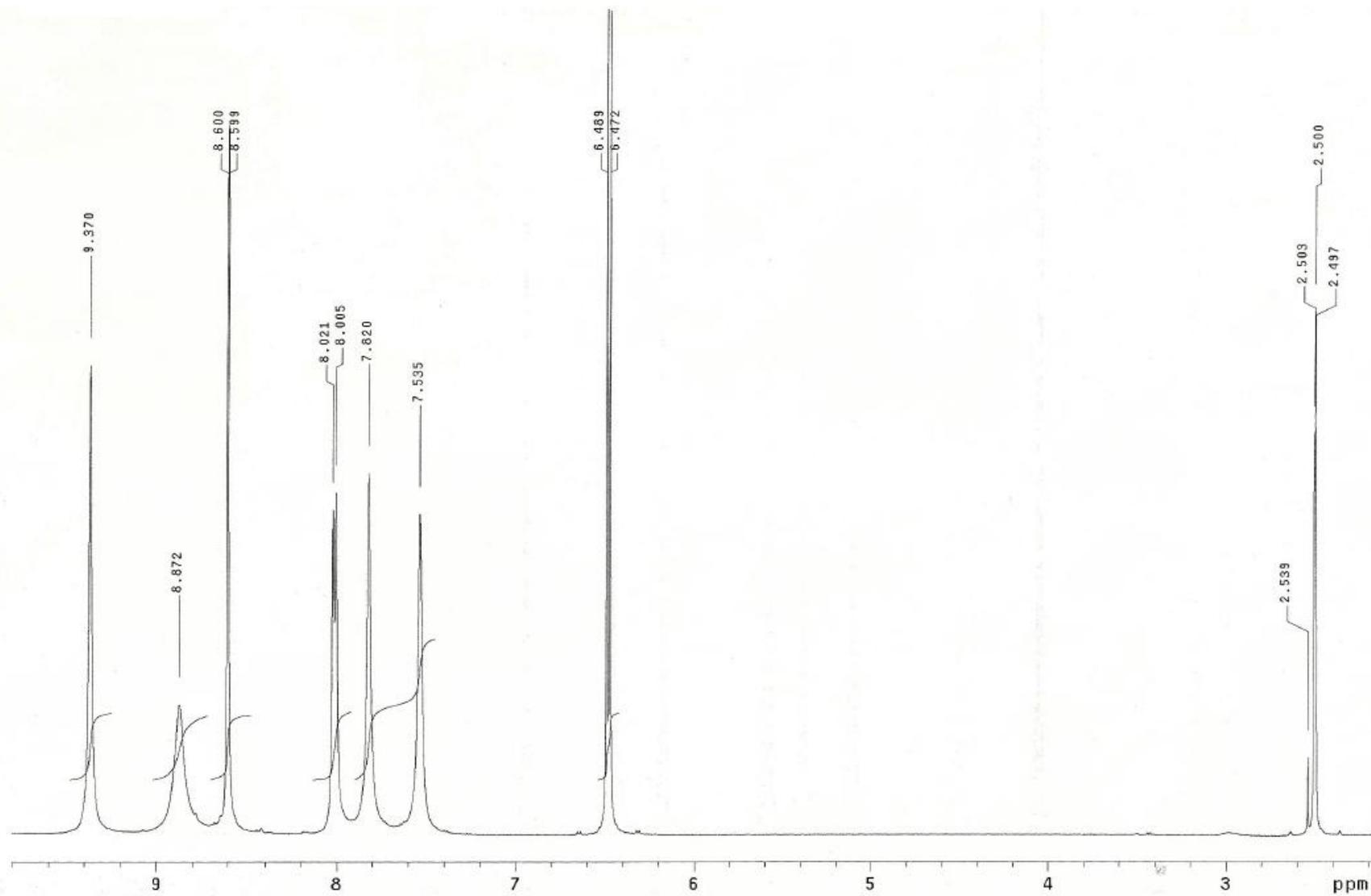


Figura 21: Espectro de RMN- ^1H para o composto 1 a partir da rota sintética 2.

A Figura 22 apresenta o espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, DMSO) com os respectivos sinais ligados aos hidrogênios, descritos anteriormente.

O sinal apresentado em δ 181,9 ppm refere-se ao carbono do grupo tionila (C=S), que apresenta-se bastante deslocado no espectro, conforme relataram Maciel *et al.* (1998).

O sinal em δ 167,3 ppm refere-se a carbonila, que possui elevada densidade eletrônica em torno do anel aromático, justificando assim um elevado deslocamento químico no espectro, embora não seja elevado tanto quanto C=S. Maciel *et al.* (1998) também descreveram a carbonila, o sinal em δ 166,6 ppm.

Krumlinde *et al.* (2009) atribuíram ao anel aromático a região de δ 124,3 – 150,2, porém neste espectro, a região dos carbonos aromáticos foi atribuída de δ 104,6 - 159,9 ppm, conforme listados na Tabela 6. A estrutura molecular do composto está representada na Figura 23 com os respectivos posicionamentos dos átomos e hidrogênio e carbono.

Tabela 6: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ^{13}C para o composto 1 formado a partir da rota sintética 2 em solvente DMSO d_6 , 126MHz.

Posição do carbono na molécula	Deslocamento químico δ (ppm)
C-2	149,3
C-3	121,9
C-4	138,0
C-5	104,6
C-6	159,9
C-1	167,3
C-7	181,9

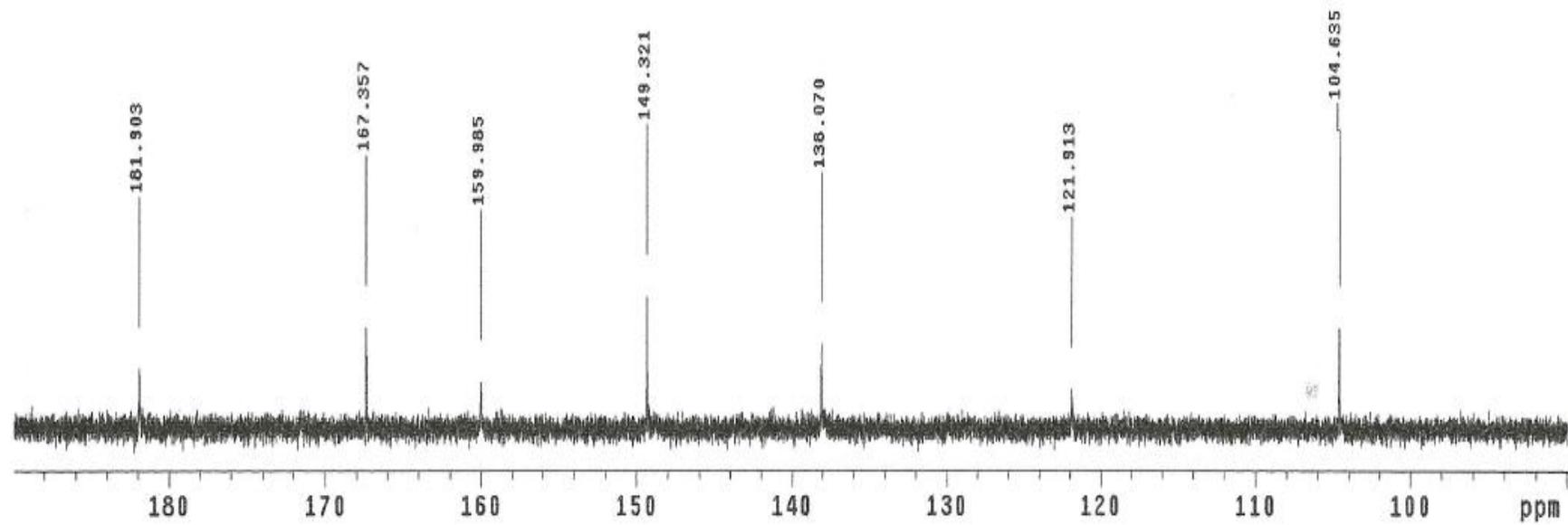


Figura 22: Espectro de RMN- ^{13}C para o composto 1 a partir da rota sintética 2.

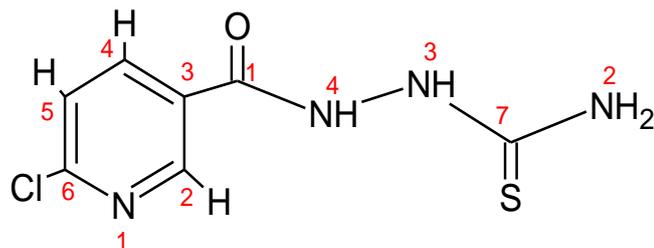


Figura 23: Estrutura molecular e posição dos hidrogênios e carbonos do composto 1.

A Figura 24 mostra o espectro de massas do composto 1, que apresentou um provável íon molecular em m/z 211. Embora apresente discordância do valor da massa calculada (230,5 g/mol), é possível observar as fragmentações da molécula no modo negativo $[M-H]^-$ para a porção alifática da estrutura molecular.

A fragmentação em m/z 194 corresponde ao íon NH_2^- que apresenta uma perda de massa 17, um fragmento em m/z 150,1 referente à perda de $[M-61]$ relativo ao íon $CSNH_2^-$. No espectro não é possível visualizar a perda de $[M-76]$ referente ao fragmento $NHCSNH_2^-$, mas possivelmente pode ser verificado com a fragmentação em m/z 118,2 com a perda de $[M-91]$ referente ao fragmento $NHNHCSNH_2^-$. Em seguida, o fragmento m/z 91,3 que corresponde ao fragmento $CONHNHCSNH_2^-$ a qual corresponde à perda de $[M-119]$.

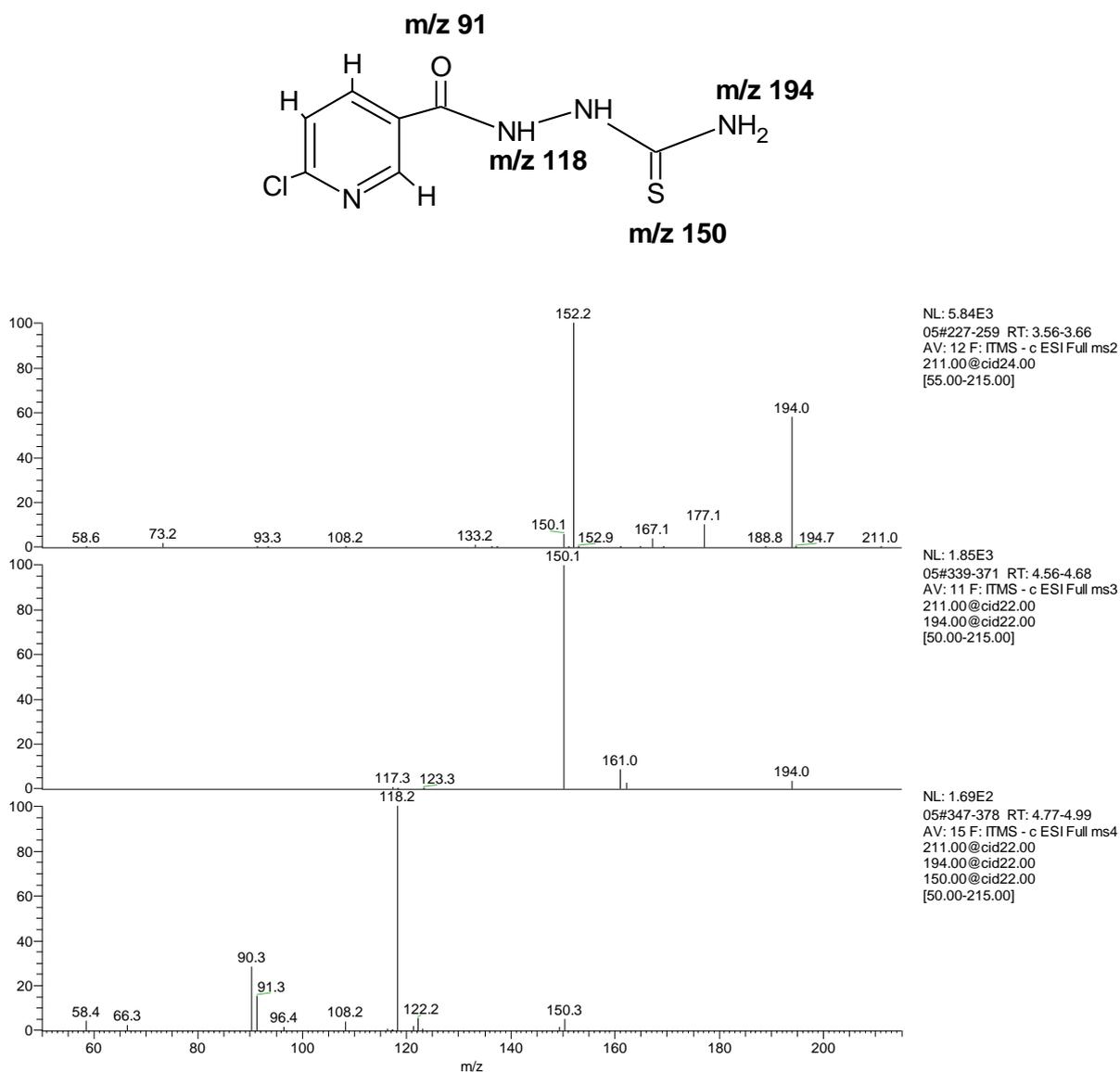


Figura 24: Espectro de massas em MS^4 do íon quasi-molecular em m/z 211 $[M-H]^-$ por ESI-IT-MS para o composto 1 sintetizado a partir da rota sintética 2.

5.3 Síntese do composto 2

A preparação de iminas através da reação de redução por $NaBH_4$, é descrita na literatura como um procedimento simples, econômico que proporciona bons rendimentos (ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2004).

O composto 2 foi obtido através da reação em meio alcoólico do composto 1 com $NaBH_4$. O precipitado formado apresentou rendimento de 95% e ponto de fusão na faixa de 220,7 – 221,5 °C. A elevada faixa de temperatura quando comparada ao composto 1, pode está relacionada à formação de subprodutos ou ainda à presença do grupo OH, após a redução.

Haja vista, que ligações de hidrogênio necessitam de maior temperatura para o rompimento das ligações intermoleculares.

A Tabela 7 mostra as principais atribuições das absorções registradas no espectro vibracional do produto. A Figura 25 mostra o espectro de infravermelho para o composto. O espectro apresenta uma banda larga na região de $3312,7 \text{ cm}^{-1}$, referente à ν (OH). De acordo com Bastos (2004), as vibrações associadas ao estiramento ν (OH), apresentam-se na região de $3481 - 3070 \text{ cm}^{-1}$ no espectro. Kovala-Demertzi *et al.* (1998) verificaram a presença da banda atribuída ao estiramento ν (C=S), na região entre $833 - 827 \text{ cm}^{-1}$, neste espectro apresentado pode-se observar o deslocamento do mesmo estiramento na região de $834,1 \text{ cm}^{-1}$.

A região correspondente à faixa de $641,9 - 621,4 \text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída à deformação no plano do anel piridínico, a mesma deformação no plano do anel piridínico foi atribuída por Casas *et al.* (2000) na faixa de $606-576 \text{ cm}^{-1}$. No espectro é possível observar bandas na região $1611,2 - 1701,2 \text{ cm}^{-1}$ atribuídas ao estiramento ν (C-O), enquanto que Leite *et al.* (2004) atribuíram o mesmo estiramento ν (C-O) à faixa de 1625 cm^{-1} .

Tabela 7: Principais bandas de absorção do espectro de infravermelho para o composto 2.

