

Sinergismo Relacionado à Proporção dos Constituintes do Óleo Essencial de *Piper aduncum* L.

Hoana Klicia Lopes Guimarães Oliveira¹, Maria Érica Costa de Lima²,
André Fábio Medeiros Monteiro³ e Murilo Fazolin⁴

¹Graduanda em Ciências Biológicas, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Acre, bolsista do CNPq na Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

²Graduanda em Engenharia Agrônômica, Universidade Federal do Acre, bolsista do 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 – O óleo essencial de *Piper aduncum* L. apresenta potencialidade de utilização como inseticida ou sinérgico de inseticidas químicos aplicáveis ao manejo de pragas. O objetivo deste trabalho foi analisar a influência da proporção relativa dos principais grupos ou classes de compostos presentes nas frações sobre o efeito sinérgico do óleo. As frações foram obtidas por retificação fracionada e a identificação dos constituintes realizada por CG-EM. Os ensaios consistiram na aplicação por contato tópico das concentrações dos compostos avaliados em lagartas de terceiro instar de *Spodoptera frugiperda*. O tempo de exposição dos insetos aos tratamentos foi de 24 horas. Os resultados das avaliações das frações combinadas com os inseticidas imidacloprido e bifentrina apontaram a fração 7 (F7) como a de maior expressão sinérgica. Uma hipótese para explicar a descontinuidade do efeito sinérgico com o aumento dos teores de dilapiol está relacionada à ausência ou mudança na proporção de determinados compostos minoritários da classe dos sesquiterpenos.

Termos para indexação: bioinseticidas, controle de praga, óleo essencial.

Introdução

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), é uma praga-chave para várias culturas, dentre elas a *Zea mays* (Viana, 1994). Para o seu controle têm sido utilizadas diversas classes de inseticidas sintéticos, entretanto o uso indiscriminado pode levar à resistência de indivíduos expostos a eles, além de prejuízos ao meio ambiente (Fazolin et al., 2016). Na busca de alternativas para substituição ao uso desses produtos, a utilização de inseticidas botânicos vem se apresentando como uma solução (Roel; Vendramim, 1999).

Dentre as plantas inseticidas atualmente estudadas, destacam-se as piperáceas como *Piper aduncum* L. abundantes no Acre. O óleo essencial de *P. aduncum* (Oepa) é rico em dilapiol (Fazolin et al., 2007), cuja estrutura química apresenta o grupo metilenodioxifenil a dois grupos metoxila (OCH₃) interferente nas funções do citocromo P-450, que altera o processo detoxificativo dos insetos, o que viabiliza seu emprego como sinérgico de inseticidas (Nagababu; Lakshmaiah, 1994).

Resultados de trabalhos científicos indicam que o dilapiol sinergiza inseticidas dos grupos químicos como carbamatos, fosforados e piretroides (Bernard et al., 1990; Larocque et al., 1999; Liu et al., 2014; Fazolin et al., 2016).

O óleo essencial de *P. aduncum* apresenta potencialidade de utilização como inseticida ou sinérgico de inseticidas químicos aplicáveis ao manejo de pragas. Contudo, ações adicionais de pesquisa são necessárias para o maior conhecimento das frações desse óleo quanto à atividade inseticida e sinérgica, podendo-se determinar formulações adequadas para o controle de insetos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência dos principais grupos de compostos presentes nas frações do Oepa de modo a mensurar a importância da sua proporção relativa sobre a eficácia sinérgica do óleo.

Material e métodos

Plantas de *P. aduncum* foram coletadas em área de produção da Embrapa Acre. O óleo essencial foi obtido utilizando o princípio de arraste de vapor em um sistema de caldeira aquecida a diesel, adaptada de Pimentel e Silva (2000). O óleo foi armazenado em recipientes de vidros âmbar e conservado em sala refrigerada entre 22 °C–25 °C para minimização da perda de compostos voláteis antes das análises. Os óleos essenciais obtidos por retificação fracionada foram redestilados por meio do sistema de destilação fracionada. Os compostos purificados imidacloprido (neonicotinoide), bifentrina (piretroide) e triflumuron (benzotriazolone) foram adquiridos como padrões analíticos junto à Sigma-Aldrich.

