

Avaliação Inseticida de Composições Químicas por Adição de Monoterpenos, Sesquiterpenos e Fenilpropanoides ao Dilapiol

Maria Érica Costa de Lima¹, Hoana Klicia Lopes Guimarães Oliveira²,
André Fabio Medeiros Monteiro³ e Murilo Fazolin⁴

¹Graduanda em Engenharia Agrônoma, Universidade Federal do Acre,
bolsista Pibic/CNPq na Embrapa, Rio Branco, AC.

²Graduanda em Ciências Biológicas, Instituto Federal do Acre,
bolsista Pibic/CNPq na Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

³Biólogo, mestre em Ecologia, analista da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

⁴Engenheiro-agrônomo, doutor em Entomologia, pesquisador da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

Resumo – As classes de compostos mais comuns que ocorrem nos óleos essenciais são de terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, etc.) e fenilpropanoides. Embora a bioatividade de óleos essenciais seja geralmente atribuída a alguns compostos majoritários como dilapiol, um fenômeno sinérgico entre metabólitos pode resultar em uma maior bioatividade em comparação com os componentes isolados. Informações sobre as relações mútuas de substâncias aromáticas contidas nos óleos essenciais podem ser importantes, particularmente no desenvolvimento de formulações de inseticidas botânicos ou na normalização do conteúdo de substâncias ativas que asseguram a eficácia biológica. Combinações específicas de compostos de ocorrência minoritária com o dilapiol, obtidas de forma artificial, poderão fornecer informações sobre a composição ideal do óleo essencial de *P. aduncum* (Oepa) para que seja possível a expressão do efeito inseticida máximo. Estudos demonstram que misturas binárias de compostos de óleos essenciais apresentam maior potencial inseticida quando comparadas com os compostos puros. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de 15 compostos aromáticos e suas combinações binárias com o dilapiol quanto à toxicidade, por contato tóxico e residual para larvas de terceiro instar da lagarta do cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, 1797).

Termos para indexação: dilapiol, óleo essencial, composição binária, inseticida.

Introdução

Os compostos de óleos essenciais possuem múltiplas propriedades relacionadas ao controle de insetos-pragas como toxicidade, repelência, deterrência alimentar e de oviposição (Pavela, 2009). Por serem substâncias voláteis, os óleos essenciais são de baixa persistência e se degradam no ambiente (Isman, 2000). Os compostos podem ser considerados substâncias com um risco mínimo para o ambiente e a saúde humana (Isman; Grieneisen, 2014), pois muitas das moléculas de óleos essenciais atuam nos receptores de octopamina dos insetos, e a falta desses receptores nos vertebrados contribui para maior seletividade dos óleos (Tripathi et al., 2009). Embora a bioatividade de óleos essenciais seja geralmente atribuída a alguns compostos majoritários como dilapiol, um fenômeno sinérgico entre metabólitos pode resultar em uma maior bioatividade em comparação com os componentes isolados (Hummelbrunner; Isman, 2001).

Estudos demonstram que misturas binárias de compostos de óleos essenciais apresentam maior potencial inseticida quando comparadas com os compostos puros (Laurin; Murray, 2001). O trabalho tem por objetivo avaliar essas combinações de compostos e poderá servir de referência na formulação de um produto comercial com uma composição determinada eficaz como inseticida de origem vegetal, mantendo os padrões de qualidade química exigidos pelo mercado de agroquímicos. De modo mais específico, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de 15 compostos aromáticos

e suas combinações binárias com o dilapiol quanto à toxicidade, por contato tópico e residual para larvas de terceiro instar da lagarta do cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, 1797).

