

Aumento do Desempenho Sinérgico do Óleo Essencial de *Piper aduncum* L. pelo Enriquecimento de suas Frações Terpênicas – Piretroide Sintético

Natália da Silva Maisforte¹, Murilo Fazolin², Maria Érica Costa de Lima³
e André Fábio Medeiros Monteiro⁴

¹Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas, Instituto Federal do Acre, bolsista do Pibiti/CNPq na Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

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

³Graduanda em Engenharia Agrônoma, Universidade Federal do Acre, bolsista do Pibic/CNPq na Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

⁴Biólogo, mestre em Ecologia, analista da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

Resumo – Os óleos essenciais podem sinergizar inseticidas pela capacidade de inibição de enzimas metabólicas detoxificativas do inseto, relacionadas ao mecanismo bioquímico de resistência. 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. A ciflutrina também afeta as concentrações de cálcio no tecido nervoso por meio da inibição de uma enzima envolvida no transporte de cálcio. O objetivo deste trabalho foi avaliar a magnitude sinérgica de frações terpênicas do óleo essencial de *Piper aduncum* (Piperaceae), enriquecidas com um *blend* de compostos, visando definir uma proporção sinérgica ideal para a combinação com inseticidas do grupo químico dos piretroides sintéticos. A combinação do inseticida ciflutrina com a fração terpênica do óleo essencial de *P. aduncum*, independentemente do enriquecimento, apresenta sinergia significativa.

Termos para indexação: antagonismo, razão de toxidez, resistência.

Introdução

Os óleos essenciais podem sinergizar inseticidas pela capacidade de inibição de enzimas metabólicas detoxificativas, relacionadas ao mecanismo bioquímico de resistência. Com isso, há evidências de que o óleo essencial de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) (Oepa), rico em dilapiol, sinergiza inseticidas de diferentes grupos químicos (Bhuiyan et al., 2010; Liu et al., 2014; Fazolin et al., 2015).

A evolução da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil foi constatada para um número significativo de princípios ativos inseticidas, sendo os principais grupos os organofosforados, ciclodienos organoclorados, piretroides e piretrinas. Atualmente esses grupos ainda são utilizados, em nível mundial, para o controle dessa praga (Oliveira, 2017).

Os piretroides são moduladores dos canais de sódio e exercem efeito significativo, mantendo esses canais abertos, ocasionando a entrada permanente desse íon na célula, que resulta em transmissões de impulsos nervosos repetitivos e descontrolados, hiperexcitabilidade, perda da postura locomotora, paralisia e morte. A resistência a piretroides foi reportada nos países de origem de *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) (Índia, China, Paquistão e Austrália) e na maioria dos casos está relacionada à destoxificação do inseticida por meio da ação de enzimas, tais como glutathione-S-transferases (GSTs), esterases (ESTs) e citocromo P450 (CYPs). Essas enzimas possuem a capacidade de metabolizar a molécula inseticida e transformá-la em um composto não tóxico à praga-alvo (Insecticide Resistance Action Committee, 2017).

A ciflutrina é um piretroide que causa hiperexcitação do sistema nervoso, levando a convulsões e posterior morte do inseto (Melo et al., 2010). Esse ingrediente ativo tem um complexo modo de ação que incentiva alterações na membrana do nervo, diminuindo a absorção de sódio e o fluxo de potássio. Isso resulta em repetidas descargas elétricas dos neurônios, causando convulsões e também futuro bloqueio dos impulsos nervosos. A ciflutrina também afeta as concentrações de cálcio no tecido nervoso, por meio da inibição de uma enzima envolvida no transporte desse íon, ocasionando um aumento na quantidade do neurotransmissor acetilcolina, liberado na junção entre os nervos (Al-Rajhi, 1990).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a magnitude sinérgica de frações terpênicas do Oepa enriquecidas com um *blend* de compostos, visando definir uma proporção sinérgica ideal para a combinação com inseticidas do grupo químico dos piretroides sintéticos.

