

Rio Branco, AC / Agosto, 2024



Formulação da fração intermediária do óleo de *Piper aduncum* L. como sinergista de inseticidas químicos

Murilo Fazolin⁽¹⁾, André Fábio Medeiros Monteiro⁽²⁾, Humberto Ribeiro Bizzo⁽³⁾, Natalia da Silva Maisforte⁽⁴⁾, Maria Érica Costa de Lima⁽⁵⁾ e Paola Ervatti Gama⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Pesquisador, Embrapa Acre, Rio Branco, AC. ⁽²⁾ Analista, Embrapa Acre, Rio Branco, AC. ⁽³⁾ Pesquisador, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ. ⁽⁴⁾ Bióloga, estudante de mestrado da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC. ⁽⁵⁾ Engenheira-agrônoma, estudante de mestrado da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC. ⁽⁶⁾ Analista, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Resumo – O uso de compostos sinérgicos em combinação com inseticidas químicos é uma estratégia para o manejo da resistência de insetos, mas há poucas opções de produtos comerciais com essa propriedade. O aproveitamento das frações do óleo essencial de *Piper aduncum* L. (Oepa) é considerado ambientalmente sustentável pela redução de resíduos. Portanto, o desenvolvimento de formulações a partir dessas frações enriquecidas por adição de *blends* de compostos pode ser uma opção sinérgica para inseticidas químicos, sendo esse o objetivo deste trabalho. Utilizaram-se para a elaboração do *blend* 27 monoterpenoides, 3 sesquiterpenoides e 7 fenilpropanoides combinados com a fração intermediária (50,00% de dilapiol) do Oepa nas proporções de 2,00, 10,00 e 25,00%. A toxicidade dos tratamentos foi diferenciada pela comparação dos fatores de sinergismo (FSs) e coeficientes angulares das retas obtidas da regressão da resposta concentração-mortalidade. A fração enriquecida ou não com os diferentes compostos foi sinérgica para os inseticidas metomil e ciflutrina; ocorreu uma tendência de decréscimo dos valores dos FSs com o aumento da concentração percentual do *blend* de compostos na combinação da fração com o inseticida metomil; o maior valor do FS foi observado para a ciflutrina combinada com a fração sem enriquecimento, porém necessitando de um tempo maior para a promoção da mortalidade de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith); esse inseticida, comparado aos demais, apresentou maior resposta sinérgica em todas as proporções na combinação com o *blend* de compostos avaliados; a fração sem qualquer enriquecimento combinada ao inseticida dursban apresentou efeito antagônico.

Termos para indexação: fenilpropanoides, destilação fracionada, óleo essencial, resistência de insetos, dilapiol.

Formulation of the intermediate fraction of *Piper aduncum* L. oil as a synergist for chemical insecticides

Abstract – The utilization of synergistic compounds alongside chemical insecticides represents a promising strategy for manage insect resistance.

Embrapa Acre
Rodovia BR-364, km 14, sentido
Rio Branco/Porto Velho
Caixa Postal 321
69900-970 Rio Branco, AC
www.embrapa.br/acre
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
Presidente
Elias Melo de Miranda
Secretária-executiva
Claudia Carvalho Sena

Membros
Carlos Mauricio Soares de Andrade,
Celso Luis Bergo, Evandro Orfanó
Figueiredo, Rivaldalve Coelho
Gonçalves, Rodrigo Souza Santos,
Romeu de Carvalho Andrade Neto,
Tadário Kamel de Oliveira,
Tatiana de Campos e
Virgínia de Souza Álvares

Edição executiva
e revisão de texto
Claudia Carvalho Sena e
Suely Moreira de Melo

Normalização bibliográfica
Renata do Carmo França Seabra
(CRB-11/1044)

Projeto gráfico
Leandro Sousa Fazio

Diagramação
Francisco Carlos da Rocha Gomes

Publicação digital: PDF

Todos os direitos
reservados à Embrapa.

The availability of commercial products embodying this approach remains limited. Leveraging essential oil fractions derived from *Piper aduncum* L. (Oepa) presents an environmentally sustainable alternative, owing to its waste reduction benefits. Consequently, this study aims to develop formulations utilizing these fractions, enhanced by the incorporation of compound *blends*, as a synergistic option for chemical insecticides. In the formulation process, 27 monoterpenoids, 3 sesquiterpenoids, and 7 phenylpropanoids were incorporated with the intermediate fraction (50.00% dillapiole) of Oepa in varying proportions of 2.00, 10.00 and 25.00%. The toxicity of these treatments was assessed through the comparison of synergism factors (FS) and angular coefficients derived from concentration-mortality response. Both the enriched and non-enriched fractions demonstrated synergism with the insecticides methomyl and cyfluthrin. Furthermore, there was an trend of decreasing FS values with increasing *blend* concentration in the methomyl combination. Cyfluthrin exhibited the highest FS value when combined with the fraction lacking enrichment, albeit requiring a longer duration to induce mortality in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) larvae compared to other insecticides. Cyfluthrin displayed a more pronounced synergistic response across all *blend* proportions evaluated. However, it's worth mentioning that the fraction without any enrichment, when combined with the insecticide dursban, exhibited an antagonistic effect.