Estiramento ν	Intensidade dos picos*	Experimental (cm^{-1})	Literatura** (cm^{-1})
OH	m	3312,7	3481 - 3070
C=S	m	834,1	833 - 827
Anel piridinico	m	641,9 - 621,4	606 - 576
C-O	m	1611,2 – 1701,2	1625

*F=forte; m=média e f=fraca. ** CASAS *et al.*, 2000; BASTOS, 2004; LEITE *et al.*, 2004.

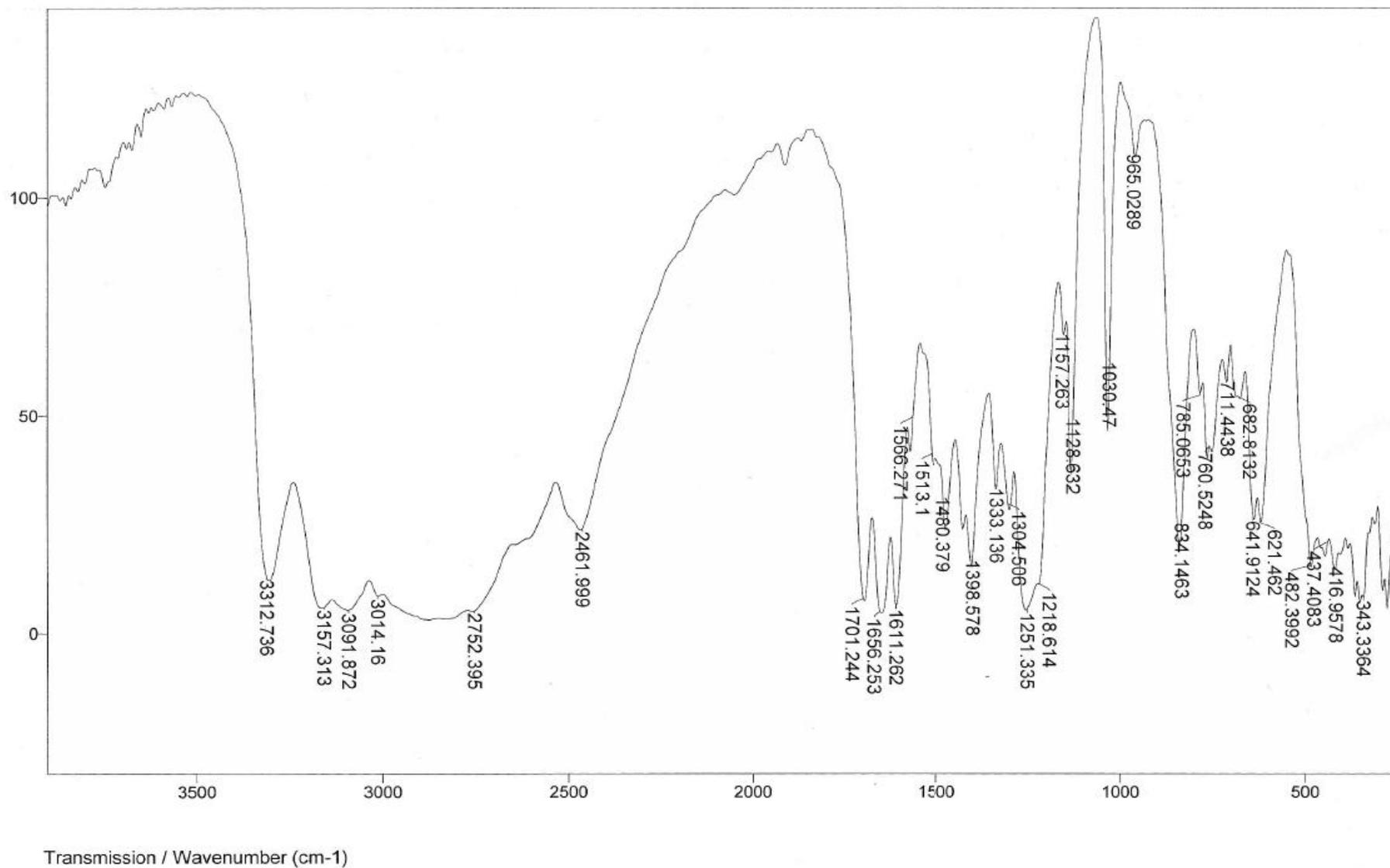


Figura 25: Espectro de infravermelho para o composto 2.

A Figura 26 mostra o espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) para o composto 2. A Tabela 8 apresenta as atribuições e deslocamento químico dos sinais observados no espectro.

Observa-se um possível excesso de reagentes na faixa intermediária do espectro, o que dificultou a identificação exata das posições dos hidrogênios na molécula. Os picos apresentados nas regiões de δ 6,95; δ 8,22 e δ 9,35 ppm estão relacionados aos hidrogênios do anel aromático, conforme as constantes de acoplamento entre os hidrogênios. Ferraz (2008) atribuiu à região de aromáticos a faixa de δ 7,3 – 8,59. Ambas as atribuições possuem grupos hidroxilas (OH), a diferença ocorre na posição da molécula de OH, sendo que neste espectro apresentado encontra-se mais próximo do anel aromático, enquanto que nos dados da literatura descritos acima, o grupo situa-se no extremo da molécula.

Silverstein (2000) atribui à região correspondente aos grupos hidroxilas (OH), regiões em δ 9,5 – 9,6 quando próximos de anel aromático, neste espectro foi possível observar a presença de um singleto largo na região de δ 9,8 ppm, característico de grupos OH. Nota-se que no espectro de RMN de ^1H para o composto 1, não ocorre o pico para a mesma região citada, o que implica dizer que provavelmente ocorreu a reação de redução do composto.

Tabela 8: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ^1H para o composto 2.

Posição do hidrogênio na molécula	Multiplicidade do fragmento molecular	Deslocamento químico δ (ppm)	Constante de acoplamento J (Hz)	Número de Hidrogênios
H _{arom.} - 2	Dubleto	9,35	1	1
H _{arom.} - 4	Duplo Dupleto	8,22	8,5 e 1,5	1
H _{arom.} - 5	Dubleto	6,95	8,5	1
H-1	Singleto largo	9,8	-	1
H-1	Dubleto	7,70	0,5	1
H-4	Singleto	8,46	-	1
H-3	Singleto	7,72	-	1
H-2	Singleto	7,89	-	1
H-2	Singleto	7,87	-	1

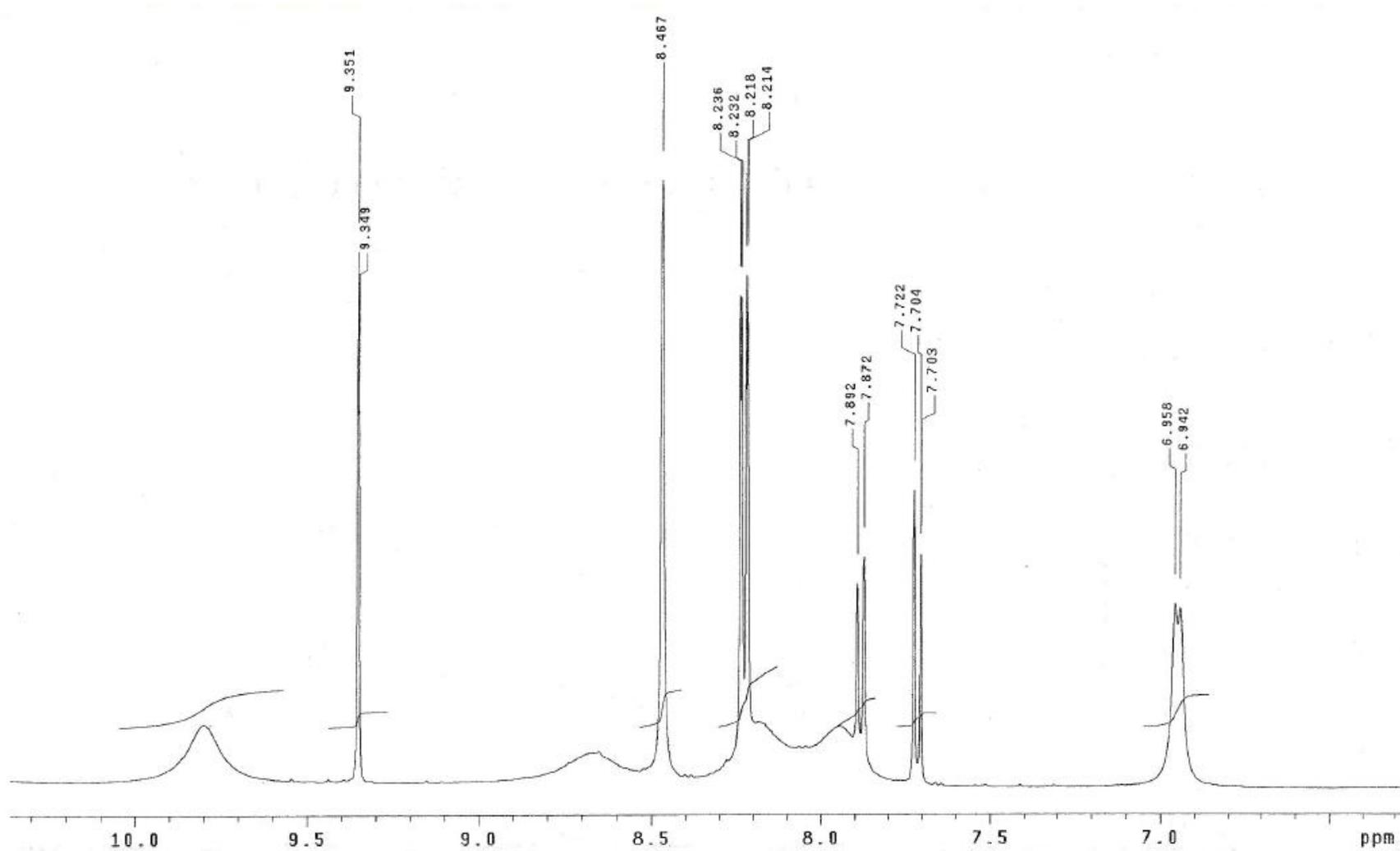


Figura 26: Espectro de RMN-¹H para o composto 2.

Conforme a Figura 27 é possível observar o espectro de RMN-¹³C (126 MHz, DMSO) para o composto 2. A Tabela 9 apresenta as atribuições e deslocamento químico dos sinais observados no espectro.

O sinal referente ao grupo C=S, descrito por Bastos (2004) próximo à região de δ 180 ppm, no espectro obtido foi deslocado para δ 117,9 ppm, o deslocamento do sinal provavelmente ocorreu em virtude da síntese de redução, que deve ter reduzido também a ligação dupla entre o carbono e o enxofre. A possível estrutura molecular do composto identificado encontra-se na Figura 28.

Tabela 9: Principais picos de absorção do espectro de RMN-¹³C para o composto 2.

Posição do carbono na molécula	Deslocamento químico δ (ppm)
C-2	143,3
C-3	128,9
C-4	131,5
C-5	119,2
C-6	147,6
C-1	164,6
C-7	117,9

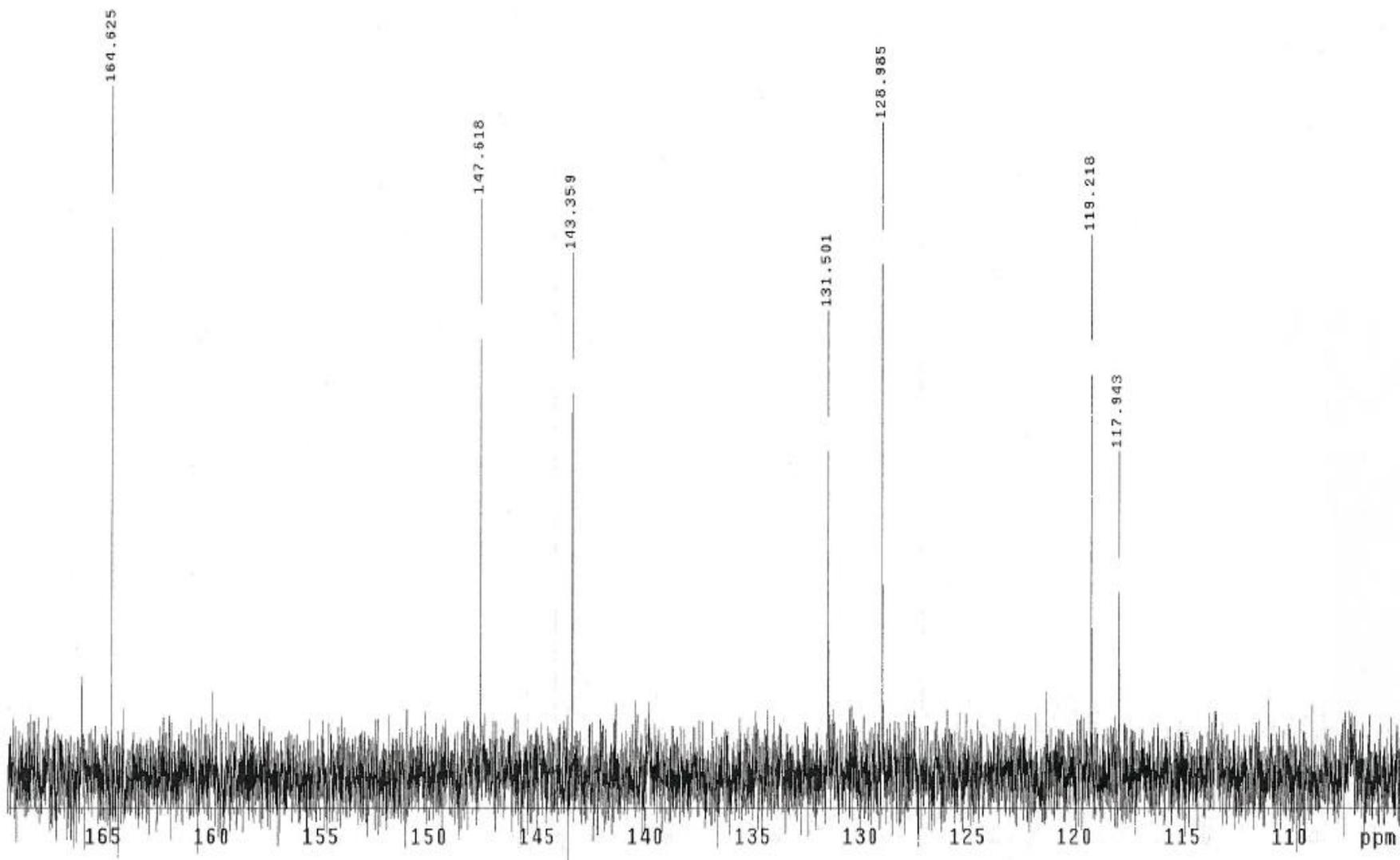


Figura 27: Espectro de RMN- ^{13}C para o composto 2.

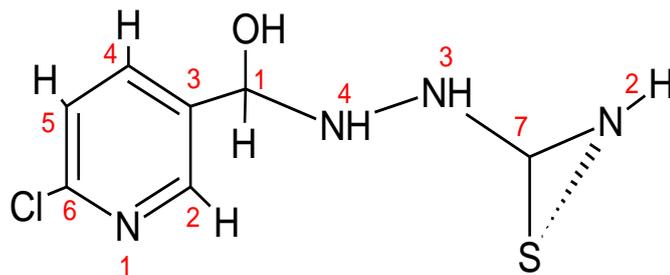


Figura 28: Estrutura molecular e posição dos hidrogênios e carbonos do composto 2.

