



Sinérgico alternativo para inseticidas inibidores de acetilcolinesterase *Alternative synergistic for acetylcholinesterase inhibitors insecticide*

Murilo Fazolin^{1*}, Joelma Lima Vidal Estrela², André Fábio Medeiros Monteiro³, Iriana Maria da Silva⁴, Luiara Paiva Gomes⁵

Resumo: A importância da utilização de sinérgicos está relacionada à minimização da quantidade de inseticida químico necessária para o controle de insetos, podendo contribuir com a diminuição da contaminação ambiental e preservação de insetos benéficos. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito sinérgico e da homogeneidade de resposta de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) às doses subletais do óleo essencial de *Piper aduncum* L. (OEPA) em combinações com formulações de organofosforados e carbamato, comparadas àquelas com butóxido de piperonila (PBO). Foram obtidos fatores de sinérgico (FS) para comparação dos tratamentos entre si. Por contato residual, evidenciou-se significativa potencialização dos inseticidas Profenofós (FS= 5,4 – 7,7), Fenitrotiona (FS= 3,9 – 29,2) e Clorpirifós (FS= 3,4 – 7,8). Já por contato tóxico ocorreu significativa potencialização dos inseticidas: Profenofós + ¼ da DL50 do OEPA (FS= 5,4), Fenitrotiona + ¼ da DL50 do OEPA (FS= 33,8) e Clorpirifós + 1/2 da DL50 do OEPA (FS= 2,5). O metomil não foi sinérgico pelo OEPA nas duas vias de contaminação e não apresentou aumento da pressão de seleção para resistência na população avaliada de lagartas de *S. frugiperda*. Não foi possível concluir sobre a homogeneidade de resposta e consequentemente da pressão de seleção com relação aos inseticidas organofosforados para *S. frugiperda*. Os resultados indicam que o óleo essencial de *Piper aduncum* apresenta potencial como sinérgico para Fenitrotiona, Profenofós e Clorpirifós, podendo ser uma alternativa ao butóxido de piperonila.

Palavras-chave: Carbamatos. Esterases. *Piper aduncum*. Organofosforados. Sinérgico botânico.

Abstract: The importance of the use of synergists is related to the minimization of the amount of chemical insecticide necessary for the control of insects, and can contribute to the reduction of environmental contamination and the preservation of beneficial insects. Thus, the objective of this work was to evaluate the synergistic and homogeneous response effect of *Spodoptera frugiperda* caterpillars (JE Smith, 1797) to sublethal doses of the essential oil of *Piper aduncum* L. (OEPA) in combinations with organophosphorus formulations and carbamate, compared to those with piperonyl butoxide (PBO). Synergism factors (FS) were obtained to compare the treatments with each other. By residual contact, the insecticides Profenofos (FS = 5.4 - 7.7), Phenitrothione (FS = 3.9 - 29.2) and Chlorpyrifos (FS = 3.4 - 7.8) were significantly potentiated. On the other hand, there was a significant increase in insecticides: Profenofós + ¼ of the LD50 of the OEPA (FS = 5.4), Fenitrothione + ¼ of the LD50 of the OEPA (FS = 33.8) and Chlorpyrifos + 1/2 of the OPA FS = 2.5). Methomyl was not synergized by OEPA in the two contamination pathways and did not present increased selection pressure for resistance in the evaluated population of *S. frugiperda* caterpillars. It was not possible to conclude on the homogeneity of response and the selection pressure with respect to the organophosphate insecticides for *S. frugiperda*. The results indicate that *Piper aduncum* essential oil has synergistic potential for Fenitrothione, Profenofos and Chlorpyrifos and may be an alternative to piperonyl butoxide.

Key words: Botanical synergist. Carbamate. Esterases. *Piper aduncum*. Organophosphorus.

*Autor para correspondência

Enviado para publicação em 08/11/2016 e aprovado em 20/06/2017

¹Engenheiro Agrônomo, Dr. Pesquisador Embrapa Acre, Rodovia BR 364- Km 14, s/n, Rio Branco, AC, CEP 69900-970, Brasil, murilo.fazolin@embrapa.br

²Engenheira Agrônoma, MSc. Bolsista do CNPq, Embrapa Acre, Rio Branco, AC, Brasil, faz.olin@hotmail.com

³Biólogo, MSc. Analista laboratorial, Embrapa Acre, Rio Branco, AC, Brasil, andre.monteiro@embrapa.br

⁴Graduanda em Ciências Biológicas, União Educacional do Norte Rio Branco, AC, Brasil, iriana.rbo@gmail.com

⁵Graduanda em Ciências Biológicas, União Educacional do Norte Rio Branco, AC, Brasil, luiara.gomes@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie polífaga que se alimenta de culturas de importância econômica, tais como milho, algodão, sorgo, amendoim, arroz e pastagens cultivadas no Brasil e no mundo (CORTEZ; WAQUIL, 1997; BOTTON *et al.*, 1998).

Os avanços nos diversos programas de manejo integrado de pragas (MIP) têm sido significativos, no entanto, o controle de *S. frugiperda* continua a ser realizado predominantemente por meio de inseticidas, o que potencializou a evolução da resistência dessa praga aos produtos pertencentes às principais classes comercializadas (YU *et al.*, 2003).

A resistência é originada por organismos capazes de suportar doses toxicológicas letais para a maioria da população normal (suscetível) da mesma espécie. A resistência dos insetos evolui em resposta à seleção natural. A pressão contínua de seleção, imposta pelo uso abusivo de inseticidas, limita a eficiência e viabilidade desses produtos em longo prazo (RIBEIRO, 2014).