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Acre, no município de Rio Branco entre os meses de setembro de 2017 e março de 2018. Em todos os bioensaios definitivos, larvas de terceiro instar da espécie *S. frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) foram obtidas por meio de uma criação artificial de insetos conforme metodologia proposta por Cruz (2000). Os fenilpropanoides dilapiol, safrol e sarisan foram obtidos por destilação fracionada de plantas de *Piper* spp. em laboratório, na sua forma purificada. Outros compostos (tetradecanol, α -pinene, aromadendreno, β -pinene, β -cariofileno, heptadecano, humuleno, metil-eugenol, miristicina, ocimeno, pentadecano, trans-cariofileno) foram adquiridos junto a Sigma Aldrich como padrões analíticos. Já o 1,8-cineol foi adquirido como componente majoritário na forma de óleo essencial de eucalipto da empresa Gran Oils. Inicialmente foram realizados testes preliminares com o propósito de determinar os padrões ideais dos seguintes fatores: tempo de exposição dos insetos aos compostos, volume do produto a ser utilizado e o número de insetos por tratamento.

Complementando os bioensaios preliminares foram obtidas faixas de resposta para o inseto teste, ou seja, os intervalos de concentrações de cada composto tomado de forma individualizada. Dentro dessa ampla faixa de concentração foram obtidas faixas mais estreitas de respostas, adotando-se a metodologia descrita por Finney (1971). Em seguida, foram estabelecidas entre cinco e sete concentrações de cada composto e das combinações com dilapiol, além de um controle (solvente acetona). Todas as concentrações foram usadas nos bioensaios definitivos de curva de mortalidade e determinação da concentração ou dose com probabilidade de causar 50% de mortalidade (CL_{50} e DL_{50}) para cada composto testado. Em todos os bioensaios definitivos, lagartas de *S. frugiperda*, no terceiro instar, foram confinadas isoladamente em placas de Petri e mantidas em câmara climatizada à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\% \pm 5\%$ e fotofase de 12h, até o momento da avaliação da mortalidade dos indivíduos. O tempo de exposição dos insetos aos tratamentos foi de 24h considerando-se a mortalidade cumulativa no período. A mortalidade foi considerada quando não houve resposta ao estímulo com pincel.

Bioensaios toxicológicos por contato residual foram realizados utilizando placas de Petri e papéis-filtro de 5,5 cm de diâmetro, sendo cada unidade impregnada com 0,2 mL das concentrações dos tratamentos a serem avaliados. Após total evaporação do solvente por cerca de 5 minutos em capela de exaustão de gases, os papéis-filtro já secos foram colocados nas placas previamente etiquetadas, que em seguida receberam as lagartas de *S. frugiperda*. Já os ensaios toxicológicos por contato tópico consistiram na aplicação dorsal no pronoto de *S. frugiperda* de 1,0 μL das concentrações dos diferentes tratamentos, sendo avaliados com auxílio de uma microseringa graduada. Nesse caso, os insetos já estavam individualizados nas placas de Petri. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Quatro replicações de 10 larvas de *S. frugiperda* foram avaliadas por dose.

Para todos os bioensaios dos compostos aromáticos individuais, tanto para o contato tópico como residual, os dados de mortalidade de concentração foram submetidos à análise de Probit, que foi realizada para estimar os valores de CL_{25} e DL_{25} dentro de limites de confiança de 95% associados para cada tratamento ou composto por meio do programa de análises estatísticas SAS (SAS Institute, 2001). Os valores de mortalidade foram corrigidos pela mortalidade da testemunha utilizando-se a fórmula $E\% = (T\text{ Tr}/T) \times 100$ (Abbott, 1925). A atividade inseticida dos compostos é considerada

significativamente diferente quando o intervalo de confiança a 95% da sua DL_{50} não se sobrepõe ao intervalo de confiança a 95% da DL_{50} de outro composto. Com a finalidade de determinar a forma de interação entre compostos, foram testadas combinações binárias de DL_{25} e CL_{25} do dilapiol com a DL_{25} e CL_{25} dos demais compostos em avaliação. Todas as combinações obedeceram à proporção de 1:1 (doses DL_{25} : DL_{25}).