A Figura 29 mostra o espectro de massas para o composto 2, que apresentou um provável íon molecular em m/z 213. Embora a massa do íon molecular apresente diferença com relação ao valor da massa calculada (232,5 g/mol), é possível observar as fragmentações da molécula no modo positivo $[M-H]^+$ para a porção alifática da estrutura molecular.

A fragmentação em m/z 196 relacionado à perda de massa 16 corresponde ao íon NH_2^+ , um fragmento em m/z 154 relativo ao íon $CSNH_2^+$ referente à perda de massa 60. A fragmentação em m/z 138 corresponde à $[M-60]$ relacionada ao fragmento $NHCSNH_2$, enquanto que a fragmentação em m/z 121 refere-se a perda de $[M-90]$ caracterizando $NHNHCSNH_2^+$. Em seguida, o fragmento m/z 94 que corresponde à estrutura alifática da molécula.

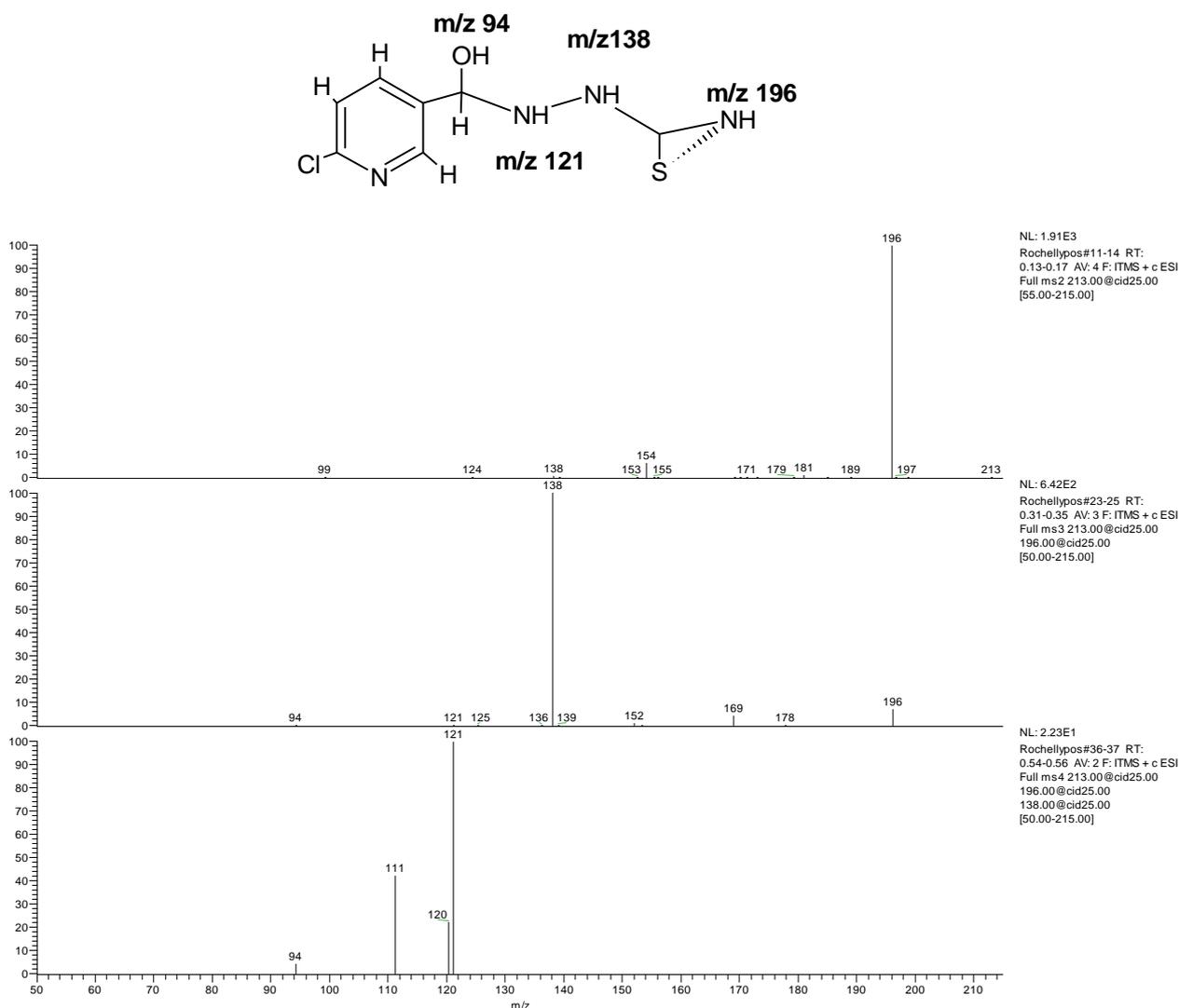


Figura 29: Espectro de massas em MS⁴ do íon quasi-molecular em m/z 213 $[M-H]^+$ por ESI-IT-MS para o composto 2.

5.4 Síntese do composto 3

5.4.1 Rota sintética 1

O procedimento de síntese do composto 3 ocorreu por meio de reação de nitração em duas fases, uma à frio e outra à quente. O objetivo era obter um composto com o radical NO₂ no anel aromático da molécula, para posterior análise de eficácia da atividade inseticida.

Ao final da etapa de síntese, o composto apresentou um aspecto leitoso, provavelmente em virtude da adição de cloreto de cálcio, sendo necessário o aquecimento para eliminar esse aspecto leitoso. Entretanto, o procedimento resultou em uma solução límpida com formação de precipitado. O produto obtido apresentou ponto de fusão na faixa de 269,3-269,7°C e rendimento 81%.

O espectro de infravermelho apresentado na Figura 30 mostra apenas uma absorção forte atribuída ao estiramento ν (C-N) alifático na região de 1143 cm^{-1} , o mesmo estiramento foi descrito por Ibrahim *et al.* (1997) na região de $1560\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ no plano de deformação axial. Para o espectro, não foi possível atribuir bandas para o anel aromático ou mesmo para o grupo NO_2 .

Entretanto, o espectro mostra que não foi possível obter o composto nitrado, assim como o espectro de RMN de ^1H mostrado na Figura 31, que não apresentou picos característicos à estrutura molecular proposta pela rota sintética.

No entanto, a elevação da temperatura na fase de obtenção de uma solução mais límpida, após adição de cloreto de cálcio, pode ter aumentado o grau de nitração, dessa forma obteve-se, possivelmente, uma quantidade maior de subprodutos na reação (SANTOS, 2004). O que resultou em um produto de caráter inorgânico, com a ausência de absorções características de compostos orgânicos. Diante desses resultados foi proposta a rota sintética 2, com algumas alterações para verificar a ocorrência da formação do composto nitrado.

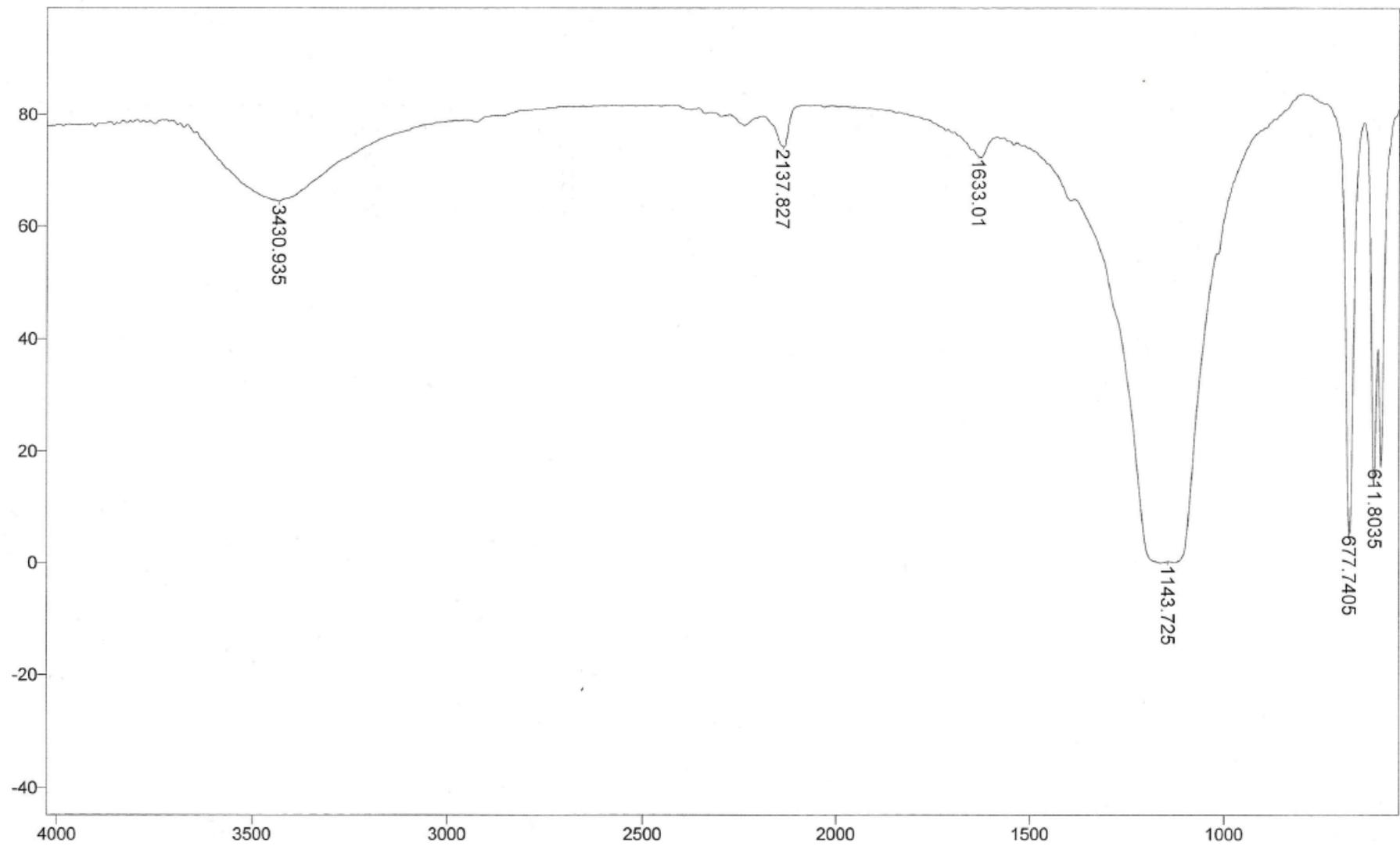


Figura 30: Espectro de infravermelho para o composto 3 (rota sintética 1).

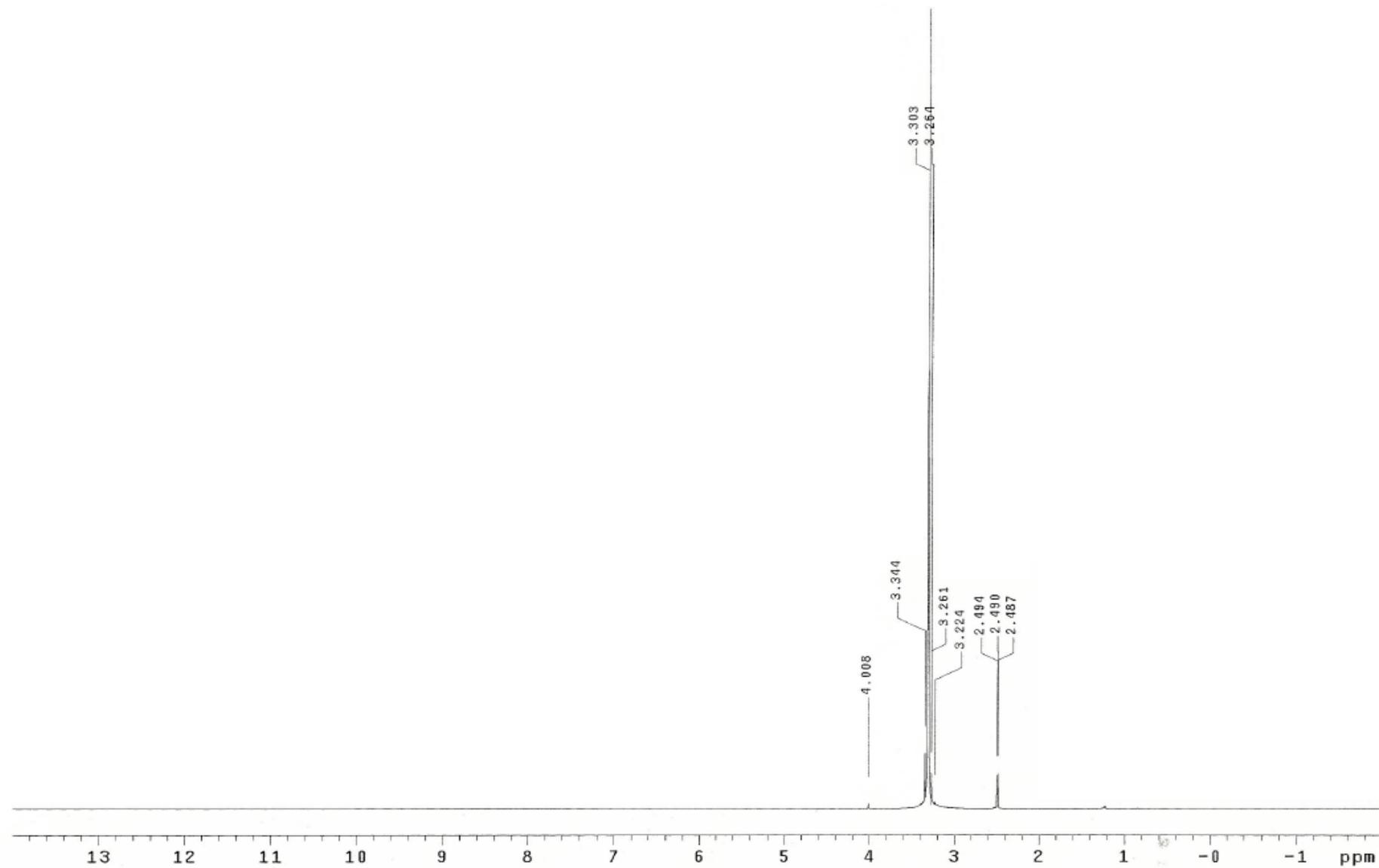


Figura 31: Espectro de RMN- ^1H para o composto 3 (rota sintética 1).

5.4.2 Rota sintética 2

Nesta segunda rota proposta, o composto 1 foi dissolvido e agitado lentamente na mistura de H₂SO₄ e HNO₃ previamente resfriada. A liberação de um gás castanho, que possivelmente era o NO₂, pode ter levado à formação de isômeros (*orto*, *meta* e *para*) em quantidades significativas (VOGEL, 1971; FLEMING, 1991). Ao precipitado formado obteve-se um rendimento de 13 % e ponto de fusão 225,4 – 228,7 °C.

A Tabela 10 lista as principais atribuições do espectro de infravermelho para as possíveis estruturas moleculares. A Figura 32 mostra o espectro de infravermelho para o composto 3. De acordo com Silverstein (2000), os nitro compostos aromáticos absorvem nas mesmas frequências dos nitro compostos alifáticos. Assim, a identificação das bandas características dos grupos funcionais presentes na molécula não se mostrou de forma exata.

As absorções atribuídas ao estiramento ν (NO₂), ligados diretamente aos aromáticos, mostraram-se em duas bandas nas regiões de 1589,9 e 1520,3 cm⁻¹, ambas situadas na região de deformação angular do espectro. Yang *et al.* (2001) relataram a presença de grupos NO₂ ligados diretamente ao anel aromático em duas bandas situadas nas regiões de 1531 – 1330 cm⁻¹ (assimétrico e simétrico).