A redução da oferta de produtos registrados para o controle de *S. frugiperda* nos últimos seis anos foi acima de 50% (de 130 formulações em 2010 para 61 em 2016) (MAPA/AGROFIT, 2016) devido à utilização das tecnologias Bt e da ineficácia inseticida, atribuída a evolução da resistência de *S. frugiperda* (APRD, 2016). Sob essa ótica, as expressivas reduções de oferta puderam ser evidenciadas para o grupo dos organofosforados (85,3%) e carbamatos (58,3%) (MAPA/AGROFIT, 2016). Com a evolução da resistência, também para as tecnologias Bt (RAYMOND *et al.*, 2005), ofertas alternativas de inseticidas comerciais deverão ser disponibilizadas no mercado para o manejo integrado da *S. frugiperda*.

Dentre as estratégias a serem adotadas para o manejo da resistência de insetos, Guedes e Oliveira (2002) sugerem a saturação, combinação de dois inseticidas ou de um inseticida com um sinergista, esse último definido como um composto, que combinado com inseticidas, eleva a letalidade dos insetos acima do efeito aditivo esperado.

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 detoxificação. Pode ainda reagir com sítios do sistema enzimático, inibindo a excreção do inseticida (CASIDA, 1970).

O butóxido de piperonila (PBO) é o sinérgico de maior utilização industrial (ROCHA e MING, 1999) e atua na inibição de oxidases e esterases de lagartas da *S. frugiperda*, destacando-se a acetilcolinesterase, responsável pela resistência a fosforados e carbamatos (BECKEL *et al.*, 2006).

Lignanas extraídas das piperáceas, que possuem o grupo metilendioxifenil, apresentam potencial sinérgico para os inseticidas convencionais, inibindo o mesmo grupo enzimático que o PBO (BERNARD *et al.*, 1995).

O óleo rico em dilapiol, obtido de plantas de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) (FAZOLIN *et al.*, 2006), é uma opção à produção de lignanas sinérgicas. Essa espécie, com altos teores desse princípio ativo (MAIA *et al.*, 1998), é abundante na Amazônia Ocidental e apresenta viabilidade de produção em escala comercial. *P. aduncum* ocorre em todo território brasileiro, porém, os quimiotipos bioprospectados na Amazônia Ocidental são os que apresentam teores de dilapiol mais elevados (MAIA *et al.*, 1998). Walia *et al.*, (2004) apontaram o dilapiol como o produto com maior possibilidade de suceder o PBO.

Com vistas a disponibilizar opções ao manejo da resistência de *S. frugiperda* aos inseticidas organofosforados e carbamato, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito sinérgico do óleo essencial de *P. aduncum* (OEPA) em combinação com formulações comerciais de organofosforados sobre *S. frugiperda*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do óleo essencial de *P. aduncum* e dos inseticidas

Brotações de plantas de *P. aduncum* com idade de um ano e na fase reprodutiva foram coletadas no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Acre (10° 1'27.53"S, 67°41'22.59"O), em março de 2015. Após o corte das plantas a 0,4 m do solo, folhas foram submetidas à secagem em estufa, até 30% de umidade. O óleo essencial foi obtido em um extrator por arraste de vapor utilizando sistema de caldeira (modelo VFR-600- diesel- ECAL).

A análise cromatográfica do óleo foi efetuada em cromatógrafo a gás (CG) HP5890, equipado com coluna de sílica fundida Agilent HP5 (30 m x 0,32 mm d.i. x 0,25 m de espessura do filme), tendo hélio como gás de arraste a 1 mL min⁻¹, além disso foi acoplada à CG a espectrometria de massa (CG-EM). Os constituintes voláteis foram identificados por comparação dos espectros de massas e índices de retenção contidos na base de dados. A composição do óleo apresentou como componente majoritário dilapiol (71,9%).

As formulações dos inseticidas organofosforados a base de Profenofós (Curacron® 500, 500g L⁻¹ CE, Syngenta), Fenitrotiona (Sumithion® 500, 500g L⁻¹ CE, Sumitomo Chemical Company Ltd.), Clorpirifós (Vexter® 480g L⁻¹, Dow AgroSciences Industrial Ltda.) e metilcarbamato de oxima Metomil (Lannate® BR 215g L⁻¹ CS, Du Pont do

Brasil S.A) foram adquiridas em casas de comercialização de agrotóxicos. O butóxido de piperonila utilizado foi de grau técnico de 90% da Sigma Aldrich®.

Condições ambientais e inseto alvo utilizado

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Entomologia da Embrapa Acre e em todos eles foram utilizadas lagartas de 3º instar de *S. frugiperda*, obtidas de uma criação artificial. Os indivíduos foram confinados em placas de Petri (6,0 cm x 1,5 cm) e mantidos em câmaras climatizadas tipo B.O.D. à temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h.

Determinação das doses e concentrações letais

As diferentes concentrações do óleo essencial, dos inseticidas e das combinações sinérgicas foram obtidas a partir de soluções-estoque submetidas às diluições em acetona.

Inicialmente, foram determinadas as doses e concentrações letais (DL_{50} e CL_{50}) para lagartas de *S. frugiperda*, submetidas ao tratamento com o OEPA, assim como para cada inseticida comercial.

Posteriormente, para avaliação do efeito sinérgico, foram realizadas combinações das doses e concentrações subletais do óleo essencial (metade e um quarto da DL_{50} ou CL_{50} , respectivamente) com as doses e concentrações subletais dos inseticidas comerciais (abaixo das DL_{40} ou CL_{40} , respectivamente).