A mortalidade do composto individual foi comparada com aquela dos tratamentos binários segundo o método de Hummelbrunner e Isman (2001). Para os compostos aromáticos utilizaram-se as concentrações tomadas na DL_{25} e CL_{25} , adicionando cada composto ao dilapiol, a fim de obter os valores percentuais de mortalidade conjunta. Em todos os casos foram utilizadas 100 larvas de terceiro instar de *S. frugiperda* para cada tratamento: $MC (\%) = (\%MO - \%Mt) / (100 - \%Mt) \times 100$, sendo $MC (\%)$ = percentual da morte corrigida; $\%MO$ = percentual da morte no tratamento; $\%Mt$ = percentual de morte no tratamento testemunha. As misturas binárias de compostos foram determinadas uma a uma, sempre considerando o dilapiol como o principal composto para cada combinação. A mortalidade observada foi comparada com a mortalidade esperada com base na seguinte fórmula: $E = Oa + Ob (1 - Oa)$, sendo E = a mortalidade esperada; Oa e Ob = as mortalidades observadas de compostos puros na concentração a 25% da sua dose letal. Os efeitos das misturas designados como antagônicos, aditivos, ou sinérgicos foram obtidos por meio de uma análise usando comparações teste de Qui-quadrado (X^2) = 3,84. Em uma combinação de valores em que $X^2 > 3,84$ e a mortalidade é maior que a mortalidade esperada, o efeito foi considerado sinérgico ou antagônico. O efeito aditivo foi definido quando o valor de $X^2 < 3,84$.

Resultados e discussão

Considerando-se os agrupamentos químicos dos compostos avaliados em função da média das CL_{50} obtidas, pode-se constatar que os fenilpropanoides apresentaram maior toxicidade para as lagartas de *S. frugiperda*, seguidos dos sesquiterpenos, monoterpênicos e alifáticos não terpênicos. No ensaio por contato tópico foram avaliadas 15 combinações binárias contendo dilapiol, das quais quatro mostraram efeito sinérgico: β -cariofileno, heptadecano, 1,8-cineol e tetradecanol. Aquelas que apresentaram efeitos antagônicos em combinação com dilapiol foram: aromadendreno, β -pineno, miristicina, ocimeno, pentadecano e β -cariofileno. No entanto, seis combinações não apresentaram efeito (safrol, sarisan, metileugenol, humuleno ou α -pineno).

Na exposição por contato residual nove combinações foram significativamente antagônicas (dilapiol com aromadendreno, β -pineno, heptadecano, metileugenol, ocimeno, pentadecano, safrol, sarisan e 1,8-cineol) e quatro combinações não apresentaram efeito (dilapiol com α -pineno, humuleno, β -cariofileno > 80% e β -cariofileno > 98,5%). Para o contato residual, não foram realizadas as avaliações de duas combinações (dilapiol com miristicina – em função da limitação da quantidade de produto – ou tetradecanol – em que a solução ultrapassava a concentração de 50% v/v e não causou mortalidade mesmo na concentração mais alta). Nenhuma combinação avaliada mostrou efeito sinérgico significativo.

Os fenilpropanoides foram mais tóxicos que os terpenos nas duas formas de exposição, à semelhança dos resultados obtidos por Morais et al. (2007) e Yatagai et al. (1998) quando constataram que os fenilpropanoides, enquanto constituintes majoritários, foram mais ativos que os terpenos contra larvas de *Aedes aegypti* (L., 1762) e adultos do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* Trouessart, 1897, respectivamente. Por outro lado, Simas et al. (2004) demonstraram que os sesquiterpenos oxigenados são mais efetivos enquanto larvicidas que fenilpropanoides e monoterpênicos.

Os maiores efeitos sinérgicos por contato tópico foram encontrados para combinações de dilapiol com tetradecanol, heptadecano, β -cariofileno e 1,8-cineol. Alguns trabalhos confirmam o efeito sinérgico desses compostos. O 1,8-cineol (ou eucaliptol) ao interagir com a camada lipídica da cutícula do inseto parece aumentar a penetração da cânfora (Tak; Isman, 2015). O β -cariofileno potencializa a atividade de outros compostos ao alterar a permeabilidade da membrana (Legault; Pichette, 2007). A aplicação tópica de um alifático não terpênico similar ao tetradecanol provocou um dano irreversível no desenvolvimento da cutícula de insetos da família dos triatomídeos (Cueto et al., 2005). Um modo similar de ação foi proposto para o efeito inseticida de álcoois alifáticos contra *Aedes* spp. por Sinniah (1983). Segundo esse autor, os álcoois alifáticos conseguiram penetrar nos ovos, larvas e pupas dos mosquitos, quebrando a composição lipídica.