Para a identificação e quantificação dos constituintes foram realizadas análises em cromatógrafo gasoso (detector DIC), acoplado ao espectrômetro de massa (CG-EM). A caracterização química foi feita pela comparação de seus espectros de massas com os disponíveis no banco de dados da espectroscopia do CG-EM, por meio de padrões autênticos, com dados da literatura e também pelos índices de Kovats.

Inicialmente foram realizados testes preliminares com o propósito de determinar os padrões ideais dos fatores: tempo de exposição dos insetos, volume do produto a ser utilizado e número de insetos por tratamento. Os bioensaios preliminares serviram para a obtenção de faixas respostas, ou seja, os intervalos de concentrações que ocasionaram mortalidade próxima a 0% e a 100%. Cada faixa de resposta foi obtida a partir da solução-estoque do princípio ativo e posteriormente submetida às diluições sequenciais.

Sete concentrações foram estabelecidas, além de um controle (solvente acetona). Todas as concentrações foram usadas nos bioensaios definitivos para obtenção da curva de concentração x mortalidade e determinação da dose com probabilidade de causar 50% de mortalidade (DL_{50}) para cada composto testado.

Os ensaios consistiram na aplicação dorsal no pronoto das concentrações dos compostos avaliados com auxílio de uma microseringa graduada. Em todos os bioensaios definitivos foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda* (J. E. Smith, 1797), confinadas isoladamente em placas de Petri, mantidas em câmara climatizada à temperatura de 25 °C ± 1 °C e fotofase de 12 horas até o momento da avaliação da mortalidade dos indivíduos. O tempo de exposição dos insetos aos tratamentos foi de no mínimo 24 horas (dependendo dos resultados dos bioensaios preliminares) considerando-se a mortalidade cumulativa no período.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Os resultados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit, com a utilização do programa de análises estatísticas SAS (SAS Institute, 2001).

As estimativas das DL_{50} serviram de base discriminatória na detecção da toxicidade em relação ao inseto-alvo. Os valores de mortalidade foram corrigidos pela mortalidade da testemunha utilizando-se a fórmula de Abbott (Silva et al., 2007):

$$Mc(\%) = \%Mo - \%Mt \times 100$$

em que

100 - %Mt Mc = mortalidade corrigida.

Mo = mortalidade observada.

Mt = mortalidade na testemunha.

A eficácia das diferentes frações do óleo foi avaliada por meio do cálculo da razão de toxidez (RT = DL_{50} i.a. inseticida / DL_{50} i.a. inseticida + subdose de concentração do óleo essencial), revelando a potência relativa das combinações sinérgicas entre as concentrações ou doses letais do inseticida tomado isoladamente e as combinações deste com os sinérgicos. O fator de sinergismo pode ser calculado a partir da razão aritmética dos valores da DL_{50} do inseticida / DL_{50} da combinação inseticida com sinérgico.

O efeito sinérgico foi considerado significativo quando a FS_{50} de inseticida + fração do Oepa apresentou valores acima de 3. Quando a FS_{50} ficou acima de 10 a expressão do sinergismo foi considerada extremamente alta.

Compostos presentes em frações com altos valores de FS_{50} foram eleitos como prováveis sinérgicos ou inseticidas e tiveram sua bibliografia levantada.

Resultados e discussão

Foram obtidas oito frações (F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 e F8). Observando os agrupamentos dos compostos quanto à similaridade das suas estruturas, houve um aumento nos teores de fenilpropanoides que variaram de 23,8% a 96,7% na última fração (F8). Paralelamente houve uma redução nos sesquiterpenos hidrocarbonados de 38,1% a 0,3%. Observou-se a ausência de monoterpenos a partir da F3 e dos alifáticos não terpênicos na F8. Os teores de sesquiterpenos oxigenados atingiram seu maior valor na F4 (6,6%) e depois foram reduzidos até a F8 (1,9%).