A banda 1684,7cm⁻¹ pode ser atribuída ao estiramento de ν (C=O), Lalita *et al.* (1996) e Crans (2000) atribuíram o mesmo estiramento à região de 1703-1683 cm⁻¹. A banda atribuída ao estiramento ν (C=S), deslocou-se para a região de 857,7 cm⁻¹, enquanto que Kovala-Demertzi *et al.*(1998) verificaram o mesmo estiramento na região entre 833-827 cm⁻¹.

Tabela 10: Principais bandas de absorção do espectro de infravermelho para o composto 3 (rota sintética 2).

Estiramentos ν	Intensidade dos picos*	Experimental (cm ⁻¹)	Literatura** (cm ⁻¹)
NO ₂	m	1589,9 e 1520,3	1531 - 1330
C=S	f	857,7	833 - 827
C=O	m	1684,7	1703 - 1683

*F=forte; m=média e f=fraca. ** LALITA *et al.*, 1996; KOVALA-DEMERTZI *et al.*, 1998; CRANS, 2000; YANG *et al.*, 2001.

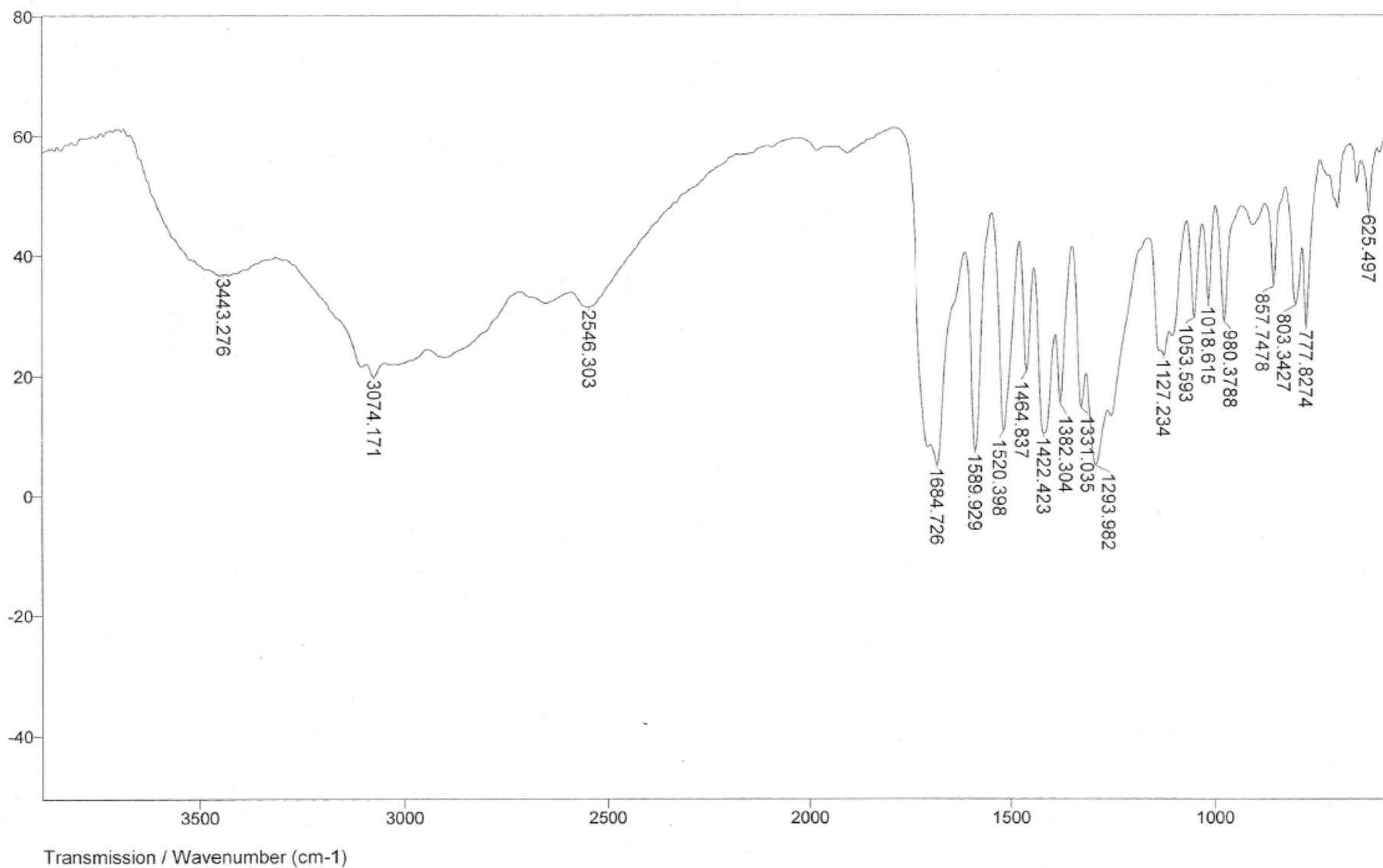


Figura 32: Espectro de infravermelho para o composto 3 (rota sintética 2).

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) na Figura 33 mostra o espectro do produto sintetizado, as prováveis posições dos hidrogênios estão descritas nas Tabelas 11, 12 e 13, em virtude da formação de isômeros do produto sintetizado.

De acordo com Solomons e Fryhle (2005), a presença de outros substituintes no anel aromático, influencia a ocorrência do grupo NO_2 na posição *orto* ou *para* do anel aromático, além da posição *meta*. As respectivas posições no anel podem estar relacionadas ao átomo de cloro como substituinte do anel, que leva ao aumento da densidade eletrônica da região, favorecendo a posição *orto*, ou ainda o efeito de simetria do anel em virtude da presença do grupo NO_2 na posição *para*.

Na região de δ 7,90 e 7,73 é possível observar dois dubletos que provavelmente são sinais duplicados correspondentes ao grupo NH_2 da molécula, em decorrência dos dubletos apresentarem mesmo valor para a constante de deslocamento químico. Boechat *et al.* (2006) descreveram o grupo NH_2 nas regiões de δ 7,79 e 7,95.

O dubleto em δ 8,62 (δ 8,63-8,61) apresenta-se equivalente ao sinal em δ 8,62 no espectro. Maciel *et al.* (1998) relatam que a duplicação de sinais no espectro está relacionada a formação de isômeros da molécula. No entanto, a presença de sinais duplicados está relacionada à possível mistura de três isômeros do produto, como mostra a Figura 34.

Tabela 11: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ^1H para o composto 3 na posição *orto* em solvente DMSO d_6 , 500MHz.

Posição do hidrogênio na molécula	Multiplicidade do fragmento molecular	Deslocamento químico δ (ppm)	Constante de acoplamento J (Hz)	Número de Hidrogênios
$\text{H}_{\text{arom.}} - 2$	Dubleto	8,20	8,5	1
$\text{H}_{\text{arom.}} - 4$	Dubleto	8,24	8,5	1
H - 4	Singleto	9,21	-	1
H - 3	Singleto	8,83	-	1
H - 2	Dubleto	7,90	8,5	1
H - 2	Dubleto	7,73	8	1

Tabela 12: Principais picos de absorção do espectro de RMN-¹H para o composto 3 na posição *para* em solvente DMSO d₆, 500MHz.

Posição do hidrogênio na molécula	Multiplicidade do fragmento molecular	Deslocamento químico δ (ppm)	Constante de acoplamento J (Hz)	Número de Hidrogênios
H _{arom.} - 2	Dubleto	8,20	8,5	1
H _{arom.} - 5	Dubleto	8,66	8,5	1
H - 4	Singleto	9,11	-	1
H - 3	Singleto	8,92	-	1
H - 2	Dubleto	7,90	8,5	1
H - 2	Dubleto	7,73	8	1

Tabela 13: Principais picos de absorção do espectro de RMN-¹H para o composto 3 na posição *meta* em solvente DMSO d₆, 500MHz.

Posição do hidrogênio na molécula	Multiplicidade do fragmento molecular	Deslocamento químico δ (ppm)	Constante de acoplamento J (Hz)	Número de Hidrogênios
H _{arom.} - 4	Dubleto	8,31	8,5	1
H _{arom.} - 5	Dubleto	8,55	8,5	1
H - 4	Singleto	9,14	-	1
H - 3	Singleto	8,92	-	1
H - 2	Dubleto	8,11	8	1
H - 2	Dubleto	7,90	8,5	1

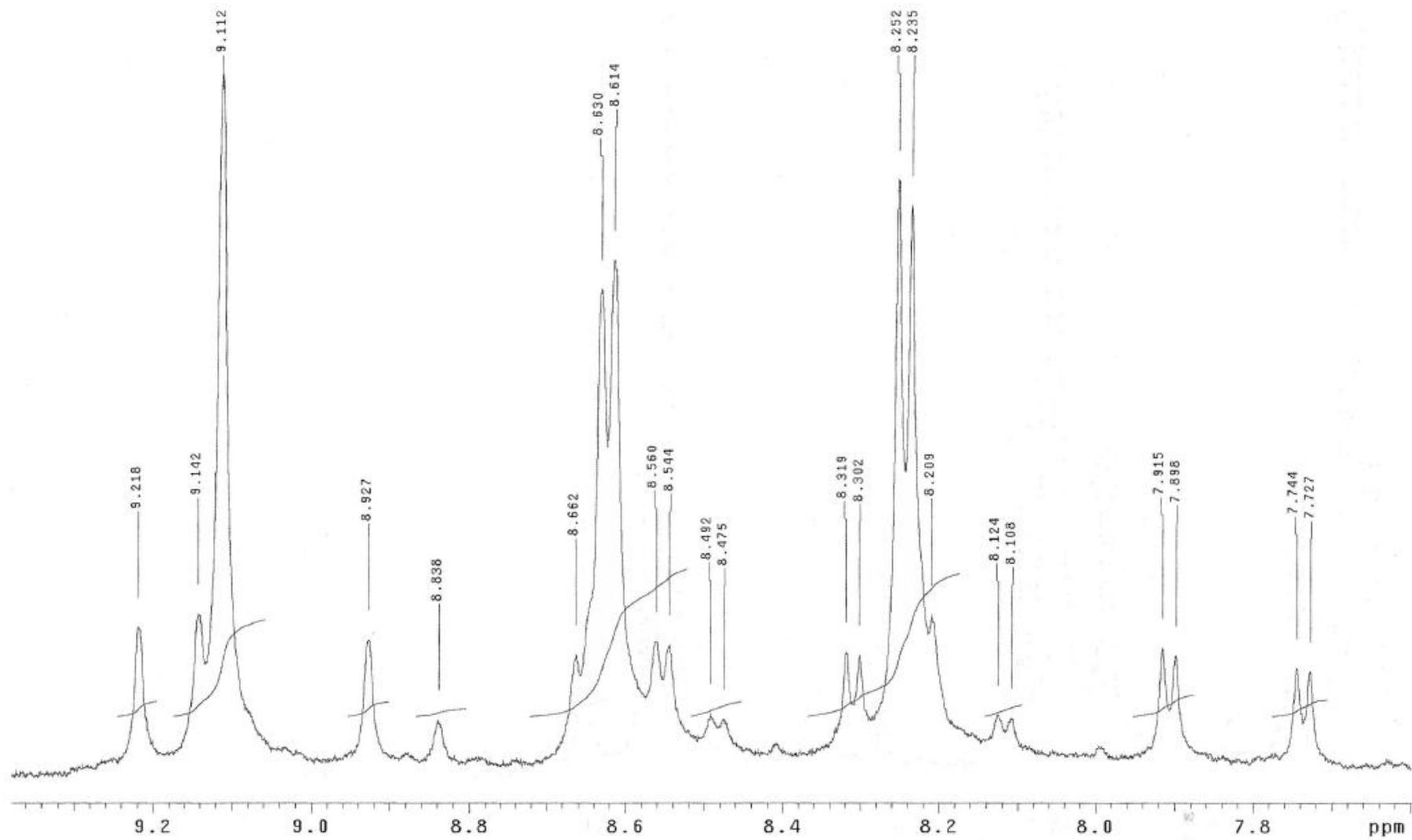


Figura 33: Espectro de RMN- ^1H dos isômeros do composto 3 (rota sintética 2).

As Tabelas 14, 15 e 16 listam as principais atribuições do espectro de RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO) para as possíveis estruturas. A Figura 34 apresenta o espectro do composto.

Entretanto, ao comparar a estrutura do composto 1 com a estrutura do composto 3, pode-se observar um deslocamento dos átomos de carbono, principalmente nas posições 4 e 5 do anel, o que pode estar relacionado a presença do grupo NO_2 na molécula. Todavia, os isômeros do composto podem apresentar-se nas posições *orto*, *para* ou *meta* substituídos, conforme o deslocamento da molécula, como observados por Maciel *et al.* (1998) e Fleming (1991). A Figura 35 apresenta as possíveis estruturas para o composto sintetizado.

Hsiao *et al.* (2004) atribuíram ao carbono ligado ao NO_2 as regiões em δ 141,7 e 140,6, no espectro apresentado para os compostos, o pico em δ 140,9 ppm refere-se a tionila, que deslocou-se no espectro de absorção em decorrência da possível redução em meio ácido.

Tabela 14: Principais picos de absorção do espectro de RMN- ^{13}C para o composto 3 (rota sintética 2) na posição *orto* em solvente DMS d_6 , 126MHz.

Posição do carbono na molécula	Deslocamento químico δ (ppm)
C-2	150,1
C-3	122,5
C-4	138,7
C-5	140,9
C-6	147,6
C-1	165,7
C-7	154,0

Tabela15: Principais picos de absorção do espectro de RMN-¹³C para o composto 3 (rota sintética 2) na posição *para* em solvente DMS d₆, 126MHz.

Posição do carbono na molécula	Deslocamento químico δ (ppm)
C-2	150,3
C-3	128,7
C-4	140,9
C-5	118,8
C-6	147,6
C-1	165,0
C-7	154,0

Tabela 16: Principais picos de absorção do espectro de RMN-¹³C para o composto 3 (rota sintética 2) na posição *meta* em solvente DMS d₆, 126 MHz.