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia da Embrapa Acre. Em todos os bioensaios, larvas de terceiro instar da espécie *S. frugiperda* foram obtidas por meio de criação artificial em laboratório, conforme metodologia proposta por Cruz (2000). O princípio ativo ciflutrina (piretroide) purificado e o *blend* foram adquiridos da Sigma Aldrich. O óleo essencial foi obtido da biomassa seca de plantas de *P. aduncum*, cultivadas no campo experimental da Embrapa Acre, por meio de um extrator, utilizando o princípio de arraste de vapor em um sistema de caldeira aquecida a diesel, adaptada de Pimentel e Silva (2003). O Oepa foi redistilado 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. Nesse processo foram obtidas três frações (F1, F2, F3), sendo utilizada a F1 (fração terpênica) para avaliar a identificação e quantificação dos constituintes químicos. As frações obtidas foram submetidas à análise em cromatógrafo gasoso (detector DIC), acoplado ao espectrômetro de massa (CG-EM).

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 número de insetos por tratamento. A partir daí, foram estabelecidas entre cinco e sete concentrações das respectivas combinações, além de um controle (solvente acetona). Todas as concentrações foram usadas nos bioensaios definitivos de curva de concentração-mortalidade e determinação da dose com probabilidade de causar 50% de mortalidade (DL_{50}) para cada combinação testada.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Em todos os bioensaios definitivos, lagartas de *S. frugiperda* de terceiro instar foram confinadas isoladamente em placas de Petri (5 cm x 1,5 cm), mantidas em câmara climatizada (BOD) à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\% \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas, até o momento da avaliação da mortalidade dos indivíduos. O tempo de exposição dos insetos aos tratamentos foi de 24 horas, considerando-se a mortalidade cumulativa no período. Foi utilizado o programa de análise de Probit (SAS Institute, 2001), para obter análises de regressão polinomial e coeficiente angular (inclinação) da reta do inseticida ciflutrina e da fração terpênica do Oepa sem enriquecimento e com enriquecimento com um *blend* de compostos.

Os procedimentos experimentais descritos acima foram adotados para as seguintes avaliações: a) efeito inseticida do ingrediente ativo ciflutrina tomado de forma isolada; b) efeito sinérgico da

fração terpênica sem enriquecimento; e c) efeito sinérgico da fração terpênica formulada a partir da adição de um *blend* de compostos (borneol, óxido de cariofileno, camphene, isoborneol, timol, sarisan, limonene, dilapiol, citral, α -pineno, ocimene, s-carvone, L-carvone, anethol, terpinen-4-ol, terpinolene, α -phellandrene, α -terpineol, L-menthone, nerolidol, α -terpinene, p-anisaldehyde, β -pineno, citronelal, γ -terpinene, sabinene, β -caryophyllene, myrcene, eucalyptol, carvacrol, 3-carene, eugenol, geraniol, trans-cinamaldeído, p-cymene e l-linalool), tomado em diferentes concentrações (2%, 10% e 25%) na adição com o princípio ativo comparado por meio da DL_{50} das combinações.

Por meio do cálculo do fator de sinergismo, $FS = CL_{50} \text{ i.a. inseticida} / CL_{50} \text{ i.a. inseticida} + CL_{50} \text{ do inseticida sinergizado}$ (Guedes et al., 1995), foi obtida a eficácia sinérgica das combinações avaliadas. O efeito sinérgico foi considerado significativo quando não houve sobreposição dos intervalos de confiança a 95% das CL_{50} das combinações avaliadas (Van Frankenhuyzen, 2009), sendo os valores acima de 1 indicadores de sinergismo, iguais a 1, aditivismo, e abaixo de 1, antagonismo (Abbassy et al., 2009).

Resultados e discussão

Todas as combinações do inseticida ciflutrina com a fração terpênica sem e com enriquecimento (2%, 10% e 25% do *blend* de compostos) sinergizaram significativamente com a ciflutrina, devido aos valores dos fatores de sinergismo serem maiores que 1. A combinação ciflutrina + fração terpênica sem enriquecimento apresentou valores do fator de sinergismo com magnitude expressiva, diferindo significativamente das demais combinações.