Bioensaios toxicológicos preliminares

Foram obtidas faixas de resposta que corresponderam aos intervalos de concentrações, e doses que ocasionaram mortalidades de lagartas de *S. frugiperda* próximas a zero e a 100%. Dessa faixa de concentrações e doses foram obtidas faixas mais estreitas de resposta, seguindo-se a metodologia descrita por Finney (1971). Foram estabelecidas sete concentrações/doses para as avaliações toxicológicas definitivas; e um controle (solvente) para cada combinação considerada.

Bioensaios toxicológicos definitivos

Por contato tópico, aplicaram-se, na face dorsal no pronoto das lagartas de *S. frugiperda*, 1,0 µL dos tratamentos a serem avaliados com auxílio de uma microseringa graduada. Para avaliações por contato residual, utilizou-se papel filtro de 5 cm de diâmetro impregnado com 0,2 mL de cada concentração dos tratamentos. Após a secagem, em capela de exaustão, os papéis-filtro foram colocados nas placas de Petri, recebendo cada placa uma lagarta de *S. frugiperda*. Nas duas avaliações de toxicidade por contato,

os insetos não receberam alimentação, ficando expostos aos tratamentos por 24 horas. Findo esse período, foi avaliada a mortalidade de todos os indivíduos.

A toxicidade do óleo essencial de *Piper aduncum* L. (OEPA) para as lagartas de *S. frugiperda* avaliada por contato residual e por contato tópico foi expressa pela CL_{50} de $1,2 \times 10^{-2}$ µL cm⁻² e pela DL_{50} de $1,1 \times 10^{-4}$ µL mg inseto.

Esses valores de letalidade definiram os valores adotados como doses subletais para as combinações sinérgicas com os inseticidas e obedeceram as seguintes proporções: metade e um quarto da DL_{50} do óleo essencial, correspondente a $5,5 \times 10^{-5}$ ($\frac{1}{2}$ DL_{50} OEPA) e $2,8 \times 10^{-5}$ µL mg inseto⁻¹ ($\frac{1}{4}$ DL_{50} OEPA), respectivamente, que foram utilizados em avaliações de contato tópico e $6,0 \times 10^{-3}$ ($\frac{1}{2}$ CL_{50} OEPA) e $3,0 \times 10^{-3}$ µL cm⁻² ($\frac{1}{4}$ CL_{50} OEPA), correspondente a metade e a um quarto da CL_{50} , respectivamente, que foram utilizados nas avaliações por contato residual.

Para as avaliações das combinações das doses e concentrações subletais do OEPA com os inseticidas, utilizou-se o mesmo procedimento adotado anteriormente, obtendo-se, assim, as novas concentrações e as doses das combinações sinérgicas, com probabilidade de causar 50% de mortalidade das lagartas (CL_{50} e DL_{50} , respectivamente).

As mesmas doses e concentrações subletais dos inseticidas utilizadas nas combinações com o óleo foram combinadas com o PBO na proporção de 10:1 (PBO: Inseticida), para comparação do efeito sinérgico da OEPA.

Estatística experimental

Todos os bioensaios foram instalados no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de cada concentração ou combinação (inseticida + óleo essencial). Foram utilizadas dez lagartas individualizadas em placas de Petri como repetição, perfazendo um total de 40 indivíduos para cada tratamento.

Os valores de mortalidade dos tratamentos foram corrigidos pela mortalidade do controle. Foram determinadas as curvas de concentração-mortalidade pela análise de Probit, utilizando-se o programa de análises estatísticas SAS (SAS Institute, 2001), obtendo-se as concentrações e as doses com probabilidade de causar 50% de mortalidade das lagartas (CL_{50} e DL_{50} , respectivamente) do OEPA, de cada inseticida, e das combinações sinérgicas entre eles.

O cálculo do Fator de Sinergismo (FS) foi baseado em Guedes *et al.* (1995), sendo $FS = DL_{50}$ ou CL_{50} do inseticida/ DL_{50} ou CL_{50} Inseticida + OEPA ou PBO. Foi considerado significativo o efeito sinérgico do OEPA quando os valores do FS e seus respectivos IC (intervalo de confiança), calculados para cada combinação de um determinado inseticida, eram maiores ou iguais aos valores do FS e do IC obtidos para a combinação do mesmo inseticida com o PBO.

O valor do coeficiente angular das curvas de concentração-mortalidade foi utilizado no estabelecimento do aumento de toxicidade relativa promovida pela OEPA e pelo PBO. Maiores coeficientes angulares indicam menor variação fenotípica na resposta da população do inseto a esses compostos (CHILCUTT; TABASHNIK, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito por contato residual, expresso pela CL_{50} das combinações sinérgicas do OEPA com os inseticidas

avaliados, apontou toxicidade suficiente para a promoção da mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* (Tabela 1).

Em relação aos fatores de sinergismo para esta via de contaminação (Tabela 1), foram observados valores significativos para as duas combinações de concentrações subletais ($\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da CL_{50} do OEPA) para todos os inseticidas organofosforados. Já para o carbamato Metomil, não houve diferença significativa dos FS em relação ao PBO para as concentrações subletais do OEPA. Destaca-se o valor de FS (29,2) proporcionado pela combinação de $\frac{1}{4}$ da CL_{50} do OEPA com Fenitrotiona, o maior dentre os obtidos para essa via de contaminação, quando comparado com as demais combinações que incluíram o óleo essencial.