Posição do carbono na molécula	Deslocamento químico δ (ppm)
C-2	140,9
C-3	125,0
C-4	128,7
C-5	118,6
C-6	147,6
C-1	165,1
C-7	154,0

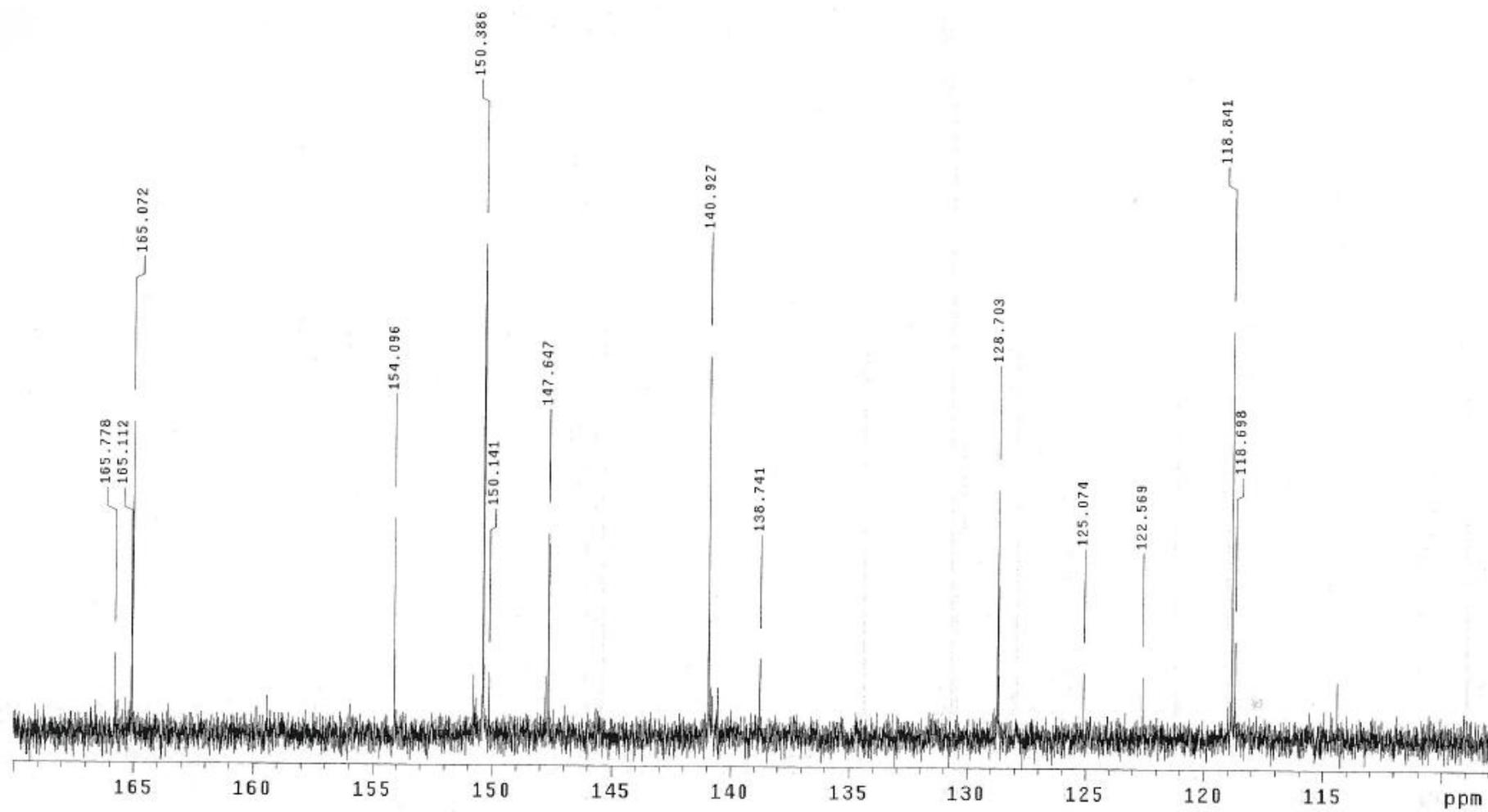


Figura 34: Espectro de RMN- ^{13}C para os isômeros do composto 3 (rota sintética 2).

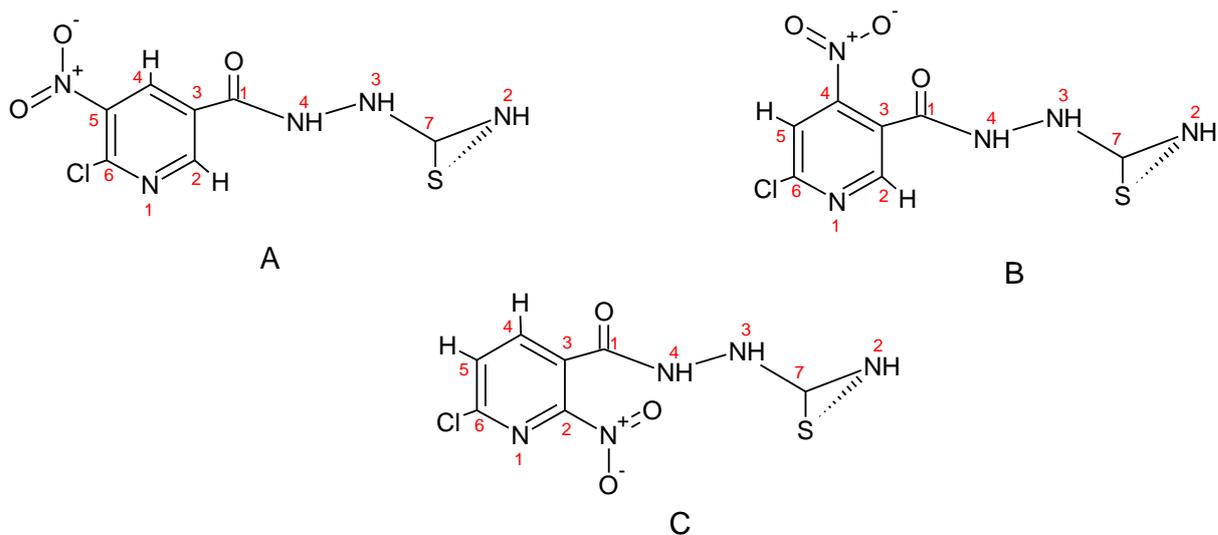
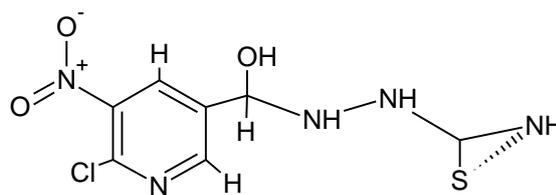


Figura 35: Possíveis estruturas moleculares para os isômeros do composto 3 nas posições *orto* (A), *para* (B) e *meta* (C).

A Figura 36 apresenta o espectro de massas do composto 3, que mostra um provável íon molecular em m/z 179, com uma fragmentação de m/z 118 correspondente a porção C=SNH₂ que apresentou uma perda de [M-61]. O pico em m/z 133 pode estar relacionado à fragmentação de NO₂, com perda de [M-46]. O íon molecular mostrou-se incoerente ao cálculo de massa correspondente à estrutura (275,5g/mol). Entretanto, o espectro apresentou apenas as fragmentações descritas, referente à estrutura proposta. Provavelmente a formação de subprodutos na síntese tenha dificultado a identificação das fragmentações relacionada à estrutura molecular.

m/z 133 NO₂



m/z 118

nit #43-195 RT: 0.52-1.86 AV: 112 NL: 9.64E2
F: ITMS - c ESI Full ms2 179.00@cid18.00 [50.00-181.00]

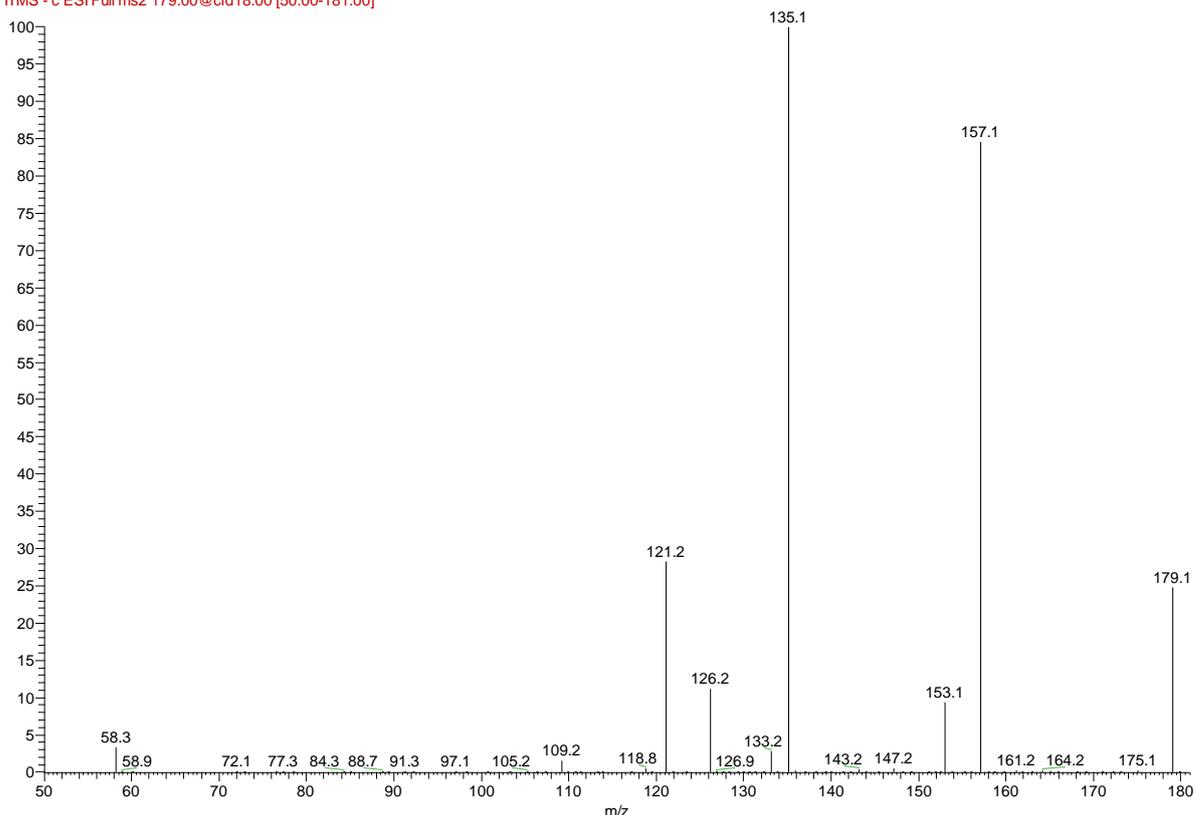


Figura 36: Espectro de massas em MS⁴ do íon quasi-molecular em m/z 179 [M-H]⁺ por ESI-IT-MS para o composto 3.

Os neonicotinóides surgiram nos últimos anos como uma nova classe química de inseticidas sintéticos. Desde então vários derivados da classe tem surgido com o objetivo de contribuir com a variedade de produtos comercializados até então, principalmente em virtude do amplo espectro de ação nos diferentes modelos biológicos, quando avaliados (YAMAMOTO *et al.*, 1998; SU, 2012).

Na literatura, não há muitos estudos a respeito da síntese de novos derivados de neonicotinóides, principalmente quando associados a outras moléculas que apresentem comprovada atividade biológica, como por exemplo, as tiossemicarbazonas, que apresentam um amplo perfil biológico, como afirmam Beraldo (2004) e Bastos (2004).

Contudo, neste trabalho foram sintetizados alguns compostos derivados de neonicotinóides associados às tiossemicarbazidas, e posteriormente analisados quanto à atividade larvicida e adulticida, adotando como modelo biológico, *A. darlingi*, considerado o principal vetor da malária na Amazônia.

Entretanto, a sequência de síntese dos compostos iniciou-se por meio do precursor das moléculas, o ácido cloronicotínico. A síntese ocorreu por meio da reação de oxidação com KMnO_4 , com a finalidade de acompanhar as etapas de obtenção do ácido, avaliar melhores rendimentos e baixo custo para síntese dos produtos.

Porém, a obtenção do ácido cloronicotínico não foi possível, como pôde ser verificado após a síntese do composto 1 a partir da rota sintética 1. As análises espectroscópicas de identificação da estrutura comprovaram a ausência do anel aromático, característico do ácido cloronicotínico. Observando apenas a estrutura da tiossemicarbazida, utilizada como reagente na síntese.

Embora a síntese do ácido cloronicotínico tenha ocorrido de forma semelhante ao processo de síntese descrito por Black *et al.* (1948), provavelmente a reação não ocorreu de forma satisfatória em virtude do KMnO_4 em excesso no meio, que após o processo de neutralização e posterior aquecimento, tenha provocado a formação de KClO_3 e desprendimento do cloro livre, após evaporação da solução.

No entanto, o processo de síntese do composto 1 a partir do ácido cloronicotínico adquirido comercialmente, apresentou rendimentos de 90 %. A reação de adição e posterior eliminação resultaram na estrutura molecular proposta inicialmente, indicando a presença da carbonila na molécula em estudo, como descrito nas análises espectroscópicas. Entretanto, a análise de espectrometria de massa apresentou valores de íon molecular incoerentes com o valor calculado da massa, mas condizentes com as respectivas fragmentações da molécula.

A reação de redução do composto 1 por meio do NaBH_4 , proporcionou rendimentos de 95 % para o composto 2. De acordo com os dados obtidos através das análises de RMN de ^1H e ^{13}C , foi possível observar a presença do grupo hidroxila, ausente no composto anterior, juntamente com a espectrometria de massas que apresentou a respectiva fragmentação do grupamento hidroxila. Embora os espectros apresentem relativa impureza nos compostos.

A obtenção do composto 3 por meio da rota sintética 1, não ocorreu de modo eficaz, em virtude da presença do cloreto de cálcio na reação, que contribuiu com a alteração da natureza do composto sintetizado, ou seja, através do método seguido obteve-se um produto com características inorgânicas, em razão da ausência de bandas característica de compostos

orgânicos no espectro de infravermelho, além da ausência de picos no espectro de RMN de ^1H .

Diante disso, foi realizada outra rota sintética parcialmente similar, sendo obtido o composto 3, com baixos rendimentos em torno de 13 %. Os estudos do produto obtido através da técnica de RMN sugeriram a possível presença de isômeros da molécula, como foi possível observar nos espectros, em razão da capacidade de compostos nitroderivados apresentarem misturas de isômeros, em virtude da formação do eixo de simetria do anel aromático, como descreveu Fleming (1991). A presença dos substituintes do anel aromático proporcionaram as prováveis posições *orto*, *meta* e *para* no anel aromático para o grupo NO_2 .

Através da espectrometria de massa, os dados apresentaram apenas duas fragmentações relacionadas a uma porção da estrutura alifática e outra possivelmente para o grupo NO_2 , dificultando a identificação da estrutura molecular. Assim, a identificação exata do composto não pôde ser confirmada, sugerindo novos métodos de purificação, por exemplo cromatografia líquida, com o objetivo de identificar o grau de pureza dos produtos sintetizados, em seguida os produtos devem ser submetidos a novos bioensaios (larvicidas e adulticidas) a fim de identificar a atividade biológica dos compostos com o maior grau de pureza.

Os produtos sintetizados constituem de moléculas inéditas, ainda não descritas na literatura até o momento. Razão pelo qual, os compostos ainda necessitem de novas análises de caracterização por técnicas de correlação de carbono e hidrogênio, para identificação exata dos constituintes moleculares ali presentes e análises cromatográficas para determinar o grau de pureza das amostras, que dentre os dados observados, há a presença de subprodutos na molécula.

5.5 Avaliação da atividade larvicida

5.5.1 Bioensaios seletivos

Para detectar a toxicidade dos compostos sintetizados 1, 2 e 3, além do imidacloprido, foram realizados bioensaios seletivos com larvas de terceiro estágio de *A. darlingi*, constituindo um total de 30 larvas em cada concentração avaliada, totalizando 870 larvas. Os resultados obtidos serviram como base para posterior aplicação nos bioensaios de dose e cálculo das concentrações letais medianas CL_{50} .

Os valores percentuais da mortalidade das larvas, nas concentrações dos diferentes compostos foram avaliados em intervalos de 24 e 48h, representados na Tabela 17. O composto 1 apresentou mortalidade de 53% na concentração de 1000 ppm após 24 horas, enquanto que as concentrações de 15,6 a 500 ppm não apresentaram mortalidade das larvas em 24 horas de exposição.

No intervalo de 48 horas de exposição, os testes apresentaram atividade tóxica 63,3% nas concentrações de 250 ppm e 500ppm, e de 73% na concentração de 1000 ppm.

O composto 2 apresentou dados de mortalidade para as larvas no intervalo de 24 horas, com 53,3% de mortalidade na concentração de 250 ppm, 83,3% para 500ppm e 90% para a concentração de 1000 ppm. Para o intervalo de 48 horas, observou-se mortalidade acima de 70% para as concentrações avaliadas acima de 125 ppm.

