

Avaliação de Frações do Óleo de *Piper aduncum* L. como Sinérgicas de Inseticidas Carbamatos e Espinosinas

Maria Érica Costa de Lima¹, Murilo Fazolin² e André Fábio Medeiros Monteiro³

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

²Engenheiro-agrônomo, doutor em Entomologia, pesquisador da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

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

Resumo – O óleo essencial de *Piper aduncum* L. (Oepa) é composto majoritariamente por dilapiol. Os constituintes de óleos essenciais são termossensíveis e a destilação fracionada a vácuo é o processo mais indicado, por proporcionar baixos pontos de ebulição da mistura, evitando a sua degradação. Na aplicação dessa técnica para a purificação do Oepa, há até seis frações em média, sendo duas delas ricas em terpenoides e obtidas nas primeiras fases do processo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia sinérgica das frações do Oepa, combinadas com os inseticidas químicos metomil (carbamato) e spinosad (espinosinas), por contato tópico e residual. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia da Embrapa Acre e, em todos os bioensaios, lagartas de terceiro instar de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) foram utilizadas. As frações de Oepa fenilpropanoicas apresentam efeito sinérgico por meio da ação combinada de seus constituintes para metomil e spinosad. A presença de fenilpropanoides, particularmente dilapiol, na composição química da fração foi fundamental na revelação do efeito sinérgico para os dois ingredientes ativos avaliados.

Termos para indexação: Piperaceae, pimenta-de-macaco, sinergismo, terpenos.

Introdução

Piperáceas como *Piper aduncum* L. são abundantes no estado do Acre. O processo de industrialização dessa espécie é semelhante ao utilizado para obtenção do óleo essencial rico em safrol a partir de *Piper hispidinervum* C. DC. (Fazolin et al., 2006). O óleo essencial de *P. aduncum* (Oepa) é composto por dilapiol (Fazolin et al., 2007), cuja estrutura química apresenta também o grupo metilendioxifenil ligado a dois grupos metoxila (OCH₃). Esse composto interfere nas funções do citocromo P-450 (P450s), esterases e glutathione S-transferase (GST) dos insetos. Durante essa interferência, ocorre a redução do processo de destoxificação, viabilizando a utilização do Oepa como inseticida e sinérgico de inseticidas convencionais (Nagababu; Lakshnmaiah, 1994).

Os compostos ou grupos presentes nas frações do óleo essencial encontram-se em uma mistura em concentrações diferentes, mas normalmente um deles é majoritário, enquanto os outros compostos são encontrados em menores teores, alguns em baixas quantidades, chamados de traços (Simões et al., 2003).

A ação do sinergista minimiza a quantidade de inseticida químico necessária para o controle de insetos, pois age como um substrato alternativo, interferindo negativamente na destoxificação. Pode ainda reagir com sítios do sistema enzimático, inibindo a excreção do inseticida (Casida, 1970). A posição dominante de butóxido de piperonila no mercado tem sido atribuída a diversos fatores, dentre os quais uma alta eficácia como sinergista das principais classes de inseticidas (piretroides, carbamatos, organofosforados e reguladores de crescimento de insetos) (Tozzi, 1999).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia sinérgica das combinações das frações do óleo essencial de *P. aduncum* ricas em monoterpenos e sesquiterpenos, com inseticidas químicos (carbamato e espinosinas), por contato tóxico e residual de larvas de terceiro instar da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia da Embrapa Acre, no município de Rio Branco, AC. Em todos os bioensaios, lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda*, criadas em laboratório em dieta artificial, foram utilizadas conforme metodologia proposta por Cruz (2000). Os componentes ativos metomil (carbamato) e spinosad (espinosinas) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich.

O óleo essencial de *P. aduncum* (Oepa) foi obtido utilizando o princípio de arraste de vapor em um sistema de caldeira aquecida a diesel, adaptada de Pimentel e Silva (2000), e redestilado por meio do sistema de retificação fracionada, utilizando coluna de recheio. O processo teve a duração de 4 horas e, a cada 15 minutos, houve coletas das frações para posterior estudo biológico e de caracterização química, sendo obtidas seis frações (F1, F4, F7, F9, F22 e F34). Para a identificação e quantificação dos constituintes químicos dessas frações, foram realizadas análises em cromatógrafo gasoso (detector DIC), acoplado ao espectrômetro de massa (CG-EM) (Marques et al., 2010).

As condições ambientais e inseto-alvo utilizado, a determinação das doses e concentrações letais, a montagem dos bioensaios toxicológicos por contato tóxico e a estatística experimental seguiram os protocolos descritos em Fazolin et al. (2017).