Tabela 1 - Toxicidade das combinações de inseticidas de organofosforados e carbamato sintéticos com o óleo essencial de *Piper aduncum* L. para lagartas de *Spodoptera frugiperda* por contato residual (n= 280)

Table 1 - Toxicity of the combinations of organophosphorus and carbamate insecticides with *Piper aduncum* L. essential oil to *Spodoptera frugiperda* larvae via residual contact (n= 280)

Combinações inseticidas	CL_{50} (IC 95%) ($\mu\text{L cm}^{-2}$)	FS	Coefficiente Angular \pm EPM
OEPA	$1,2 \times 10^{-2}$ ($7,1 \times 10^{-3}$ - $1,8 \times 10^{-2}$)	-	$0,52 \pm 0,04$
Profenofós	$6,8 \times 10^{-3}$ ($5,6 \times 10^{-3}$ - $8,2 \times 10^{-3}$)	-	$0,71 \pm 0,05$
Profenofós +1/2 OEPA	$1,3 \times 10^{-3}$ ($8,9 \times 10^{-4}$ - $1,6 \times 10^{-3}$)	5,4 (5,1 - 6,2)*	$0,48 \pm 0,06$
Profenofós +1/4 OEPA	$8,8 \times 10^{-4}$ ($7,3 \times 10^{-4}$ - $1,0 \times 10^{-3}$)	7,7 (1,2 - 7,9) *	$0,61 \pm 0,06$
Profenofós +PBO	$1,3 \times 10^{-1}$ ($1,1 \times 10^{-1}$ - $1,7 \times 10^{-1}$)	0,054 (0,049 - 0,054)	$0,85 \pm 0,07$
Fenitrotiona	$1,7 \times 10^{-3}$ ($1,3 \times 10^{-3}$ - $2,1 \times 10^{-3}$)	-	$0,62 \pm 0,05$
Fenitrotiona +1/2 OEPA	$4,4 \times 10^{-4}$ ($2,7 \times 10^{-4}$ - $7,9 \times 10^{-4}$)	3,9 (2,7 - 5,0)*	$0,48 \pm 0,07$
Fenitrotiona +1/4 OEPA	$5,8 \times 10^{-5}$ ($2,3 \times 10^{-5}$ - $8,6 \times 10^{-5}$)	29,2 (24,7 - 58,2)*	$0,36 \pm 0,07$
Fenitrotiona + PBO	$4,0 \times 10^{-4}$ ($2,9 \times 10^{-4}$ - $5,4 \times 10^{-4}$)	4,2(3,9 - 4,7)	$0,50 \pm 0,06$
Clórpirifós	$5,3 \times 10^{-5}$ ($4,0 \times 10^{-5}$ - $6,9 \times 10^{-5}$)	-	$0,41 \pm 0,03$
Clórpirifós +1/2 OEPA	$1,6 \times 10^{-5}$ ($1,3 \times 10^{-5}$ - $2,0 \times 10^{-5}$)	3,4 (3,2 - 3,5)*	$0,69 \pm 0,04$
Clórpirifós +1/4 OEPA	$6,8 \times 10^{-6}$ ($4,5 \times 10^{-6}$ - $9,1 \times 10^{-6}$)	7,8 (7,6 - 9,0)*	$0,54 \pm 0,06$
Clórpirifós + PBO	$3,0 \times 10^{-5}$ ($2,3 \times 10^{-5}$ - $4,3 \times 10^{-5}$)	1,7 (1,6 - 1,7)	$0,65 \pm 0,10$
Metomil	$8,3 \times 10^{-3}$ ($5,8 \times 10^{-3}$ - $1,2 \times 10^{-2}$)	-	$0,19 \pm 0,02$
Metomil +1/2 OEPA	$4,8 \times 10^{-4}$ ($1,9 \times 10^{-4}$ - $1,2 \times 10^{-3}$)	17,2 (9,8 - 30,8)	$0,20 \pm 0,02$
Metomil +1/4 OEPA	$5,0 \times 10^{-4}$ ($2,7 \times 10^{-4}$ - $9,0 \times 10^{-4}$)	16,5 (12,8 - 21,8)	$0,22 \pm 0,02$
Metomil + PBO	$7,3 \times 10^{-6}$ ($2,7 \times 10^{-6}$ - $1,7 \times 10^{-5}$)	1.139,0 (686,8 - 2176,6)	$0,15 \pm 0,01$

n = número total de insetos submetidos ao ensaio; OEPA= óleo essencial de *P. aduncum*; $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ OEPA= metade e um quarto da concentração letal do óleo de *P. aduncum*; PBO= Butóxido de piperonila; CL_{50} = Concentrações Letais que causam 50% de mortalidade dos insetos; IC 95% = Intervalo de Confiança a 95% de probabilidade; FS (DL_{50}) = Fatores de Sinergismo calculados em função das Concentrações Letais; (*) Indica diferença significativa em relação ao FS da combinação com BPO; e EPM= Erro padrão da média.

n = total number of insects submitted to the test; OEPA= *P. aduncum* essential oil; $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$ OEPA= half and a quarter of the CL_{50} of *P. aduncum* essential oil; PBO= piperonyl butoxide; CL_{50} = lethal concentration causing 50% of mortality of insects; IC 95% = confidence interval with 95% of probability; FS (CL_{50}) = synergistic factor calculated regarding the lethal concentrations; FS (CL_{50}) = Synergy Factor for to lethal concentrations; (*) indicates a significant difference regarding the FS of the combination with BPO; and EPM = standard error of the mean.

Os valores dos coeficientes angulares da curva de concentração-mortalidade para o contato residual foram baixos. No entanto, valores acima do observado para o inseticida considerado de forma isolada ocorreu na combinação do Profenofós com $\frac{1}{4}$ da CL_{50} do OEPA, e nas combinações de $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da CL_{50} do OEPA com o Clorpirifós e Metomil. Como consequência dessa homogeneidade de resposta é esperada uma diminuição na pressão de seleção para a resistência dessa população de lagartas quando

submetidas às combinações sinérgicas do OEPA com Profenofós, Clorpirifós e Metomil.