Os dados de mortalidade das larvas observados para o composto 3, apresentaram resultados satisfatórios para as concentrações acima de 250 ppm, no intervalo de 24 horas. Observou-se que para o intervalo de 48 horas, ocorreu mortalidade acima de 56,6% nas concentrações acima de 125 ppm.

A suspensão concentrada de imidacloprido foi bastante efetiva nas concentrações testadas, para os diferentes intervalos de leitura. As concentrações avaliadas foram menores em relação aos compostos sintetizados, considerando a mortalidade de 100% de 1 a 4 ppm nas primeiras 24 horas de exposição.

Tabela 17: Percentual de mortalidade das larvas observada nos bioensaios seletivos para os diferentes compostos.

Compostos sintetizados	Concentração em ppm															
	controle		1000		500		250		125		62,5		31,2		15,6	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
composto 1	0	0	53	73	0	63,3	0	63,3	0	33,3	0	20	0	13,3	0	6,6
composto 2	0	0	90	93,3	83,3	93,3	53,3	76,6	30	73,3	6,6	33,3	0	6,6	0	0
composto 3	0	0	83,3	96,6	73,3	90	63,3	76,6	40	56,6	10	26,6	6,6	23,3	0	20
Produto comercial																
	controle		4		3		2		1		0,5		0,2		0,1	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
imidacloprido	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	90	100	73,3	86,6	60	70

5.5.2 Bioensaios de dose

A partir dos percentuais de mortalidade observados nos bioensaios seletivos, para os diferentes compostos, foi possível selecionar dois dentre os três compostos sintetizados e o imidacloprido para a realização dos bioensaios de dose. As concentrações variaram entre 250 e 1000ppm para os sintéticos, e 0,1 e 0,5 ppm para o imidacloprido. Com um total de 4.200 larvas distribuídas em 300 larvas para cada concentração e controle, sendo que os testes foram realizados em dias alternados.

Conforme a Tabela 18, pode-se visualizar os resultados obtidos para os três produtos utilizados na avaliação das concentrações letais, verificando o tempo de exposição, a concentração letal CL_{50} , valor de g (0,95), qui-quadrado (χ^2), intervalo de confiança para 5% de probabilidade (IC) e a equação de regressão gerando os valores de *probit*, que corresponde a uma função linear de dose.

Os resultados apresentados pelo programa POLO-PC para o composto 2 no intervalo de 24 horas, indicam que os dados se ajustaram ao modelo de *probit*, com valor de qui-quadrado (χ^2) = 8,5 não apresentando diferença significativa, embora os dados não tenham apresentado significância no intervalo de confiança $g \leq 0,5$, ou seja, os dados não foram suficientes para o cálculo da CL_{50} . No intervalo de 48 horas, os dados não se ajustaram ao modelo de *probit*, com $\chi^2 = 25$ com diferença significativa, o programa utilizou a heterogeneidade como fator de correção dos dados.

A análise dos dados para o composto 3 nos intervalos de 24 e 48 horas, indicam que os dados se ajustaram ao modelo de *probit*, com valor de $\chi^2 < 1,15$ não apresentando diferenças significativas e intervalo de confiança $g < 0,5$. Os dados para imidacloprido indicam ajuste ao modelo de *probit*, com valor de $\chi^2 < 0,4$ sem diferenças significativas e intervalo de confiança $g < 0,5$.

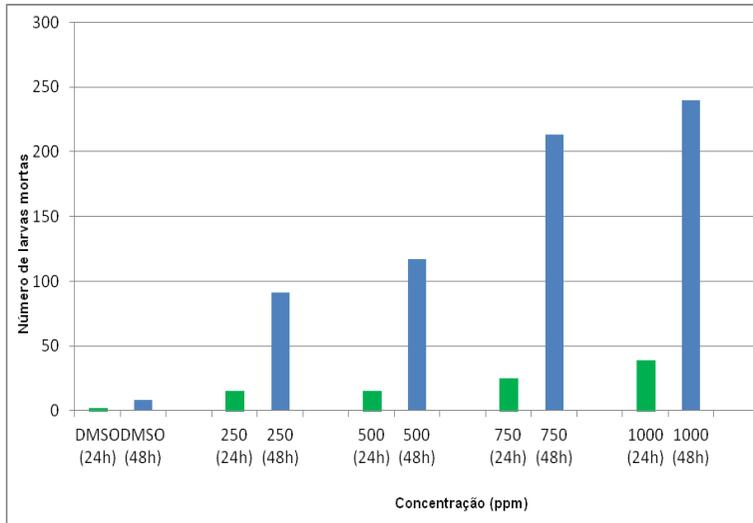
Tabela 18: Cálculo CL_{50} para os diferentes compostos.

Produto	Leitura	CL50 (ppm)	g	χ^2	Equação de regressão
		IC 95%			$y = (\alpha + 5) + b \log x$
Composto 2	24h	n.s	11,2	8,5	$y = (-3,49 + 5) + 0,73 \cdot \log x$
	48h	503	1,37	25	$y = (-6,58 + 5) + 2,43 \cdot \log x$
Composto 3	24h	n.s.	0,29	1,15	$y = (-5,05 + 5) + 1,24 \cdot \log x$
	48h	n.s	0,34	0,4	$y = (-2,76 + 5) + 0,65 \cdot \log x$
imidacloprido	24h	0,15 (0,14-0,17)	0,02	0,4	$y = (1,74 + 5) + 2,18 \cdot \log x$
	48h	0,07 (0,06-0,08)	0,03	0,3	$y = (2,72 + 5) + 2,44 \cdot \log x$

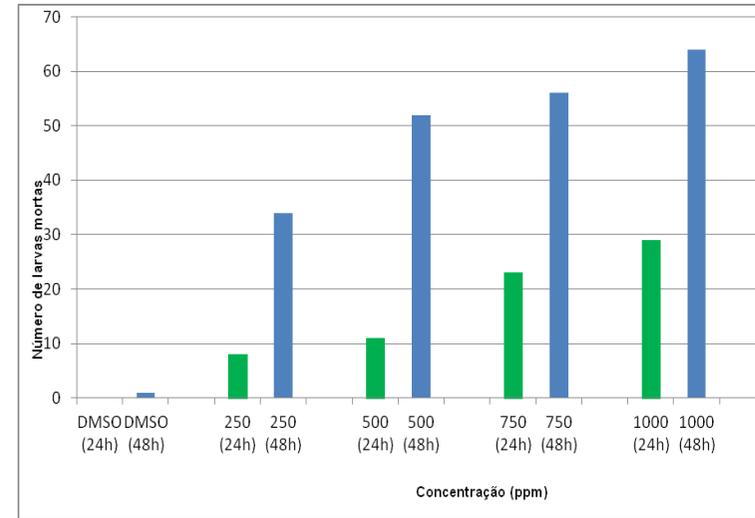
A mortalidade das larvas em todas as concentrações testadas estão dispostas nos gráficos da Figura 37 (A,B e C). Para os três compostos observa-se diferenças entre os dados de mortalidade.

Para o composto 2 a mortalidade observada no intervalo de 24 horas foi menor quando observadas no intervalo de 48 horas, sendo maior nas concentrações mais elevadas de 750 e 1000 ppm, no intervalo de 48 horas. Enquanto que o composto 3 apresentou baixos valores de mortalidade quando comparado ao composto 2.

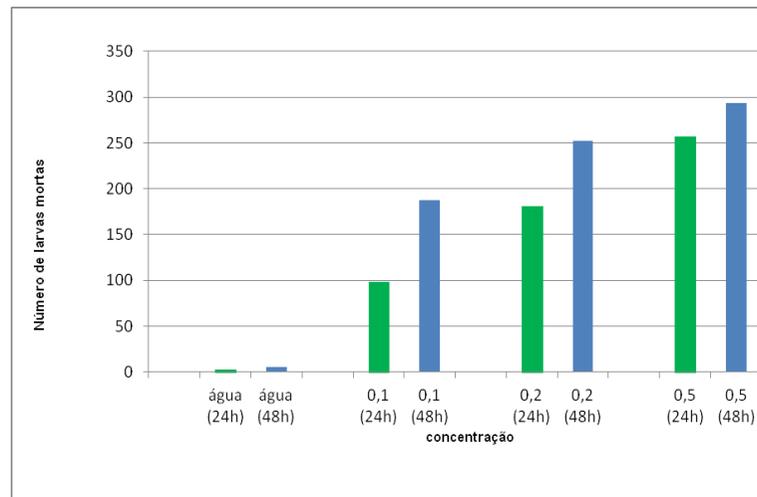
Em comparação ao imidacloprido, a mortalidade das larvas foi observada para todas as concentrações testadas, não havendo diferenças significativas entre os intervalos de leitura. O produto mostrou-se altamente efetivo com valores de inibição satisfatórios (84-98%) contra as larvas de *A. darlingi*.



(A)



(B)



(C)

Figura 37: Representação gráfica da mortalidade das larvas para o composto 2 (A), composto 3 (B) e imidacloprido (C) nas diferentes concentrações.

Embora os compostos tenham apresentado diferentes taxas de mortalidade nas concentrações avaliadas, as larvas utilizadas nos bioensaios tanto para os produtos sintetizados como para o produto comercial, mostraram redução dos movimentos natatórios durante as primeiras 24 horas do início dos testes para os produtos sintetizados, e de 12 horas para o produto comercial.

As Figuras 38 (A, B e C) mostram os aspectos morfológicos observados nas larvas após a mortalidade nos diferentes compostos. É possível observar um alongamento da região entre a cabeça e o tórax, apresentando dificuldades de sustentação da região cefálica para locomoção.

A maioria das larvas permaneciam no fundo do recipiente, após a interrupção de todos os movimentos as larvas apresentavam-se na superfície da água com a cabeça voltada para o fundo. Tendo em vista, que para o imidacloprido esses aspectos foram visíveis nas primeiras 12 horas para a concentração de 0,5 ppm, para os compostos 2 e 3 após 24 - 48 horas de exposição nas diferentes concentrações avaliadas. A mudança de coloração das larvas foi observada apenas para o imidacloprido.



(A)



(B)



(C)

Figura 38: Aspecto morfológico das larvas após exposição do composto 2 (A), composto 3 (B) e imidacloprido (C).

Como os neonicotinóides têm-se destacado pela elevada atividade inseticida em diferentes modelos biológicos, outros produtos derivados desta classe ou mesmo os produtos já comercializados, vêm sendo avaliados quanto à atividade inseticida contra diferentes espécies que apresentam capacidade vetorial (KAGABU *et al.*, 1992; RAO *et al.*, 2008).

Os compostos sintetizados nesse estudo, ainda não descritos na literatura, foram avaliados quanto à atividade larvicida em *A. darlingi*, em comparação aos bioensaios larvicidas realizados para o produto comercial imidacloprido, a qual não há registros na literatura de testes do produto comercial com a espécie citada.

De acordo com os dados obtidos para os bioensaios larvicidas, as larvas de terceiro estágio mostraram-se susceptíveis aos produtos nas diferentes concentrações, exceto para o composto 1 que não apresentou atividade larvicida a níveis satisfatórios.

Por meio da análise estatística, foi possível calcular CL_{50} 503 ppm apenas para o composto 2, no intervalo de 48 horas. Embora o composto 3 tenha apresentado atividade larvicida, novos bioensaios com diferentes concentrações são necessários para o cálculo de CL_{50} , no intervalo de confiança estabelecido. Para os testes realizados com o produto comercial imidacloprido, os dados obtidos sugerem uma CL_{50} de 0,15 e 0,07 ppm, nos intervalos de 24 e 48 horas, respectivamente.

A maior susceptibilidade das larvas aos compostos 2 e 3, pode ser explicado em razão da presença do grupo hidroxila (OH) na molécula, em decorrência da ligação de hidrogênio que, ao interagir com os específicos receptores acetilcolinesterase das larvas, provocam forte interação eletrostática entre si, conseqüentemente promovendo o efeito de paralisia e morte. Assim como o outro composto que apresentou o substituinte molecular NO_2 , grupos derivados de compostos nitro contribuem para maior atividade inseticida por meio da interação com receptores biológicos, bem como as diferentes configurações que o produto pode apresentar, como relataram Yshaara *et al.* (2007); Hong-Fei *et al.* (2010) e Casida (2011).

5.6 Avaliação da atividade adulticida

Os compostos 2 e 3 foram selecionados para avaliação da atividade adulticida, conforme os dados obtidos nos bioensaios larvicidas.

Inicialmente foram realizadas análises de ultravioleta na região do visível (UV-vis.), para verificar se os compostos degradavam após a impregnação das garrafas. Os compostos

foram dissolvidos em acetona (solvente utilizado nos testes adulticidas) durante os intervalos de 0; 6; 8 e 12 horas, posteriormente analisados quanto as absorções no UV-vis. Muller (2009) verificou a degradação de compostos orgânicos por meio de análises de UV-vis. no comprimento de onda máximo λ 280, considerando o tempo total de 4 horas com leituras a cada 30 minutos.

A absorbância dos compostos avaliados quanto a degradação, utilizaram os comprimentos de onda máximo λ 252 e λ 237 nm para os compostos 2 e 3, respectivamente. Na Tabela 19 observam-se as principais absorções do UV-vis para os produtos.

Para o composto 2 foi possível verificar o decréscimo na variação de absorbância, indicando que possivelmente o solvente se coordenou com o composto modificando a estrutura e alterando a posição das bandas. Enquanto que para o composto 3, foi observado um acréscimo na variação de absorbância, indicando que a estrutura do composto não foi alterada, quando avaliado o comprimento de onda mais elevado, em virtude da maior absorção de energia no espectro.

Tabela 19: Absorbância dos compostos 2 e 3 nas frequências de 252 e 237nm, respectivamente.

Composto 2			Composto 3		
Período horas	Absorbância λ	Frequência Nanômetro	Período horas	Absorbância λ	Frequência nanômetro
0	1,601	251,5	0	0,863	237
6	1,481	252	6	0,974	237
8	1,478	252	8	0,917	237
12	1,43	252	12	0,987	236,5

Porém, mesmo o composto 2 apresentando relativa degradação de parte da molécula, o produto foi avaliado quanto à atividade adulticida.

A atividade adulticida dos compostos 2 e 3 contra fêmeas adultas de *A. darlingi* foram avaliada nas dosagens de 25, 50, 75 e 100 μ g. Os resultados mostraram que, os dois compostos não apresentaram susceptibilidade no intervalo de 90 minutos de exposição às garrafas impregnadas, e mesmo após 24 horas de exposição não houve mortalidade.

A atividade adulticida do imidacloprido foi avaliada nas dosagens de 0,025; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,5 μ g. Estes valores foram selecionados de acordo com a dose recomendada pelo fabricante para moscas brancas (*Bemisia tabaci*), pertencente à ordem Diptera. Assim, para cada 100.000.000 cm² recomenda-se a aplicação de 160 g de ingrediente ativo (800 mL da

suspensão concentrada). Considerando que a área interna da garrafa corresponde a 264,4 cm², a dose do produto equivale a aproximadamente 0,4 µg.

De acordo com o gráfico apresentado na Figura 39, nas doses mais elevadas de 0,4 e 0,5 µg, o imidacloprido apresentou mortalidade de 100% no intervalo de 30 minutos. Para a dose mais baixa (0,025µg), observa-se mortalidade de 100% dos adultos a partir de 75 minutos de exposição às garrafas impregnadas. No entanto, foi registrado para todas as concentrações avaliadas, o efeito “knockdown” nos mosquitos.