Os acréscimos da porcentagem de enriquecimento da fração terpênica com o *blend* de compostos apresentaram uma relação direta com o aumento dos valores dos fatores de sinergismo, embora não existindo diferença significativa entre eles, demonstrada pela sobreposição dos valores do intervalo de confiança (Figura 1).

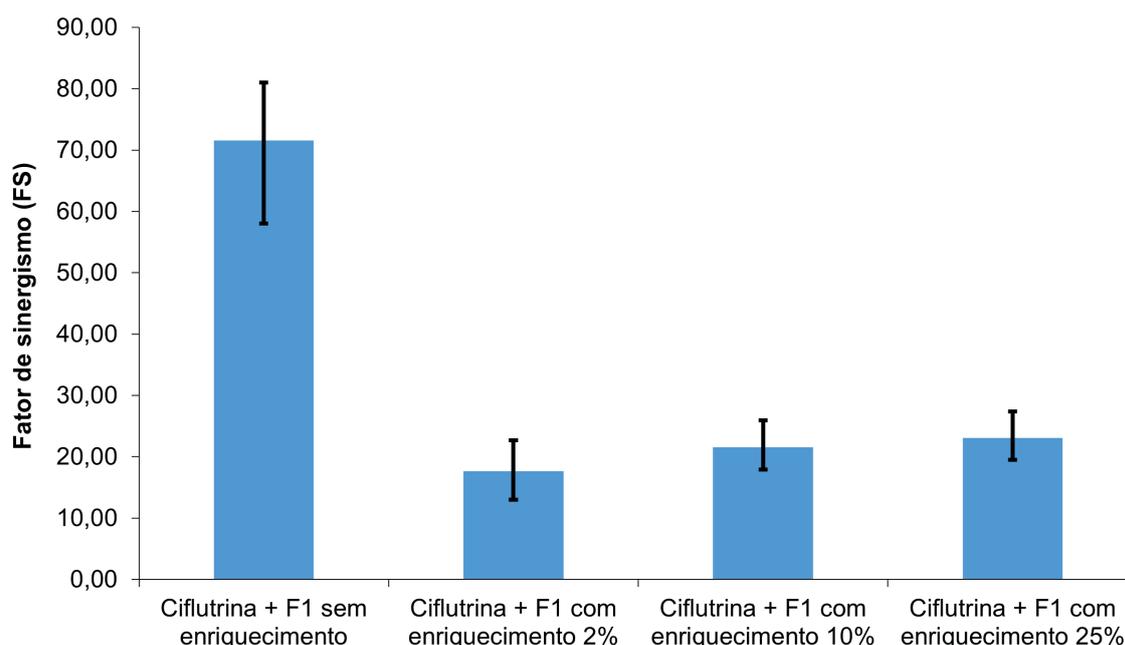


Figura 1. Fatores de sinergismo do inseticida ciflutrina combinado com as doses letais da fração terpênica do óleo essencial de *Piper aduncum*, sem e com enriquecimento (2%, 10% e 25%), com um *blend* de compostos, por contato tóxico em larvas de *Spodoptera frugiperda*.

Pelos altos valores dos fatores de sinergismo (FS), é possível que os principais compostos presentes na fração terpênica tenham sido responsáveis por facilitar a penetração do inseticida nas barreiras constituídas por mecanismos detoxificativos associadas à cutícula das larvas de *S. frugiperda* (Tak; Isman, 2015). Quando combinados com o piretroide, todos os compostos do *blend* poderiam teoricamente atuar na inibição das diferentes enzimas detoxificativas, principalmente na inibição das monoxigenases (P450) e esterases, responsáveis pela metabolização de piretroides como a ciflutrina (Ruttanaphan et al., 2019), o que não pôde ser evidenciado neste estudo.

A ciflutrina, quando combinada com a fração terpênica enriquecida com os *blends* de compostos a 2%, 10% e 25%, independentemente do enriquecimento considerado, apresentou valores significativos de FS. Tal resultado demonstra que os compostos apresentam evidências de efeito sinérgico por inibição de enzimas detoxificativas, ou sinergismo para a ciflutrina.