O inverso pode ser constatado para todas as combinações do OEPA com a Fenitrotiona, que apresentou indícios de aumento de pressão de seleção para a resistência da população de insetos utilizada nessa avaliação.

Por contato tópico, todos os inseticidas em combinações com o OEPA apresentaram toxicidade às lagartas de *S. frugiperda* (Tabelas 2). Os valores do fator de sinergismo

Tabela 2 - Toxicidade das combinações de inseticidas de organofosforados e carbamato sintéticos com o óleo essencial de *Piper aduncum* L. para lagartas de *Spodoptera frugiperda* por contato tópico (n= 280)

Table 2 - Toxicity of the combinations of organophosphorus and carbamate insecticides with *Piper aduncum* L. essential oil to *Spodoptera frugiperda* larvae via topical contact (n= 280)

Combinações inseticidas	DL ₅₀ (IC 95%) (μ L mg inseto ⁻¹)	FS	Coefficiente Angular \pm EPM
OEPA	$1,1 \times 10^{-4}$ ($6,3 \times 10^{-5}$ - $1,6 \times 10^{-4}$)	-	0,33 \pm 0,04
Profenofós	$3,8 \times 10^{-5}$ ($3,2 \times 10^{-5}$ - $4,6 \times 10^{-5}$)	-	0,62 \pm 0,04
Profenofós +1/2 OEPA	$4,8 \times 10^{-3}$ ($3,1 \times 10^{-3}$ - $5,5 \times 10^{-3}$)	0,008 (0,008– 0,010)	0,30 \pm 0,02
Profenofós +1/4 OEPA	$7,1 \times 10^{-6}$ ($3,7 \times 10^{-6}$ - $1,1 \times 10^{-5}$)	5,4 (4,3 – 8,5) *	0,39 \pm 0,05
Profenofós +PBO	$1,8 \times 10^{-4}$ ($1,0 \times 10^{-4}$ - $4,0 \times 10^{-4}$)	0,2 (0,1 – 0,3)	0,27 \pm 0,03
Fenitrotiona	$4,5 \times 10^{-4}$ ($3,7 \times 10^{-4}$ - $5,4 \times 10^{-4}$)	-	0,59 \pm 0,06
Fenitrotiona +1/2 OEPA	$7,1 \times 10^{-5}$ ($5,1 \times 10^{-5}$ - $1,3 \times 10^{-4}$)	6,3 (4,2 – 7,2)	0,36 \pm 0,06
Fenitrotiona +1/4 OEPA	$1,3 \times 10^{-5}$ ($1,2 \times 10^{-5}$ - $1,5 \times 10^{-5}$)	33,8 (31,0 – 36,5) *	0,99 \pm 0,10
Fenitrotiona + PBO	$1,6 \times 10^{-5}$ ($1,4 \times 10^{-5}$ - $1,9 \times 10^{-5}$)	27,6 (27,1 – 28,0)	0,87 \pm 0,09
Clórpirifós	$2,5 \times 10^{-5}$ ($2,0 \times 10^{-5}$ - $3,3 \times 10^{-5}$)	-	0,64 \pm 0,08
Clórpirifós +1/2 OEPA	$1,0 \times 10^{-5}$ ($6,1 \times 10^{-6}$ - $1,6 \times 10^{-5}$)	2,5 (2,1 – 3,4) *	0,34 \pm 0,05
Clórpirifós +1/4 OEPA	$1,4 \times 10^{-4}$ ($1,2 \times 10^{-4}$ - $1,6 \times 10^{-4}$)	0,18 (0,16 – 0,20)	0,35 \pm 0,07
Clórpirifós + PBO	$2,2 \times 10^{-5}$ ($8,5 \times 10^{-6}$ - $5,3 \times 10^{-5}$)	1,2 (0,6 – 2,4)	0,19 \pm 0,04
Metomil	$6,7 \times 10^{-6}$ ($4,4 \times 10^{-6}$ - $9,7 \times 10^{-6}$)	-	0,37 \pm 0,02
Metomil +1/2 OEPA	$6,1 \times 10^{-6}$ ($4,0 \times 10^{-6}$ - $8,9 \times 10^{-6}$)	1,1 (1,09 – 1,11)	0,36 \pm 0,02
Metomil +1/4 OEPA	$7,2 \times 10^{-6}$ ($5,1 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-5}$)	0,93 (0,87 – 0,94)	0,99 \pm 0,02
Metomil + PBO	$7,9 \times 10^{-7}$ ($4,4 \times 10^{-7}$ - $1,3 \times 10^{-6}$)	8,4 (7,7 – 9,9)	0,87 \pm 0,03

n = número total de insetos submetidos ao ensaio; OEPA= óleo essencial de *P. aduncum*; $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ OEPA= metade e um quarto da dose letal do óleo de *P. aduncum*; PBO= Butóxido de piperonila; DL₅₀ = Doses Letais que causam 50% de mortalidade dos insetos; IC 95% = Intervalo de Confiança a 95% de probabilidade; FS (DL₅₀) = Fatores de Sinergismo calculados em função das Doses Letais; (*) Indica diferença significativa em relação ao FS da combinação com BPO; e EPM= Erro padrão da média.

n = total number of insects submitted to the test; OEPA= *P. aduncum* essential oil; $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$ OEPA= half and a quarter of the DL50 of *P. aduncum* essential oil; PBO= piperonyl butoxide; DL50 = lethal doses causing 50% of mortality of insects; IC 95% = confidence interval with 95% of probability; FS (DL50) = synergistic factor calculated regarding the lethal doses; FS (CL50) = Synergy Factor for to lethal doses; (*) indicates a significant difference regarding the FS of the combination with BPO; and EPM = standard error of the mean.