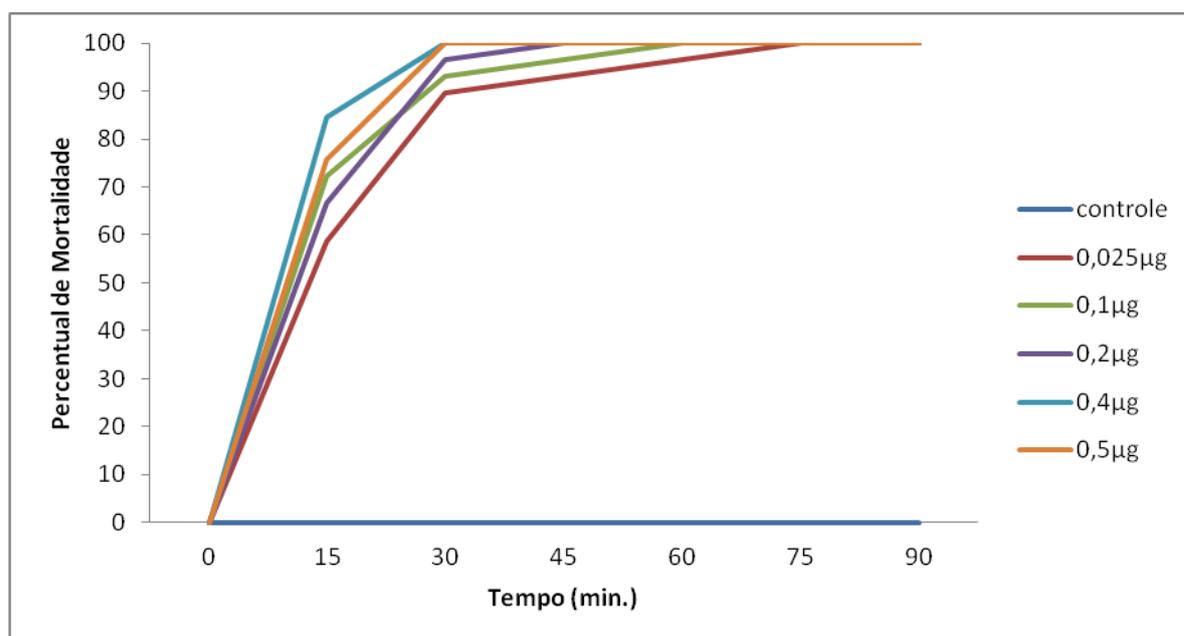


Figura 39: Percentual de mortalidade dos mosquitos adultos para o imidacloprido.

Os resultados obtidos para os compostos 2 e 3 indicam que os produtos não apresentaram atividade adulticida nas dosagens avaliadas no experimento, necessitando de novos testes com concentrações mais elevadas. Além disso, as características físicas e químicas contribuem para a modulação do sítio ativo nos receptores biológicos, levando em consideração que os produtos sintetizados apresentaram relativa dificuldade de solubilização em solvente acetona, em decorrência da provável formação de subprodutos nas reações.

Entretanto, os resultados preliminares obtidos para a mortalidade de *A. darlingi*, para o produto comercial, indicam o potencial adulticida do produto comercial imidacloprido, até então utilizado no combate a insetos e pragas da agricultura (ELBERT *et al.*, 2008; JESCHKE 2010). Além do mais, a variação dos substituintes da cadeia contribui para as interações moleculares do produto com o sítio ativo dos receptores. Tendo em vista que o imidacloprido possui em seu farmacóforo uma estrutura de nitroguanidina, que confere elevada atividade

inseticida seguida de grupos nitroiminas e cianoiminas, como afirmam Kagabu (2008) e Kanne *et al.* (2005).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com a síntese dos compostos, além de suas respectivas análises espectroscópicas, permitiram verificar que não foi possível obter o ácido cloronicotínico como produto intermediário do processo de síntese, por meio da reação de oxidação com permanganato de potássio. Entretanto, as análises sugerem a formação de três compostos denominados: 3-ácido piridinacarboxílico 6-cloro 2-carbotioamida hidrazina (1); 3-hidroxipiridina 6-cloro 2-aminotiometil hidrazina (2) e possíveis isômeros de 5-nitrobenzoil 3-ácido piridinacarboxílico 6-cloro 2-carbotioamida hidrazina (3) nas posições *orto*, *meta* e *para* do anel aromático. Entretanto, será necessário realizar análises cromatográficas a fim de determinar o grau de pureza das amostras, para novos testes biológicos.

Nos bioensaios seletivos, as larvas de terceiro estágio de *A. darlingi* mostraram-se susceptíveis aos compostos 2 e 3, nas concentrações acima de 250 ppm. Para o imidacloprido, as larvas foram altamente susceptíveis em concentrações mais baixas (0,5 – 4 ppm), com percentual de mortalidade variando de 90-100%.

Contudo, foi possível definir a CL₅₀ para o composto 2 - 503 ppm, no intervalo de 48 horas, e CL₅₀ de 0,17 e 0,07 ppm, respectivamente nos intervalos de 24 e 48 horas, para o produto comercial imidacloprido. Conforme os dados, há necessidade de sintetizar mais produtos e realizar novos bioensaios para definir os valores de CL₅₀ no intervalo de 24 horas para o composto 2 e, em ambos os intervalos para o composto 3. Nos experimentos com os bioensaios de dose, que demandam maior número de repetições, maiores quantidades de produtos sintetizados serão necessários.

Nos testes de prova de garrafa, modelo CDC, não ocorreu mortalidade dos adultos nas concentrações avaliadas para os produtos sintetizados. Enquanto que para o imidacloprido, registrou-se mortalidade de 100 % dos mosquitos nas concentrações de 0,4 e 0,5 µg, no intervalo de 30 minutos. Estes resultados são indicativos de que o imidacloprido constitui um inseticida em potencial no combate aos mosquitos. Contudo, será necessário sintetizar mais produtos e realizar novos testes para concentrações mais elevadas, para então definir os valores de CL₅₀, dos compostos sintetizados.

Neste trabalho buscou-se a síntese de novos produtos derivados de neonicotinóides, com atividade inseticida, em razão da inexistência de estudos desta classe para serem utilizados em programas de saúde pública. Vale ressaltar que os produtos sintetizados

constituem moléculas inéditas, ainda não descritas na literatura. O objetivo maior deste estudo foi a busca de novas moléculas bioativas que apresentem atividade inseticida, ao modelo biológico descrito, com aplicação em atividades de controle de insetos vetores de doenças tropicais.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of the insecticide. *Journal of Economic Entomologic*, 18: 265-267.
- Alberto, L. A.; Gallardo, R. L. 2005. Química e ecotoxicología de los insecticidas. In: Botello, A.V.; Osten, J.R.; Gold-Bouchot, G.; Agraz-Hernandez, C. (Eds). *Golfo de Mexico Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. 2 ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Campeche, 696pp.
- Arantes, F. C. C. 2009. *Síntese, caracterização e investigação da atividade biológica de complexos de cobre e paládio contendo ligantes N, S doadores*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química / Universidade Estadual Paulista, São Paulo, São Paulo. 97pp.
- Barata, R. de C. B. 1995. Malária no Brasil: panorama epidemiológico na última década. *Caderno de Saúde Pública*, 11(1):128-136.
- Bastos, A. M. B. 2004. *Investigação de algumas semicarbazonas e tiosemicarbazonas: estudos por RMN reatividade insulino mimética, antimicrobiana e mimetizadora da superóxido dismutase de complexos metálicos*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 240 pp.
- Basu, A.; Gayen, S.; Samanta, S.; Panda, P.; Srikanth, K.; Jha, T. 2006. QSAR modeling of neonicotinoid insecticides for their selective affinity towards *Drosophila* nicotinic receptors over mammalian $\alpha_4\beta_2$ receptors. *Canadian Journal Chemistry*, 84: 458–463.
- Becker, N.; Petric, D.; Zgomba, M.; Boase, C.; Madoon, M.; Dahl, C.; Kaiser, A. 2003. *Mosquitoes and their control*. University of Heidelberg, Germany. 565pp.
- Beraldo, H; Bastos, A. M. B.; Vieira, R, P. ; Rebolledo, A. P. ; Speziali, N. ; Pinheiro, C. B. ; Chapius, G. 2003. Structural studies and spectral characteristics of 4- benzoylpyridine thiosemicarbazone and N (4)-phenyl-4-benzoylpyridine thiosemicarbazone. *Journal of Molecular Structure*, 645: 213-220.
- Beraldo, H. 2004. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Química Nova*, 27(3): 461-471.
- Boechat N.; Lages, A.; Kover, W. B.; Wardell, S.M. S. V.; Skakle, J.M. S. 2006. 1-(4-Nitrobenzoyl) thiosemicarbazide monohydrate: a three-dimensional hydrogen-bonded framework structure. *Acta Crystallographica*, 62: 2563–2565.
- Black, G.; Depp, E.; Corson, B. B. 1948. Oxidation of certain methylpyridines to pyridine carboxylic acids. *Journal Organic Chemistry*, 14(1): 14-21.
- Braga, I. A.; Valle, D. 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Rev. Epidemiologia e Serviços em Saúde*, 16(4): 279-293.
- Braibante, M. E. F.; Zappe, J. A. 2012. A química dos agrotóxicos. *Revista Química Nova*, 34(1): 10-15.

Brogdon, W.G.; Mcallister, J. C. 1998. Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4): 605-613.

Buckingham S.D.; Lapied, B.; Le Corrond, H.; Grolleau F.; Sattelle D. B. 1997. Imidacloprido actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *The Journal of Experimental Biology*, 200: 2685–2692.

Carvalho, N. L.; Perlin, R. S.; Costa, E. C. 2011. Thiametoxam em tratamento de sementes. *Revista Eletrônica do PPGEAmb-CCR/UFSM*, 2 (2): 158 – 175.

Casas, J. S.; García-Tasende, M. S.; Sordo, J. 2000. Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazone: A structural review. *Coordination Chemistry Reviews*, 209:197-261.

Casida, J. E. 2011. Curious about pesticide action. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 59: 2762–2769.

Casida, J. E.; Quistad, G.B. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future. *Annual Review Entomological*, 43: 1–16.

Casida, J. E.; Quistad, G.B. 2004b. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chemical Research Toxicology*, 17 (8): 983-998.

Casida, J. E.; Quistad, G.B. 2004a. Why insecticides are more toxic to insects than people: the unique toxicology of insects. *Journal of Pesticide Science*, 29: 81–86.

Consoli, R. A. G. B.; Lourenço de Oliveira, R. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*, Rio de Janeiro: Fiocruz. 228pp.

Coosemans, M.; Carnevale, P. 1995. Malaria vector control: A critical review on chemical methods and insecticides. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 75: 13-31.

Coura, J. R.; Mutis, M. S., Andrade S. L. 2006. A new challenge for malaria control in Brazil: Asymptomatic Plasmodium Infection - A review. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. 101: 229-237.

Crans, D.C. 2000. Chemistry and insulin-like properties of vanadium (IV) and vanadium(V) compounds. *Journal Inorganic Biochemistry*, 80:123-231.

Crinnion, W. J. 2000. Environmental medicinal part 4: pesticides – biologically persistent and ubiquitous toxins. *Alternative Medicine Review*, 5(5): 432-447.

D`Amatto, C.; Torres, J.P.M.; Malm, O. 2002. DDT (Dicloro Difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. *Química Nova*, 25(06): 995-1002.

Deane, L. M. 1989. A cronologia da descoberta dos transmissores da malária na Amazônia brasileira. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 81:149-156.

Deane, L. M.; Causey, O. R.; Deane, M. P. 1948. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública*, 1(4): 827 - 965.

Deane, L. M. 1986. Malaria vectors in Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 81: 5-14.

Dimmock, J. R.; Vashishtha, S. C.; Stables, J. P. 2000. Anticonvulsant properties of various acetylhydrazones, oxamoylhydrazones and semicarbazones derived from aromatic and unsaturated carbonyl compounds. *Europe Journal of Medicine Chemistry*, 35: 241-248.

Durán, N.; Mattoso, L. H. C.; Morais, P. C. de. 2006, *Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*, Editora Artliber, São Paulo. 208 pp.

Dulmage, H. T.; Yousten, A. A.; Singer, S.; Lacey, L.A. 1990. Guidelines for productions of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. UNDP/World Bank/WHO Steering *Committed to Biological Control of Vectors*, Geneva, 59pp.

Elbert, A.; Haas, M.; Springer, B.; Thielert, W.; Nauen, R. 2008. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science*, 64: 1099–1105.

Elbert, A.; Nauen, R.; Leicht, W. 1998. Imidacloprid, a novel chloronicotinyl insecticide, biological activity and agricultural importance. *In*. Ishaaya, I.; Degheele, D. (Eds). *Springer*. New York, USA. p. 59-73.

Elbert, A.; Nauen, R. 2004. New applications for neonicotinoid insecticides using Imidacloprid as an example. *In*. Horowitz, A. R.; Ishaaya, I. (Eds). *Springer*. Berlin–Heidelberg–New York. p. 29–44.

Esteves-Souza, A.; Echevarria, A.; Sant'anna, C. M. R.; Nascimento, M. G. 2004. Estudo experimental e teórico da redução de bases de schiff derivadas da 3,3- difenilpropilamina. *Revista Química Nova*, 27: 72-75.

Ferraz, K.S. de O. 2008. *Estudos de citotoxicidade e ação antimicrobiana de tiossemicarbazonas derivadas de piridina: efeitos da coordenação a metais*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 131pp.

Finney, D.J. 1971. *Probit analysis*. Cambridge University Press Cambridge, England. 333pp.

Fleming, T. 1991. *Comprehensive Organic Synthesis*. (Eds). Pergamon Press, Oxford, UK. 779pp.

Floore, T. G. 2006. Mosquito Larval Control Practices: Past and Present. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(3): 527–533.

Forattini, O.P. 2002. *Culicidologia médica*, Vol II. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 860pp.

Ford, K.A.; Casida, J. E. 2006. Chloropyridinyl neonicotinoid insecticides: diverse molecular substituents contribute to facile metabolism in mice. *Chemistry Research Toxicology*, 19: 944-951.

Gorham, J.R.; Stojanovick, C.J.; Scott, H.G. 1967. *Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamérica Oriental*. Washington DC: U.S. Department of Health, Education & Welfare.

Guedes, R. N. C. 2007. Mecanismo de ação de inseticidas. (<http://www.illac-br.org.br>). Acesso: 19/03/2011.

Hochman, G.; Mello, M. T. B. de; Santos, P. R. E. dos. 2002. A malária em foto: imagens de campanhas e ações no Brasil da primeira metade do século XX. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 9:233-273.

Hong-Fei B.; Si-Jia X.; Li, L.; Xiao, X.; Xu-Bo, M.; Ding-Rong, Y. 2010. Synthesis and crystal structure of the optical activity of (Z)-nitromethylene neonicotinoid analogue. *Chinese Journal Structure Chemistry*, 29 (11): 1707-1711.

Hsiao, S. H.; Chen, C. W.; Liou, G. S. 2004. Novel aromatic polyamides bearing pendent diphenylamino or carbazolyl groups. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 42: 3302-3313.

Ibrahim, G.; Khan, M.A.; Richomme, P.; Benali-Baitich, O.; Bouet, G. 1997. Synthesis and characterization of metallic complexes of 3-(2-furyl) 2-propenal semicarbazone with *d* element dihalides. *Polyhedron*, 16(19): 3455-3461.

Ishaara, M.; Shimomura, M.; Ishida, C.; Nishiwaki, H.; Akamatsu, M.; Sattelle D. B.; Matsuda, K. 2007. A hypothesis to account for the selective and diverse actions of neonicotinoid insecticides at their molecular targets, nicotinic acetylcholine receptors: catch and release in hydrogen bond networks. *Invert Neuroscience*, 7: 47-51.