Em relação aos antagonismos encontrados nas avaliações por contato tópico, há dificuldade em discuti-los diante da inexistência de estudos focados nas interações entre substâncias contidas nos OEs. O 1,8-cineol possui ação repelente e inseticida, principalmente para a barata-americana (*Periplaneta americana*), assim como larvicida e repelente ovipositivo para mosquitos (Tripathi; Mishra, 2016). Neste trabalho apenas o β -cariofileno > 80% apresentou efeito sinérgico quando combinado ao dilapiol. Provavelmente isso ocorreu em função da possível presença de outros sesquiterpenos (< 19%) na sua composição como o seu isômero α -humuleno (também conhecido como α -cariofileno). Uma maior eficácia de compostos combinados em relação a sua aplicação de forma isolada foi descrita por Legault e Pichette (2007): a presença elevada de α -humuleno aumentou a atividade anti-inflamatória, analgésica e anticancerígena do β -cariofileno. Há pesquisas mostrando ação sinérgica entre essas duas moléculas, que juntas atuam mais poderosamente que separadas, exemplo disso foi a constatação de atividade anticancerígena pronunciada da sinergia entre α -humuleno e β -cariofileno. No presente estudo, a combinação de alguns sesquiterpenos com o β -cariofileno aumentou a atividade inseticida do dilapiol.

A maioria das combinações binárias por contato residual foi antagônica. É possível que as interações antagonistas encontradas nesse modo de contaminação tenha alguma relação com a repelência exibida por alguns desses compostos. Segundo resultados de Plata-Rueda et al. (2018), os insetos reduzem suas taxas respiratórias após serem expostos a terpenos de óleos essenciais e evitam ou reduzem sua mobilidade nas superfícies tratadas com terpenos.

Existem trabalhos que reportam atividade repelente dos compostos β -pineno (Pajaro-Castro et al., 2017), α -pineno, safrol e metil-eugenol (Ngoh et al., 1998), 1,8-cineol (Inceboz et al., 2015.; Locke et al., 1987) e E- β -ocimeno (Chen; Wiemer, 1984). Pode-se inferir diante desses resultados que nas superfícies contaminadas com dilapiol combinado a outro composto ocorreu uma mudança de comportamento quando o inseto procurou evitar o contato com essa superfície e conseqüentemente se desvencilhou do composto mais tóxico. Caso essa hipótese seja verdadeira, haverá uma menor probabilidade da larva se contaminar caminhando sobre as superfícies contaminadas uma vez que será fortemente repelida pelo outro componente menos tóxico da combinação.

Conclusões

O uso de 1,8-cineol (monoterpeno), β -cariofileno > 80% (sesquiterpeno), tetradecanol e heptadecano (alifáticos não terpênicos) maximiza a ação inseticida do dilapiol por contato tópico. Na exposição das larvas de *S. frugiperda* por contato residual, nenhum dos compostos que foram combinados com o dilapiol apresentaram sinergia. Os compostos tetradecanol e β -cariofileno não demonstraram qualquer antagonismo na combinação com o dilapiol, independentemente da forma de exposição das larvas de *S. frugiperda*.

Agradecimentos

A todos os colaboradores do Laboratório de Entomologia da Embrapa Acre e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro por meio da bolsa de iniciação científica.