Bioensaios toxicológicos por contato residual foram realizados utilizando placas de Petri e papéis-filtros de 3,2 cm de diâmetro, sendo cada unidade impregnada, com auxílio da micropipeta, de 50 µL das concentrações dos tratamentos a serem avaliados. Após total evaporação do solvente em capela de exaustão de gases, os papéis-filtros já secos foram colocados nas placas previamente etiquetadas, que em seguida receberam as lagartas de *S. frugiperda*.

Para todos os bioensaios dos compostos individuais tanto por contato tóxico como residual os dados de mortalidade de concentração foram submetidos à análise de Probit, utilizando-se o programa de análises estatísticas SAS (SAS Institute, 2001) para determinar a CL_{50} e DL_{50} de cada composto. Os valores de mortalidade foram corrigidos pela mortalidade da testemunha, utilizando-se a fórmula de Abbott (1925).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Após a obtenção das DL_{50} e CL_{50} dos inseticidas ou das frações isoladamente, foram realizadas combinações de subdoses do ingrediente ativo (i.a.), inseticida com subdoses das frações do óleo essencial ou com o décuplo (dez vezes mais) de butóxido de piperonila. As subdoses de cada fração foram definidas como $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da DL_{50} e CL_{50} , respectivamente, uma vez que ainda não foram estabelecidas, para essas combinações sinérgicas, subdoses das frações com base em curvas de isobogramas.

O efeito sinérgico das combinações de ingrediente ativo inseticida + frações do Oepa foi avaliado em relação à combinação ingrediente ativo inseticida + butóxido de piperonila (PBO). Foi considerado significativo quando não se constatou sobreposição dos valores dos intervalos de confiança ($p < 0,05$) das CL_{50} ou DL_{50} das combinações dos inseticidas com as frações de Oepa, em relação às combinações dos mesmos inseticidas com butóxido de piperonila. Dessa forma, a metodologia

de avaliação toxicológica foi a mesma descrita para as frações e princípios ativos de inseticidas considerados isoladamente. A eficácia sinérgica das frações foi avaliada por meio do cálculo da razão de toxidez ou fator de sinergismo (FS), baseado em Guedes et al. (1995), ($FS = CL_{50}$ i.a. inseticida/ CL_{50} i.a. inseticida + fração ou butóxido de piperonila), revelando a potência relativa das combinações sinérgicas entre as concentrações letais (CL_{50}) dos i.a. inseticidas tomados isoladamente e as combinações desses com os sinérgistas.

Resultados e discussão

Apenas cinco subdoses de frações apresentaram efeitos sinérgicos significativos quando combinadas com o inseticida à base de espinosinas, por contacto tópico: F7 subdoses $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da DL_{50} , F22 subdoses $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da DL_{50} , F34 subdose $\frac{1}{4}$ da DL_{50} . Na exposição por contato residual das combinações do inseticida à base de spinosad com as subdoses das frações avaliadas, oito apresentaram efeito sinérgico significativo: F4 subdose $\frac{1}{4}$, F7 subdose $\frac{1}{2}$, F9 subdoses $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$, F22 subdoses $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ e F34 subdoses $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ das CL_{50} .

Apenas uma das frações apresentou efeitos sinérgicos significativos quando combinada com o inseticida à base de metomil por contato tópico: F4 subdose $\frac{1}{2}$ DL_{50} . Na exposição por contato residual das combinações do inseticida à base de metomil com as subdoses das frações do Oepa avaliadas, quatro apresentaram efeito sinérgico significativo: F7 $\frac{1}{2}$ da CL_{50} , F9 $\frac{1}{2}$ da CL_{50} , F22 $\frac{1}{2}$ da CL_{50} e F34 $\frac{1}{2}$ da CL_{50} .

Os significativos valores dos fatores de sinergismo (FS), observados por contato tópico para a combinação de subdose $\frac{1}{2}$ F4 com o inseticida metomil, podem estar relacionados ao efeito aditivo e não sinérgico causado pela ação inseticida de um ou mais desses monoterpenos, uma vez que, à semelhança dos inseticidas carbamatos, funcionam como neurotóxicos. Carbamatos são inibidores diretos da enzima acetilcolinesterase (Papa, 2008).