(FS), proporcionados pelo OEPA, foram significativos quando combinados com os inseticidas organofosforados nas doses equivalentes à $\frac{1}{4}$ de suas DL_{50} , no caso do inseticida Profenofós (FS= 5,4) e Fenitrotiona (FS=33,8). O mesmo nível de significância foi obtido quando $\frac{1}{2}$ DL_{50} do óleo foi combinada com o inseticida Clorpirifós (FS= 2,5). Já as duas doses de efeito subletais do OEPA combinadas com o carbamato Metomil não apresentaram efeito sinérgico significativo para esse modo de contaminação (Tabela 2).

Destaca-se o valor do FS proporcionado pela combinação de $\frac{1}{4}$ da DL_{50} do OEPA com Fenitrotiona, o maior dentre os obtidos para essa via de contaminação quando comparado com as demais combinações que incluíram tanto o óleo essencial quanto o PBO.

As combinações dos inseticidas Fenitrotiona com $\frac{1}{2}$ da DL_{50} do OEPA e Metomil com $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da DL_{50} do OEPA aplicadas topicamente apresentaram valores de coeficientes angulares das curvas de dose-mortalidade superiores aos inseticidas considerados de forma isolada (Tabela 2). As demais combinações, além de apresentarem baixos valores desse coeficiente, elas foram menores que os inseticidas considerados de forma isolada.

Como consequência dessa homogeneidade de resposta para as combinações do OEPA com Fenitrotiona e Metomil, espera-se uma diminuição na pressão de seleção para a resistência dessa população de lagartas pela via de contaminação tópica. O inverso pode ser afirmado para as demais combinações dos inseticidas organofosforados, os quais apresentam indícios de aumento de pressão de seleção para a resistência da população de insetos utilizada nesta avaliação.

Ao contrário do que se poderia esperar, nas duas vias de contaminação avaliadas, foram observados, para a maioria dos inseticidas organofosforados, valores maiores de FS para as combinações do OEPA utilizadas a $\frac{1}{4}$ da CL_{50} ou DL_{50} do OEPA em comparação à metade das respectivas CL_{50} ou DL_{50} (Tabelas 1 e 2). Tais resultados podem ser atribuídos às respostas das diferentes proporcionalidades das combinações dos inseticidas com o OEPA, que obedecem ao índice de equivalência que classifica as combinações como aditivas, sinérgicas ou antagônicas (RAMAKRISHNAN; JUSKO, 2001).

Independentemente do modo de contaminação considerado, os inseticidas organofosforados apresentaram, ao menos em uma combinação com o OEPA, efeito sinérgico significativo, destacando-se a contaminação por contato residual, na qual todas as combinações demonstraram-se significativamente superiores ao PBO, reconhecidamente um sinérgico para esse grupo de inseticidas (BECKEL *et al.*, 2006).

Para Cochran (1997), a melhoria da resposta por contato residual pode estar relacionada ao período mais longo de exposição do inseto a xenobióticos, o que pode justificar o resultado obtido.

Considerando-se que os óleos essenciais, de uma maneira geral, podem atuar tanto em enzimas digestivas e neurológicas como também interagir com o tegumento do inseto (ISMAN, 2006), uma provável dificuldade de penetração na cutícula das lagartas da combinação do OEPA com os inseticidas avaliados pode ter sido uma das causas dos baixos valores do FS DL_{50} observados em relação à contaminação por contato tópico. Por outro lado, embora se acredite que o intestino seja a primeira linha de defesa do inseto, quando uma substância tóxica é ingerida, os corpos gordurosos apresentam uma função semelhante quando o inseticida é aplicado topicamente (YU *et al.*, 2003).

Os valores dos FS para Fenitrotiona combinada com $\frac{1}{4}$ da CL_{50} e DL_{50} do OEPA foram significativamente maiores que os valores do FS em relação ao PBO, indicando eficácia da combinação nas proporções avaliadas. De certa forma, esse resultado poderia, até certo ponto, ser esperado uma vez que o PBO apresentou um efeito antagonista para a Fenitrotiona, diminuindo significativamente a toxicidade do inseticida para *Oryzaephilus surinamensis* (L., 1758) (Coleoptera: Silvanidae) (BECKEL *et al.*, 2006). Todavia, a espécie do inseto alvo da experimentação deve ser considerada, pois para *S. frugiperda*, o FS por contato tópico foi de 27,6 para a combinação da Fenitrotiona com o PBO, contrapondo-se aos resultados obtidos por esses autores.

Na avaliação de outros inseticidas organofosforados, como o Metamidofós, os valores de FS nas combinações com o PBO variaram de 7,9 a 14,3 (ESPINOSA *et al.*, 2005) e para o Diclorvós de 0,9 a 1,4 (BERNARD *et al.*, 1993). Isso demonstra que o OEPA, avaliado como sinérgico de organofosforados, é promissor, uma vez que algumas combinações de doses e concentrações com os inseticidas desse grupo apresentaram FS acima dos relatados anteriormente (máximo de 33,8 para a Fenitrotiona).

Embora o PBO seja considerado um inibidor de monooxigenases P450, as evidências científicas demonstram que ele também inibe esterases associadas à resistência dos insetos (YOUNG *et al.*, 2005), o que pode justificar o efeito sinérgico quando combinado aos inseticidas organofosforados.