Jeschke, P.; Nauen, R. 2008. Neonicotinoids – from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science*, 64: 1084-1098.

Jeschke, P.; Nauen, R.; Schindler, M.; Elbert, A. 2010. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 59: 2897-2908.

Júnior, C. V. 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, 26(3): 390-400.

Kagabu, S. 2008. Pharmacophore of neonicotinoid insecticides. *Journal Pesticide Science*, 33 (1): 9-13.

Kagabu, S.; Moriya, K.; Shibuya, K.; Hattori, Y.; Tsuboi, S.; Shiokawa, K. 1992. 1-(6 halonicotinyl) 2-nitromethylene – imidazolidines as potential new insecticides. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 56 (2): 362-363.

Kaneko, H. 2011. Pyrethroids: mammalian metabolism and toxicity. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 59: 2786-2791.

- Kanne, D. B.; Dick, R. A.; Tomizawa, M.; Casida, J.E. 2005. Neonicotinoid Nitroguanidine Insecticide Metabolites: Synthesis and Nicotinic Receptor Potency of Guanidines, Aminoguanidines, and Their Derivatives. *Chemistry Research Toxicological*, 18: 1479-1484.
- Kovala-Demertzi, D.; Demertzi, M. A.; Varagi, V.; Papageorgiou, A.; Mourelatos, D.; Mioglou, E.; Iakovidou, Z.; Kotsis, A. 1998. Antineoplastic and cytogenetic effects on platinum and palladium complexes with pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone. *Chemotherapy*, 44: 421-426.
- Kovganko, N. V.; Kashkan, Z. N. 2004. Advances in the synthesis of neonicotinoids. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 40(12): 1709-1726.
- Kristoff, G.; Cacciatore, L. C.; Guerrero, N. R. V.; Cochón, A. C. 2011. Effects of the organophosphate insecticide azinphos-methyl on the reproduction and cholinesterase activity of *Biomphalaria glabrata*. *Chemosphere*, 84(1): 585-591.
- Krumlinde, P.; Bogar, K.; Backvall, J. 2009. Synthesis of a neonicotinoid pesticide derivative via chemoenzymatic dynamic kinetic resolution. *Journal Organic Chemistry*, 74: 7407-7410.
- Lalita, A. S.; Dhakarey, R.; Saxena. 1996. Magnetic and spectral behaviour of semicarbazone derivatives of manganese (II), copper (II), iron (III) and chromium (III) and their antimicrobial screening. *Journal Indian Chemistry Society*, 73: 339-342.
- Leora Software. 1987. *POLO-PC: A user's guide to Probit or Log analysis*. Berkeley, CA.
- Leite, A.C.L.; Santos, L.M.F. Dos; Nascimento, D.D.S. do; Sena, K. X. Da F. R.; Brondani, D.J. 2004. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de derivados peptidomiméticos da tiossemicarbazida e da tiazolinona. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, 23 (2): 117-22.
- Loiola, C. C. P.; Silva, C. J. M. da; Tauil, P. L. 2002. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. *Revista Panamericana Salud Publica/Panamerican Journal Public Health*, 11(4): 235-244.
- Lourenço-de-Oliveira, R.; Guimarães, E. da G.; Arlé, M.; Silva, T. F. da; Castro, M. G.; Motta, M. A.; Deane, L. M. 1989. *Anopheles* species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondonia state, amazon region of Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 84(4): 501-504.
- Maciel, M. A. M.; Echevarria, A.; Rumjanek, V. M. 1998. Isolamento e caracterização de acil- tiossemicarbazidas como intermediários na síntese de compostos mesoiônicos. *Química Nova*, 21(5): 569-572.
- Martinez-Torres D.; Chandre, F.; Williamson, M. S.; Darriet, F.; Bergeâ, J. B.; Devonshire, A. L.; Guillet, P.; Pasteur, N.; Pauron, D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*, 7(2): 179-184.

Matsuda, K.; Buckingham, S. D.; Kleier, D.; Rauh, J. J.; Grauso, M.; Sattelle, D. B. 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(11): 573-580.

Millar, N. S.; Denholm, I.; 2007. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invert Neuroscience*, 7: 53-66.

Ministério da Saúde. 2001. Fundação Nacional de Saúde. Manual de terapêutica da malária. Brasília, Distrito Federal. 104 pp.

Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde. 2006. Ações de controle da Malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, Distrito Federal. 52pp.

Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde. 2010. Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil. Serie A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, Distrito Federal. 36pp.

Mohamed, F.; Gawarammana, I.; Robertson, T. A.; Roberts, M. S.; Palangasinghe, C.; Zawahir, S.; Jayamanne, S.; Kandasamy, J.; Eddleston, M.; Buckley, N. A.; Dawson, A. H.; Roberts, D. M. 2009. Acute human self-poisoning with imidacloprid compound: A neonicotinoid insecticide. *Plos one*, 4 (4): e5127.

Moreira, M.D.; Picanço, M.C.; Silva, E.M.; Moreno, S.C.; Martins, J.C. 2006. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. In: Venson, M.; Paula Júnior, T.S.; Pallini, A. (Eds). *Controle alternativo de pragas e doenças*. Viçosa: EPAMIG/CTZM. p. 89-120.

Muller, C. F. G.; 2009. *Avaliação de tecnologia avançada para tratamento de efluentes de curtume*. Dissertação de Mestrado. Centro Universitário Univates, Lajeado, Rio Grande do Sul. 66 pp.

Nunes, M. V.; Tajara, E. H. 1998. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. *Revista Saúde Pública*, 32(4): 372-383.

Oliveira-Ferreira J.; Lacerda, M.V.G.; Brasil, P.; Ladislau, J. L.B.; Tauil, P. L. Daniel-Ribeiro, C. T. 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal*, 9:115.

Pandeya, S. N.; Yogeewari, P.; Stables, J.P. 2000. Synthesis and anticonvulsant activity of 4-bromophenyl substituted aryl semicarbazones. *Europe Journal Medicine Chemistry*, 35: 879-886.

Paul, A.; Harrington, L. C., Scott, J. G. 2006. Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 43(1): 55-60.

Pennetier, C.; Costantini, C.; Corbel, V.; Licciardi, S.; Dabiré, R.K.; Lapied, B.; Chandre, F.; Hougard, J. M. 2008. Mixture for Controlling Insecticide- Resistant Malaria Vectors. *Emerging Infectious Diseases*, 14(11): 1707-1714.

Plapp, F. W.; Casida, J. E. 1958. Ion exchange chromatography for hydrolysis products of organophosphate insecticides. *Analytical Chemistry*, 30 (10): 1622-1624.

- Póvoa, M. M.; Silva, A. M. N.; Santos, C. C. B.; Segura, M. N. O.; Machado, R. L. D. 2000. Malaria transmission. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, 52 (4/5): 208-212.
- Póvoa, M.M.; Wirtz, R. A.; Lacerda, R. N. L.; Miles, N. A.; Warhurst, D. 2001. Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapá, amazon region, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96 (2):179-184.
- Proença, P.; Teixeira, H.; Castanheira, F.; Pinheiro, J.; Monsanto, P.V.; Marques, E. P. Vieira, D. N.; Two fatal intoxication cases with imidacloprid: LC/MS analysis. *Forensic Science International*, 153: 75–80.
- Pulman, D. A. 2010. Deltamethrin: the cream of the crop. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 59: 2770–2772.
- Rao, M. S.; Murty, U. S. N.; Gangadasu, B.; Raju, B. C.; Ramesh, C.H.; Kumar, S. B.; Rao, V. J. 2008. Larvicidal efficacy of neonicotinoid classes of compounds on *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Entomology*, 5(1): 45-50.
- Ribeiro, A. C. C.; Mella, E. A.C. 2007. Intoxicação ocupacional Por organofosforados – A importância da dosagem de colinesterase. *CESUMAR*, 9(2): 125-134.
- Rico, A.; Geber-Corrêa, R.; Campos, P. S.; Garcia, M. V. B.; Waichman, A. V.; Brink, P. J. V.D. 2009. Effect of parathion-methyl on amazonian fish and freshwater invertebrates: a comparison of sensitivity with temperate data. *Archive Environment Contaminant Toxicology*, 58: 765–771.
- Rose, R. I. 2001. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerging Infectious Diseases*, 7(1): 17-23.
- Rozendaal, J.A. 1997. *Vector control: Methods for use by individuals and communities*. World Health Organization. Geneva. 398p.
- Salehzadeh, A.; Jabbar, A.; Jennens, L.; Ley, S. V.; Annadurai, R.S.; Adams, R.; Strang, R. H.C. 2002. The effects of phytochemical pesticides on the growth of cultured invertebrate and vertebrate cells. *Pest Management Science*, 58: 268-276.
- Santos, M. A. T.; Areas, M. A.; Reyes, F.G. R. 2007. Piretróides: uma visão geral. *Alimentos e Nutrição*, 8(3): 339-349.
- Santos, P. A. Q. de O. 2004. *Reacções de Nitração: Transferência de Massa e Reacções Químicas*. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra, Portugal. 336pp.
- Schaefer C. H.; Mulla, S. 1980. Conventional and nonconventional chemicals for mosquito control. *California agriculture*.
- Secretaria de Vigilância e Saúde- SVS. 2005. O uso racional de inseticidas para o controle de vetores da malária. Nota Técnica. n. 187/2005. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=37754&janela=1. Acesso 08/07/12.

Silveira, A. C.; Rezende, D. F. DE. 2001. Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil. *Organização Pan-Americana da Saúde*, Brasília, Distrito Federal. 119pp.

Silverstein, R.M. Webster, F.X. 2000. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. Editora Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro. 460pp.

Simas, N. K.; Lima, E. DA C.; Conceição, S. DA R.; Kuster, R. M.; Filho, A. M. De O. 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Química Nova*, 27(1): 46-49.

Singh, B.; Sung, L. K.; Matusop, A.; Radhakrishnan, A.; Shamsul, S. S. G.; Cox-Singh, J.; Thomas, A.; Conway, D. J. 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*, 363:1017–24.

Singh, D.K.; Agarwal, R.A. 1986. Piperonyl butoxide synergism with two synthetic pyrethroids against *Lymnaea Acuminata*. *Chemosphere*, 15(4):493-498.

Sivep/Malária – Sistema de Vigilância Epidemiológica. 2011. ([http:// www.saúde.gov.br](http://www.saúde.gov.br)) Acesso 12/08/12.

Solomons, T. W. G.; Fryhle, G. B. 2005. *Química orgânica*. Vol. I. Editora Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro. 777pp.

Su, W.; Zhou, Y.; Ma, Y.; Wang, L.; Zhang, Z.; Rui, C.; Duan, H.; Qin, Z. 2012. N'-Nitro-2-hydrocarbylidenehydrazine carboximidamides: Design, synthesis, crystal structure, insecticidal activity, and structure– activity relationships. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 60: 5028–5034.

Suarez, M.F.; Quinones, M. L.; Palacios, J. D.; Carrillo, A. 1990. First Record of DDT Resistance in *Anopheles darlingi*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 6(1): 72-74.

Tadei, W. P.; Dutary-Thatcher, B. 2000. Malaria vectors in the brazilian amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo*, 42(2): 87-94.

Tadei, W. P.; Santos, J. M. M. Dos; Costa, W. L. S.; Scarpassa, V. M. 1988. Biologia de anofelinos amazônicos. XII ocorrência de espécies de *Anopheles*, dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes Rondônia. *Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo*, 30(3): 221-251.

Tadei, W. P.; Santos, J. M. M. dos; Scarpassa, V. M.; Rodrigues, I. B. 1993. Incidência, distribuição e aspectos ecológicos de espécies de *Anopheles* (Díptera: Culicidae) em regiões naturais e sob impacto ambiental da Amazônia brasileira. *In*: Ferreira, E.J.G.; Santos, G.M.; Leão, E.L.M.; Oliveira, L.A. (Eds). Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia, p. 167-196.

Tadei, W. P.; Santos, J. M. M.; Rodrigues, I. B.; Rafael, M. S. 2010. Laboratório de Vetores da Malária e Dengue. *In*: Ministério da Ciência e Tecnologia – MCT. Pesquisas e Ações em

Saúde nos Institutos de Pesquisa do Ministério da Ciência e Tecnologia. Brasília, Distrito Federal. 283pp.

Tadei, W. P.; Thatcher, B. D.; Santos, J. M. M.; Scarpassa, V. M.; Rodrigues, I. B.; Rafael, M. S. 1998. Ecological observations on *Anopheles* vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 59(2):325-335.

Taira, K.; Aoyama, Y.; Kawamata, M. 2006. Long QT and ST-T change associated with organophosphate exposure by aerial spray. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22: 40-45.

Tauil, P. L. 1985. A malária no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 1(1):71-111.

Tomizawa, M.; Casida J. E. 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Review Pharmacology Toxicology*, 45: 247-68.

Tomizawa, M.; Casida J. E. 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review Entomology*, 48: 339-64.

Tomizawa, M.; Zhang, N.; Durkin, K. A.; Olmstead, M. M.; Casida, J. E. 2003. The neonicotinoid electronegative pharmacophore plays the crucial role in the high affinity and selectivity for the *Drosophila* nicotinic receptor: An anomaly for the nicotinoid cation- π interaction model. *Biochemistry*, 42: 7819-7827.

Vogel, A.I.; 1971. *Química Orgânica – Análise Orgânica Qualitativa*. Vol. III. Editora Livros técnicos S/A, Rio de Janeiro. 145pp.

Ware, G.W. 2000. An introduction to insecticides. University of Minnesota. Disponível em <http://www.ipmworld.umn.edu/chapters/ware/htm>. Acesso 2/02/ 2011.

WHO. Organización Mundial de la Salud. 1970. Resistencia a los insecticidas y lucha contra los vectores. Ginebra. 150pp.

WHO. World Health Organization World. 1998. Malaria monitoring of insecticide resistance in malaria vectors. Cairo, Egito. 54pp.

WHO. World Health Organization World. 2011. Malaria report 2011: Global malaria programme. Geneva. 259pp.

Wileasn, D. M.; Suprunchuk, D. T. 1968. The infrared absorption spectra of thiosemicarbazide and related compounds: NH, and NH vibrations. *Canadian Journal of Chemistry*, 47:1087-1089.

Wu, I-W.; Lin, Ja-L.; Cheng, En-T. 2001. Acute poisoning with the neonicotinoid insecticide imidacloprid in *N*-methyl pyrrolidone. *Clinical Toxicology*, 39(6): 617-621.

Yamamoto, Y.; Tomizawa, M.; Saito ,T.; Miyamoto, T. Walcott, E. C.; Sumikawa, K. 1998. Structural factors contributing to insecticidal and selective actions of neonicotinoids. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 37: 24-32.

Yamamoto, Y.; Yabuta, G.; Tomizawa, M.; Saito, T.; Miyamoto, T.; Kagabu, S. 1995. Molecular mechanism for selective toxicity of nicotinoids and neonicotinoids. *Journal Pesticide Science*, 20:33-40.

Yang, C. P.; Siao, S. H. H., Hsu, M. F. 2002. Organosoluble and light-colored fluorinated polyimides from 4,4'-bis(4-amino-2-trifluoromethylphenoxy)biphenyl and aromatic dianhydrides. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry*, 40: 524–534.

Zaim, M.; Guillet, P. 2002. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends in Parasitology*, 18(4): 161-163.

Zerba E. 1988. Insecticidal activity of pyrethroids on insects of medical importance. *Parasitology Today*, 4 (7): 53-57.