Uma hipótese para explicar a ausência de significância no FS para as frações terpênicas F1 e F4 com inseticida spinosad pode estar relacionada à diferença de seu modo de ação em relação aos inseticidas carbamatos como o metomil, embora a ação do spinosad esteja relacionada também aos distúrbios do sistema nervoso central dos insetos. Trata-se de um inseticida modulador alostérico dos receptores nicotínicos de acetilcolina. Essas moléculas moduladoras podem alterar a atividade da enzima acetilcolinesterase, tornando-a mais ativa, fazendo com que os impulsos nervosos sejam transmitidos de forma ininterrupta e descontrolada, induzindo o inseto à excitação, tremores contínuos, paralisação pela fadiga muscular e morte (Marques, 2018).

Com relação às frações mistas (F7 e F9), além dos terpenos em menores proporções, observa-se a ocorrência de teores de fenilpropanoides em valores acima de 20% em suas composições, o que pode ser considerado como uma das causas da manifestação do efeito sinérgico observado tanto para o inseticida spinosad como para a exposição residual do metomil. Nota-se que ocorreu uma diferença significativa dos resultados relacionada ao modo de contaminação para as diferentes combinações das frações com os dois inseticidas considerados.

Considerando que nas F7 e F9 ocorreu um significativo aumento nos teores de terpenoides, pode-se inferir que existe a possibilidade de que isso tenha ocasionado uma interferência positiva no efeito sinérgico, principalmente por contato tópico, para o inseticida spinosad.

No caso das frações fenilpropanoicas F22 e F34 os compostos majoritários dilapiol, miristicina e sarisan podem ser apontados como responsáveis pelo efeito sinérgico, uma vez que um considerável volume de avaliações experimentais indica esses compostos como inibidores de enzimas detoxificativas de insetos (Lichtenstein et al., 1974; Bernard; Philogène, 1993; Qin et al., 2010). As F22 e F34 do óleo essencial de *P. aduncum*, por possuírem como composto majoritário o dilapiol (82,0% e 92,1%, respectivamente), apresentam o potencial de inibir, além das monooxigenases P-450, outras importantes famílias de enzimas detoxificativas: esterases e glutatona-S transferases (Lichtenstein et al., 1974; Handa; Dewan, 1974; Mukerjee et al., 1979; Bernard; Philogène, 1993; Bertrand, 1993; Shankarganesh et al., 2009), podendo conferir assim um amplo espectro sinérgico para os inseticidas avaliados.

Para os inseticidas metomil e spinosad os valores significativos dos FS foram observados tanto pelo contato tópico quanto pelo residual na grande maioria das subdoses e subconcentrações letais avaliadas. Destaca-se a magnitude expressiva dos valores dos FS observados para as combinações do inseticida spinosad tanto por contato tópico quanto residual, credenciando essas frações como ideais para a promoção da sinergia desse grupo de inseticidas. Por último, observou-se em várias oportunidades uma diferença significativa dos valores dos fatores de sinergismo obtidos por contato tópico e residual dos inseticidas quando aplicados em combinações com $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ nas doses e concentrações letais do Oepa. Tais resultados são atribuídos às respostas das diferentes proporcionalidades das combinações dos inseticidas com as subdoses e subconcentrações letais das frações do Oepa, que obedecem ao índice de equivalência o qual classifica as combinações como aditivas, sinérgicas ou antagônicas (Ramakrishnan; Jusko, 2001).

Conclusões

As frações terpênicas do Oepa, mistas e fenilpropanoicas apresentaram efeito sinérgico por contato residual quando combinadas ao inseticida metomil. Por contato tópico apenas a fração terpênica F4 subdose $\frac{1}{2}$ CL₅₀ apresentou efeito sinérgico quando combinada ao inseticida metomil.

As frações terpênicas do Oepa não promoveram efeito sinérgico quando combinadas ao inseticida spinosad, independentemente do modo de contato das lagartas de *S. frugiperda*. Já as frações fenilpropanoicas do Oepa promoveram efeito sinérgico quando combinadas ao inseticida spinosad, independentemente do modo de contato, na grande maioria das subdoses e subconcentrações letais avaliadas. As combinações do inseticida spinosad com as frações fenilpropanoicas apresentaram sinergismo expressivo por contato residual.

A presença de fenilpropanoides, particularmente o dilapiol, na composição química da fração é fundamental para a revelação do efeito sinérgico.

Agradecimento

Os autores agradecem aos colaboradores do Laboratório de Entomologia da Embrapa Acre e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro por meio da bolsa de iniciação científica ao primeiro autor.