Dilapiol também apresenta um efeito inibidor de esterases, porém a reação não ocorre imediatamente após a aplicação, exigindo cerca de 3 a 4 horas para manifestar o efeito, podendo ocorrer à restauração das enzimas após 12 horas do tratamento (SHANKARGANESH *et al.* 2009).

Para os inseticidas organofosforados avaliados nas combinações com o OEPA, a interferência biológica foi confirmada pela letalidade dos insetos, apresentando-se de forma irreversível após o período de 24 horas, não havendo indícios de restauração da atividade enzimática das esterases envolvidas no processo.

Os valores significativos do FS para o Clorpirifós nas combinações com OEPA em $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da CL_{50} por contato residual e $\frac{1}{2}$ DL_{50} por contato tópico.

No entanto, Hatano e Scott (1993) determinaram que a mesma monooxigenase P450 que participa da desintoxicação de piretróides está também envolvida na ativação do Clorpirifós, demonstrando que essas enzimas são capazes de realizar uma grande variedade de reações metabólicas, e que as P450 tem uma especificidade de substrato imprevisível.

Pela atividade inseticida demonstrada pelas combinações do OEPA com o Clorpirifós, pode-se inferir que sendo as monooxigenases P450 numerosas e diversas dentro do grupo das hemiproteínas, provavelmente o óleo essencial não tenha inibido, pelo menos parcialmente, aquelas enzimas responsáveis pela ativação desse inseticida.

Com relação ao carbamato Metomil, embora tenham sido obtidos valores de FS elevados, para as duas combinações com o OEPA por contato residual (17,2 e 16,5), o critério adotado para a obtenção da significância, comparando esses valores com as mesmas combinações com o PBO (FS= 1.139,0), não permitiu que essas mesmas combinações fossem consideradas sinergicamente eficazes, ressaltando-se ainda que esses resultados foram superiores aos obtidos por Bernard *et al.* (1993) para o inseticida considerado.

Tanto o dilapiol quanto o PBO possuem em sua molécula o anel metilenodioxifil que, dependendo do tipo de radical acoplado ao seu carbono alfa, poderá apresentar alterações na atividade sinérgica para esse grupo de inseticidas (WILKINSON *et al.*, 1966). Dessa forma, não seria prudente o descarte do OEPA como sinérgico do inseticida Metomil, uma vez que Tomar *et al.* (1978) comprovou o potencial sinérgico de derivados de dilapiol combinados com Carbaril, outro inseticida do grupo dos carbamatos, obtendo valores significativamente maiores do FS em relação a combinações com o PBO.

A alternância dos valores dos coeficientes angulares das combinações dos inseticidas organofosforados com o OEPA em função do tipo de contaminação, seja por contato residual ou tópico, não permitiram definições conclusivas sobre a homogeneidade de resposta e conseqüentemente da pressão de seleção com relação a esse grupo de inseticidas a *S. frugiperda*. Já o Metomil quando combinado com quaisquer doses ou concentrações de OEPA apresentou os valores dos coeficientes angulares maiores que o inseticida considerado isoladamente, confirmando a menor pressão de seleção para a população de *S. frugiperda* submetida a esse inseticida durante o ensaio.

Alterações na atividade de esterases em função da proporção do agente sinérgico dilapiol em comparação com seus derivados foram reportadas para *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera, Noctuidae) (SHANKARGANESH *et al.* 2009). Tais alterações evidenciam a necessidade do estudo de isobogramas, que definem as proporcionalidades entre o OEPA e o inseticida,

devido aos valores dos FS observados nas comparações entre $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ das doses e/ou concentrações letais, dentro de um mesmo modo de contaminação.

O OEPA apresenta-se como uma ferramenta adicional ao manejo de resistência desse inseto a inseticidas, sendo uma opção de interesse comercial como substituto do PBO (WALIA *et al.*, 2004).

Além disso, existem questionamentos com relação à segurança da utilização do PBO, devido às constatações de toxicidade subaguda e crônica em vários organismos, incluindo a indução de pigmentação anormal em penas de galinha, tumores hepatocelulares em ratos quando alimentados com esse sinérgico na dieta e tosse não infecciosa em crianças expostas a PBO durante a gestação. Tais efeitos negativos tem impedido renovação de registros de formulações contendo PBO (LIU *et al.* 2014).

CONCLUSÕES

O OEPA não apresenta efeito sinérgico significativo quando combinado com o inseticida Metomil, independentemente da via de contaminação;

Metomil combinado com o OEPA não apresenta aumento da pressão de seleção para resistência na população avaliada de lagartas de *S. frugiperda*, independentemente do tipo de contaminação;

Fenitrotiona, Profenofós e Clorpirifós combinados com OEPA apresentam fatores de sinergismo significativos nas duas vias de contaminação para lagartas de *S. frugiperda*;

Fenitrotiona é o inseticida que apresenta o maior valor dentre os fatores de sinergismo quando combinado com $\frac{1}{4}$ da dose ou concentração letal do OEPA;

Não é possível definir conclusivamente sobre a homogeneidade de resposta das combinações dos inseticidas organofosforados com o OEPA para a população de *S. frugiperda* avaliada;

As combinações do óleo essencial de *P. aduncum* com os inseticidas a base de Fenitrotiona, Profenofós e Clorpirifós indicam ser esse óleo essencial uma opção ao PBO no manejo de resistência de *S. frugiperda* a esses organofosforados.

AGRADECIMENTOS

Aos assistentes de pesquisa Valdemir de Souza e Silva, Pedro Pereira da Silva e Adilson Reis Barreto; analistas: John Lennon Mesquita Catão, Charles Rodrigues da Costa e Rubens Mamédio Bastos pelos serviços laboratoriais e de campo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas.