Referências

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265-267, 1925.
- CASTRO, N. P.; GALLARDO, C. K.; VERBEL, J. O. Neurotoxic effects of linalool and β -pinene on *Tribolium castaneum* herbst. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2052, 2017.
- CHEN, T. K.; WIEMER, D. F.; HOWARD, J. J. A volatile leafcutter ant repellent from *Astronium graveolens*. **Naturwissenschaften**, v. 71, n. 2, p. 97-98, 1984.
- CRUZ, I. Métodos de criação de agentes entomófagos de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). In: BUENO, V. H. P. (Ed.). **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: UFLA, 2000. p.111-135.
- CUETO, G. M.; ZERBA, E.; PICOLLO, M. I. Biological effect of 1-dodecanol in teneral and post-teneral *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 59-61, 2005.
- FINNEY, D. J. **Probit analysis**. London: Cambridge University, 1971. 33 p.
- HUMMELBRUNNER, L. A.; ISMAN, M. B. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 715-720, 2001.
- INCEBOZ, T.; ERKAN, G.; TURKOGLU, G. C.; SARIISIK, A. M.; BAKIRCI, S.; UNER, S.; UNER, A. In-vivo and in-vitro tick repellent properties of cotton fabric. **Textile Research Journal**, v. 85, n. 19, p. 2071-2082, 2015.
- ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, p. 603-608, 2000.
- ISMAN, M. B.; GRIENEISEN, M. L. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 3, p. 140-145, 2014.
- KLOCKE, J. A.; DARLINGTON, M. V.; BALANDRIN, M. F. 1, 8-Cineole (Eucalyptol), a mosquito feeding and ovipositional repellent from volatile oil of *Hemizonia fitchii* (Asteraceae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 13, n. 12, p. 2131-2141, 1987.
- LAURIN, A. H., MURRAY, B. I. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 49, p. 715-720, 2001.
- LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 12, p. 1643-1647, 2007.
- MORAIS, S. M.; FACUNDO, V. A.; BERTINI, L. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; ANJOS JÚNIOR, J. F. dos; FERREIRA, S. A.; BRITO, E. S.; SOUZA NETO, M. A. de. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 10, p. 670-675, 2007.

NGOH, S. P.; CHOO, L. E. W.; PANG F. Y.; HUANG, Y.; KINI, M. R.; HO, S. H. Insecticidal and repellent properties of nine volatile constituents of essential oils against the American cockroach, *Periplaneta americana* (L.). **Pesticide Science**, v. 54, n. 3, p. 261-268, 1998.

PAJARO-CASTRO, N.; CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J. Neurotoxic effects of linalool and β -pinene on *Tribolium castaneum* herbst. **Molecules**, v. 22, p. 2-12, 2017.

PAVELA, R. Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 2, p. 311-315, 2009.

PLATA-RUEDA, A.; CAMPOS, J. M.; DA SILVA ROLIM, G.; MARTÍNEZ, L. C.; DOS SANTOS, M. H.; FERNANDES, F. L.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Terpenoid constituents of cinnamon and clove essential oils cause toxic effects and behavior repellency response on granary weevil, *Sitophilus granarius*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 263-270, 2018.

SAS Institute. **User's guide**: statistics, version 8.2. 6th ed. Cary, NC, 2001.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. D. C.; CONCEICAO, S. D. R.; KUSTER, R. M.; OLIVEIRA FILHO, A. D.; LAGE, C. L. S. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue-atividade larvica de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 46-49, 2004.

SINNIAH, B. Insecticidal effect of aliphatic alcohols against aquatic stages of *Aedes* mosquitoes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 1, p. 35-38, 1983.

TAK, J. H.; ISMAN, M. B. Enhanced cuticular penetration as the mechanism for synergy of insecticidal constituents of rosemary essential oil in *Trichoplusia ni*. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12690, 2015.

TRIPATHI, A. K.; UPADHYAY, S.; BHUIYAN, M.; BHATTACHARYA, P. R. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 1, n. 5, p. 52-63, 2009.

TRIPATHI, A. K.; MISHRA, S. Plant monoterpenoids (prospective pesticides). In: ECOFRIENDLY pest management for food security. **Amsterdam**: Academic Press, 2016. p. 507-524.

YATAGAI, M.; OHIRA, T.; NAKASHIMA, K. Composition, miticidal activity and growth regulation effect on radish seeds of extracts from *Melaleuca* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, n. 7, p. 713-722, 1998.