As F1, F2, F3 e F4 apresentaram número elevado de sesquiterpenos hidrocarbonados (entre 39,3% e 22,5%, respectivamente); e as F4, F5, F6, F7 e F8 maiores teores de fenilpropanoides (variando de 65,8% a 96,7%, respectivamente). Portanto, a classe predominante de compostos foram os fenilpropanoides na F2 e da F4 a F8 e os terpenoides na F1. Na F3 não há predomínio de classes dos compostos, ou seja, estão em uma proporção equilibrada de aproximadamente 1:1.

Os resultados das avaliações das frações combinadas com o inseticida imidacloprido apontaram a F7 como a de maior expressão sinérgica para as larvas de *S. frugiperda*, independentemente da subdose de sinérgico utilizada.

A F7 apresentou os maiores valores de FS_{50} em três das cinco combinações entre inseticidas e frações avaliadas, aumentando a atividade sinérgica com dois grupos de inseticidas. A principal diferença na composição química da F7 em relação à F6 é a mudança na razão ou proporcionalidade entre sesquiterpenos hidrocarbonados, sesquiterpenos oxigenados e fenilpropanoides. Verifica-se que a F7 apresenta menores teores de sesquiterpenos hidrocarbonados (SH) (de 7,6% para 2,2%) associados a uma manutenção nos teores de sesquiterpenos oxigenados (SO) (de 4,7% a 4,4%) quando comparada à F6. Os menores teores de terpenos na F8 em comparação à F7 podem estar relacionados com uma menor atividade sinérgica.

A hipótese para explicar o fenômeno estaria relacionada a um aumento e inversão na proporção de terpenos oxigenados na F7 (de 2SH:1SO para 1SH:2SO) comparada à F6 que poderia favorecer

uma maior expressão do sinergismo. Lima et al. (2011) sugerem que óleos com proporções relativas maiores de sesquiterpenos oxigenados têm maior atividade larvívora quando comparados a óleos essenciais ricos em sesquiterpenos hidrocarbonados. O possível mecanismo envolvido seria um aumento na permeabilidade celular trazido por esse grupo.

De acordo com Tak e Isman (2017), os hidrocarbonetos terpênicos tendem a prover os efeitos mais significativos de aumento sinérgico. A maioria das interações entre hidrocarbonetos terpênicos e outros compostos foi interpretada como efeitos relacionados ao aumento da solubilidade e penetração do xenobiótico sobre o inseto via aplicação tópica, ou seja, de como o tóxico pode atravessar a camada de cera do tegumento do inseto.

A F8 com maior teor de dilapiol e de fenilpropanóides não exibiu necessariamente um aumento de atividade sinérgica. Dilapiol e safrol (Bernard et al., 1995) bem como miristicina (Niu et al., 2012) são reconhecidos por seus efeitos sinérgicos quando combinados a inseticidas.

Uma hipótese que pode explicar a descontinuidade do efeito sinérgico com o aumento dos teores de dilapiol no Oepa está relacionada à ausência de determinados compostos minoritários que estariam atuando de forma aditiva, não permitindo a expressão do sinergismo na sua plenitude. Assim, é possível que outros constituintes das demais frações também estejam atuando como sinergistas ao aumentarem a absorção pela membrana celular, potencializando a atividade dos inseticidas avaliados.

Por fim, a diferença nos fatores de sinergismo entre a F1 e a fração de expressão sinérgica máxima (F7 ou F8), ou seja, aumentos de 1,5 x (de 1,9 a 3,1), 3 x (de 1,7 a 5,5) e 416 x (de 3,3 a 1.333,0), indica a importância da destilação fracionada na obtenção de formulações otimizadas para a expressão da atividade sinérgica.