Segundo Hoskins e Gordon (1956), uma interpretação biológica do coeficiente angular está relacionada à homogeneidade de uma determinada população, isto é, quanto maior o coeficiente angular, maior a homogeneidade dessa população. A maior inclinação da reta indica tendência à resistência a curto prazo, enquanto a menor inclinação retarda a evolução para a resistência.

Ao comparar o inseticida tomado de forma isolada com a combinação do inseticida + a fração terpênica sem enriquecimento pode ser observado um decréscimo do valor da inclinação da reta, indicando a existência de menor probabilidade da evolução de indivíduos resistentes nessa população (Figura 2). Porém, ao comparar o inseticida com a fração terpênica sem enriquecimento com a combinação do inseticida + a fração terpênica enriquecida, observa-se um aumento significativo dos valores da inclinação das retas, o que não pode ser considerado desejável.

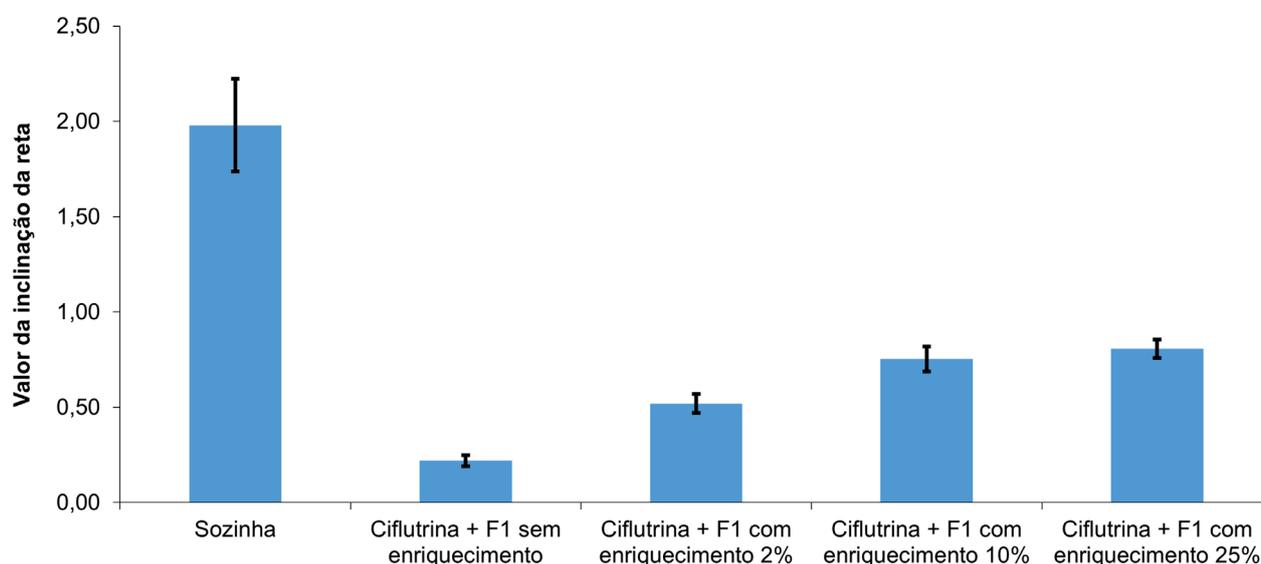


Figura 2. Valores das inclinações da reta do inseticida ciflutrina sozinho e combinado com as doses letais da fração terpênica do óleo essencial de *Piper aduncum*, sem e com enriquecimento (2%, 10% e 25%), com um *blend* de compostos, por contato tópico em larvas de *Spodoptera frugiperda*.