Referências

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265-267, Apr. 1925.
- BERNARD, C. B.; PHILOGÈNE, B. J. R. Insecticide synergists: role, importance, and perspectives. **Journal of Toxicology and Environmental Health: Part A Current Issues**, v. 38, n. 2, p. 199-223, Feb. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1080/15287399309531712>.
- BERTRAND, M. C. **Etudes toxicocinetiques et synergiques de l'azadirachtine dihydrogénée chez la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilis***. 1993. 129 f. (Thèses) – Université d'Ottawa, Ottawa.
- CASIDA, J. E. Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 753-772, 1970. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf60171a013>.
- 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**. Viçosa: Ufla, 2000.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; ALECIO, M. R.; LIMA, M. S. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C.DC., *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur.& K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 113-120, fev. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000100017>.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; COSTA, C. R. da. **Potencialidades da pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.): características gerais e resultados de pesquisa**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2006. 53 p. (Embrapa Acre. Documentos, 103). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/505568>. Acesso em: 10 ago. 2022.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; MONTEIRO, A. F. M.; SILVA, I. M.; GOMES, L. P. Sinérgico alternativo para inseticidas inibidores de acetilcolinesterase. **Revista Agro@mbiente On-Line**, v. 11, n. 3, p. 232-240, jul./set. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v11i3.3995>.
- GUEDES, R. N.; PICANÇO, M. C.; GUEDES, N. M. P.; MADEIRA, N. R. Sinergismo do óleo mineral sobre a toxicidade de inseticidas para *Scrobipalpula absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 313-318, mar. 1995.
- HANDA, S. K.; DEWAN, R. S. Evaluation of dillapiole and dihydrodillapiole as synergists for pyrethrins in dust formulations. **Pyrethrum Post**, v. 13, p. 46-47, 1974.
- LICHTENSTEIN, E. P.; LIANG, T. T.; SCHULZ, K. R.; SCHNOES, H. K.; CARTER, G. T. Insecticidal and synergistic components isolated from dill plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 658-664, July 1974. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf60194a037>.
- MARQUES, D. D.; SARTORI, R. A.; LEMOS, T. L. G.; MACHADO, L. L.; SOUZA, J. S. N.; MONTE, F. J. Q. Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 227-230, mar. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672010000100029>.
- MARQUES, L. **Espinósinas: mecanismo de ação e características**. 19 jul. 2018. Disponível em: <https://elevagro.com/materiais-didaticos/espinosinas-mecanismo-de-acao-e-caracteristicas/>. Acesso em: 6 maio 2020.
- MUKERJEE, S. K.; SAXENA, V. S.; TOMAR, S. S. New methylenedioxyphenyl synergists for pyrethrins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 1209-1211, Nov. 1979. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf60226a033>.

NAGABABU, E.; LAKSHMAIAH, N. Inhibition of microsomal lipid-proxidation an monooxygenase activities by eugenol. **Free Radical Research**, v. 20, n. 4, p. 253-266, 1994. DOI: <https://doi.org/10.3109/10715769409147521>.

PAPA, G. Manejo integrado de pragas. In: ZAMBOLIN, L.; CONCEIÇÃO, M. Z.; SANTIAGO, T. (ed.). **O que engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008. p. 203-233.

PIMENTEL, F. A.; SILVA, M. R. da. **Recomendações sobre processo de destilação comercial de biomassa triturada de pimenta longa (*Piper hispidinervum*)**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2000. 3 p. (Embrapa Acre. Comunicado técnico, 123). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/492672>. Acesso em: 10 ago. 2022.

QIN, W.; HUANG, S.; LI, C.; CHEN, S.; PENG, Z. Biological activity of the essential oil from the leaves of *Piper sarmentosum* Roxb. (Piperaceae) and its chemical constituents on *Brontispa longissima* (Gestro) (Coleoptera: Hispididae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, n. 3, p. 132-139, Mar. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.10.006>.

RAMAKRISHNAN, R.; JUSKO, W. J. Interactions of aspirin and salicylic acid with prednisolone for inhibition of lymphocyte proliferation. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 11, p. 2035-2042, Oct. 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1567-5769\(01\)00132-1](https://doi.org/10.1016/s1567-5769(01)00132-1).

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

SHANKARGANESH, K.; SUBAHMANYAM, B.; WALIAAND, S.; DHIBGRA, S. Dillapiole mediated esterase inhibition in insecticide resistant *Spodoptera litura* (Fabricius). **Pesticide Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-147, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. São Carlos: Editora da UFSCar, 2003. V. 6, p. 229-245.

TOZZI, A. A brief history of the development of piperonyl butoxide as an insecticide synergist. In: JONES, D. G. (ed.). **Piperonyl butoxide**: the insecticide synergist. Cambridge, MA: Academic Press, 1999. p. 1-5.