Conclusões

Por contato tópico verificou-se que a F7 do Oepa expressou maior efeito sinérgico quando combinada com imidacloprido e bifentrina, ou seja, a presença do dilapiol associado a outros compostos minoritários pode ser responsável pelas maiores atividades sinérgicas obtidas nessa fração.

Agradecimento

Os autores agradecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e a Embrapa Acre pela estrutura e orientação para realização das atividades.

Referências

BERNARD, C. B.; ARNASON, J. T.; PHILOGÈNE, B. J. R.; LAM, J.; WADDEL, T. In vivo effect of mixtures of allelochemicals in the life cycle of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 57, n. 1, p. 17-22, Oct. 1990. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1990.tb01411.x>.

BERNARD, C. B.; KRISHANMURTY, H. G.; CHAURET, D.; DURST, T.; PHILOGENE, B. J. R.; SANCHEZ-VINDAS, P.; HASBUN, C.; POVEDA, L.; SAN ROMAN, L.; ARNASON, J. T. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, n. 6, p. 801-814, June 1995. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf02033462>.

- 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, jan./fev. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000100017>.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. V. E.; MONTEIRO, A. F. M.; SILVA, I. M. da; GOMES, L. P.; SILVA, M. S. de F. Combining the essential oil of *Piper aduncum* L. with commercial insecticides. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 6, p. 3903-3914, nov./dez. 2016. DOI: [10.5433/1679-0359.2016v37n6p3903](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n6p3903).
- LAROCQUE, N.; VINCENT, C.; BELANGER, A.; BOURASSA, J. P. Effects of tansy essential oil from *Tanacetum vulgare* on biology of oblique-banded leafroller, *Choristoneura rosaceana*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 6, p. 1319-1330, June 1999. DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1020974725437>.
- LIMA, M. A.; OLIVEIRA, F. F. M. de; GOMES, G. A.; LAVOR, P. L.; NAGAO-DIAS, A. T.; LEMOS, T. L.; CARVALHO, M. G. de. Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 55, p. 11716-11720, Sept. 2011. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB11.1102>.
- LIU, S. Q.; SCOTT, I. M.; PELLETIER, Y.; KRAMP, K.; DURST, T.; SIMS, S. R.; ARNASON, J. T. Dillapiol: a pyrethrum synergist for control of the colorado potato beetle. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 2, p. 797-805, Apr. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1603/ec13440>.
- NAGABABU, E.; LAKSHMAIAH, N. Inhibition of microsomal lipid-proxidation an monooxygenase activities by eugenol. **Free Radical Research**, v. 20, n. 4, p. 253-266, Apr. 1994. DOI: <https://doi.org/10.3109/10715769409147521>.
- NIU, G.; POLLOCK, H. S.; LAWRENCE, A.; SIEGEL, J. P.; BERENBAUM, M. R. Effects of a naturally occurring and a synthetic synergist on toxicity of three insecticides and a phytochemical to navel orangeworm (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 2, p. 410-417, Apr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1603/ec10194>.
- 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. 2020.
- ROEL, A. R.; VENDRAMIM, J. D. Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em genótipos de milho tratados com extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* (Swartz). **Scientia Agricola**, v. 56, n. 3, jul. 1999. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90161999000300010>.
- SAS Institute. **User's guide: statistics**, version 8.2. 6. ed. Cary, NC, 2001.
- SILVA, W. C.; RIBEIRO, J. D.; SOUZA, H. E. M.; CORRÊA, R. de. S. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 293-298, jun. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672007000200017>.
- TAK, J.; ISMAN, M. B. Penetration-enhancement underlies synergy of plant essential oil terpenoids as insecticides in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Scientific Reports**, v. 7, 42432, Feb. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep42432>.
- VIANA, P. A. Efeito de doses do inseticida Chlorpyrifos para o controle da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, na cultura do milho. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. **Relatório técnico anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo**: período 1992-1993. Sete Lagoas, 1994. V. 6, p. 65-66.