Esse aumento dos valores da inclinação da reta na combinação do inseticida com as referidas frações representa a resposta de uma população homogênea que pode acarretar uma maior velocidade de seleção dessa população de insetos para a evolução da resistência (Hoskins; Gordon, 1956). No entanto, os valores da inclinação da reta de todas as combinações da fração terpênica com a ciflutrina foram significativamente inferiores quando comparados ao inseticida piretroide considerado de forma isolada. Assim, a combinação da ciflutrina com a fração terpênica sem adição do *blend* de compostos pode ser considerada a mais adequada por mitigar a evolução da resistência da população do inseto avaliada (Hoskins; Gordon, 1956).

Conclusões

As combinações do inseticida ciflutrina com a fração terpênica do Oepa, independentemente do enriquecimento considerado, apresentam sinergia significativa. O aumento da porcentagem do *blend* de compostos no enriquecimento da fração terpênica combinada à ciflutrina oportuniza um acréscimo da pressão de seleção para a resistência do inseto-alvo avaliado devido à maior homogeneidade de resposta da população para essas combinações. A fração terpênica sem enriquecimento, quando combinada à ciflutrina, apresentou a maior potencialização sinérgica e o menor impacto na evolução da resistência para *S. frugiperda*.

Agradecimento

Os autores agradecem aos colaboradores do Laboratório de Entomologia da Embrapa Acre e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de iniciação científica à primeira autora.

Referências

- ABBASSY, M. A.; ABDELGALEIL, S. A.; RABIEL, R. Y. Insecticidal and synergistic effects of *Majorana hortensis* essential oil and some of its major constituents. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 131, n. 3, p. 225-232, May 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00854.x>.
- AL-RAJHI, D. H. Properties of Ca²⁺+Mg²⁺-ATPase from rat brain and its inhibition by pyrethroids. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 37, n. 2, p. 116-120, June 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(90\)90116-J](https://doi.org/10.1016/0048-3575(90)90116-J).
- BHUIYAN, M. N. I.; BEGUM, J.; AKTER, F. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzygium caryophyllatum* (L.) Alston). **African Journal of Plant Science**, v. 4, n. 11, p. 451-454, Nov. 2010. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJPS.9000051>.
- CRUZ, I. Métodos de criação de agentes entomófagos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). In: BUENO, V. H. P. (ed.). **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: UFLA, 2000. p. 111-135.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; MEDEIROS, A. F. M.; GOMES, L. P.; SILVA, da I. M.; SILVA, M. S de F. Sinérgico alternativo para o manejo da resistência da lagarta do cartucho do milho a piretróides. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 14, n. 3, p. 316-325, 2015. DOI: 10.18512/1980-6477/rbms.v14n3p316-325.
- 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. Disponível em: <https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/4309>. Acesso em: 12 out. 2022.

HOSKINS, W. M.; GORDON, H. T. Arthropod resistance to chemicals. **Annual Review of Entomology**, v. 1, n. 1, p. 89-122, Jan. 1956. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.en.01.010156.000513>.

INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. **Desvendando a resistência de *Helicoverpa armigera* a piretroides no Brasil**. 2017. Disponível em: <https://www.iraac-br.org/single-post/2017/10/17/desvendando-a-resist%C3%Aancia-de-helicoverpa-armigera-a-piretroides-no-brasil>. Acesso em: 12 out. 2022.

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>.

MELO, R. M. P.; CORREIA, T. R.; FERNANDES, J. I.; SCOTT, F. B. Avaliação in vitro de uma formulação contendo o piretróide ciflutrina e o IGR piriproxifen no controle de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 32, p. 35-39, 2010. Supl. 1.

OLIVEIRA, I. M. **Resistência de artrópodos de importância agrícola ao controle químico**. 2017. 78 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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, 2003. 3 p. (Embrapa Acre. Comunicado técnico, 123). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/492672>. Acesso em: 15 jul. 2022.

RUTTANAPHAN, T.; PLUEMPANUPAT, W.; AUNGSIRISAWAT, C.; BOONYARIT, P.; GOFF, G. L.; BULLANGPOTI, V. Effect of plant essential oils and their major constituents on cypermethrin tolerance associated detoxification enzyme activities in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n. 5, p. 2167-2176, Oct. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/toz126>.

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

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, e12690, July 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep12690>.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 1, p. 1-16, Apr. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.02.009>.