LITERATURA CIENTÍFICA CITADA

- APRD, 2016. Arthropod Pesticide Resistance Database. Disponível em: <http://www.pesticideresistance.com/display.php?page=species&arId=200>. Acesso em: 11 fev. 2016.
- BECKEL, H. dos S.; LORINI, I.; LAZZARINI, S.M.N. Efeito do sinérgico butóxido de piperonila na resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) a deltametrina e fenitrotiom. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 50, n. 1, p. 110-114, 2006.
- BERNARD, C., PHILOGENE, B.J.R. Inseticidas synergists: role, importance, and perspectives. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 38, p. 199-233, 1993.
- BERNARD, C.B.; KRISHINAMURTY, H.G.; CHAURET, D.; DURST, T.; PHILOGENE, B.J.R.; SANCHES-VINDAS, P.; HASBAUN, C.; POVEDA, L.; ROMAN, L.S.; ARNASON, J.T. Insecticidal defenses of piperaceae from the neotropics. **Journal Chemical Ecology**, v. 21, p. 801-814, 1995.
- BOTTON, M.; CARBONARI, J.J.; GARCIA, M.S.; MARTINS, J.F. Preferência alimentar de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz e capim arroz. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, p. 207-212, 1998.
- CASIDA, J.E. Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 18, p. 753-772, 1970.
- CHILCUTT, C.F.; TABASHINK, B.E. Evolution of pesticide resistance and slope of the concentration-mortality line: are they related?. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, n. 1, p. 11-20, 1995.
- COCHRAN, D.G. Misuse of the tarsal-contact method for detecting insecticide resistance in the German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 90, n. 6, p. 1441-1444, 1997.
- CORTEZ, M. G. R.; WAQUIL, J. M. Influência de cultivar e nível de infestação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no rendimento do sorgo. In: Congresso Nacional de Milho E Sorgo, 1997, Jaboticabal, **Anais...** Londrina: Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, 1997, p. 407-410.
- ESPINOSA, P.J.; CONTRERAS, J.; QUINTO, V.; GRAVALOS, C. FERNANDEZ, E.; BIELZA, P. Metabolic mechanisms of insecticide resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). **Pest Management Science**, v. 61, p. 1009-1015. 2005.
- 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: Embrapa- CPAF/AC, 2006. 53 p. (Documentos, 103).
- FINNEY, D. J. Probit analysis. London: Cambridge University, 1971. 33p.
- GUEDES, R.N.; PICANÇO, M.C.; GUEDES, N.M.P.; MADEIRA, N.R. Sinérgico do óleo mineral sobre a toxicidade de inseticidas para *Scrobipalpus absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 313-318, 1995.
- GUEDES, R.N.C.; OLIVEIRA E.E. Resistência a inseticidas-pragas do cafeeiro: Situação e perspectivas, In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). O estado da arte de tecnologias na produção de café. UFV, Viçosa, 2002, p. 471-497.
- HATANO, R.; SCOTT, J.G. Anti-P450_{pr} antiserum inhibits the activation of chlorpyrifos to chlorpyrifos oxon in house fly microsomes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 45, p. 228-233, 1993).
- ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and increasingly regulated word. **Annual Review of Entomology**. v. 51, p. 45-66, 2006.
- 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, 2014.
- MAIA, J.G.S.; ZOGHBI, M.G.S.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.S.; SILVA, M.H.L.da, LUZ, A.I.R.; BASTOS, C.N. Constituintes of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing in the Amazon Region. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 269-272, 1998.
- MAPA/AGROFIT, 2016. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Coordenação- Geral de Agrotóxicos e Afins. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 12 jan. 2016.

- RAMAKRISHNAN, R.; JUSKO, W. J. Interactions of aspirin and salicylic acid with prednisolone for inhibition of lymphocyte proliferation. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 2035–2042, 2001.
- RAYMOND, B.; SAYED, A.H.; WRIGHT, D.J. Genes and environment interact to determine the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 272, p. 1519–1524, 2005.
- RIBEIRO, R. da S. Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil, Piracicaba, São Paulo. 2014. 86f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- ROCHA, S.F.R.; MING, L.C. *Piper hispidinervum*: a sustainable source of saffrole. In: JANICK, J. (ed.), Perspectives on new crops and news uses. Alexandria: ASHS Press, 1999. p. 479-481.
- SAS Institute. User's Guide: Statistics, Version 8.2, 6th Edition. SAS Institute, Cary, NC. 2001. 95 p.
- SHANKARGANESH, K.; SUBAHMANYAM, B.; WALIAAND S.; DHINGRA, S. Dillapiole mediated esterase inhibition in insecticide resistant *Spodoptera litura* (Fabricius). **Pesticide Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-147, 2009.
- TOMAR, S.S.; SAXENA, V.S.; MAHESHWARI, M.L., SARUP, P.; MUKERJEE, S.K. New Carbaryl synergist derived from dillapiole. **Indian Journal of Entomology**, v. 40, n. 02, p. 115-116, 1978.
- WALIA, S.; SAHA, S.; PARMAR, B.S. Liquid chromatographic method for the analysis of two plant based insecticide synergists dillapiole and dihydrodillapiole. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p. 229–233, 2004.
- YOUNG, S. J.; GUNNING, R.V. ; MOORES G.D. The effect of piperonyl butoxide on pyrethroid-resistance-associated esterases in *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 61, p. 397–401, 2005.
- YU S.J.; NGUYEN S.N.; ABO-ELGHAR G.E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 77, p. 1–11. 2003.
- WILKINSON, C.; METCALF, R.L. et al. Some structural requirements of methylenedioxyphenyl derivatives as synergists of carbamate insecticides. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 14, p. 73-79, 1966.