Index terms: phenylpropanoids, fractional distillation, essential oil, insect resistance, dillapiole.

Introdução

O desenvolvimento de um produto fitossanitário implica um processo longo, geralmente levando de 10 a 12 anos desde a descoberta de um composto químico até o início de sua produção em larga escala. Os custos associados a esse desenvolvimento são significativos, girando em torno de US\$ 250 milhões (Do Laboratório [...], 2019). Paralelamente, o processo de obtenção de proteção patentária no Brasil requer em média 12 anos (Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2021) a partir do depósito da patente. Durante o período de proteção, muitas vezes os agroquímicos perdem parte de sua eficácia devido à evolução da resistência dos organismos-alvo, como insetos e ácaros-praga, o que afeta negativamente sua comercialização.

Embora não haja dados atualizados, Oliveira (2017) observou que a resistência evoluiu para 56

ingredientes ativos de pesticidas comercializados no Brasil, abrangendo 22,00% dos 254 inseticidas e acaricidas categorizados pelo Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas (Irac). Os ingredientes afetados pertencem a 22 grupos distintos, com os organofosforados, ciclodieno organoclorados e piretroides/piretrinas registrando o maior número de casos de resistência.

O uso intensivo de inseticidas tem levado à rápida evolução da resistência em muitos insetos, impulsionando a busca por produtos novos e mais seguros (Akhtar; Isman, 2013). Uma das estratégias é o uso de sinérgicos em combinação com inseticidas, embora produtos comerciais com essa propriedade sejam menos utilizados devido à escassez de opções de compostos sinérgicos disponíveis (Fazolin et al., 2016a).

O butóxido de piperonila (PBO) é o sinergista mais comumente usado pela indústria de agroquímicos. Sintetizado desde 1947, oferece diversas possibilidades de formulação, especialmente em combinação com piretrinas, piretroides, rotenona e carbamatos (Knowles, 1991; Tozzi, 1998). Além disso, os óleos essenciais (OEs) também podem atuar como sinergistas, inibindo enzimas metabólicas detoxificativas relacionadas ao mecanismo bioquímico de resistência.

Os OEs são frequentemente mais eficazes do que os compostos isolados, e há evidências de que seus componentes minoritários podem atuar como sinergistas, aumentando o efeito dos componentes majoritários por meio de vários mecanismos (Akhtar; Isman, 2013). Com base no conhecimento das interações entre compostos, foram desenvolvidas formulações com misturas de OEs para maximizar a eficácia dos produtos inseticidas. Por exemplo, a EcoSMART Technologies desenvolveu pesticidas contendo diferentes misturas de óleos de alecrim, hortelã-pimenta, capim-limão, cravo, canela e/ou monoterpenos como ingredientes ativos (Isman; Tak, 2017).

Piper aduncum L. (Piperaceae) é uma espécie abundante no Acre, e seu óleo essencial, rico em dilapiol, tem mostrado efeito sinérgico para vários inseticidas químicos e naturais, como Neem, Toosendanin, Tenulin, Rotenona, Piretrum e óleo de Tansy (Handa; Dewan, 1974; Lichtenstein et al., 1974; Bernard et al., 1990; Bernard; Philogène, 1993; Larocque et al., 1999; Liu et al., 2014; Fazolin et al., 2015, 2016a, 2016b, 2016c, 2017).

A Embrapa Acre tem obtido frações do óleo de *P. aduncum* ricas em dilapiol por meio de fracionamento, resultando em duas outras frações distintas como resíduos. O aproveitamento sustentável

dessas frações, em vez do descarte, é considerado desejável para promover uma economia circular e reduzir a geração de resíduos (Fontgalland, 2022).

Para o enriquecimento da fração intermediária do óleo, foram selecionados compostos com base em sua ocorrência em plantas do gênero *Piper* e disponibilidade no mercado. Compostos como alfa-pineno, limoneno, 1,8-cineol, timol, metil eugenol, dilapiol, sarisan ou asaricina foram considerados devido à sua abundância e facilidade de obtenção (Fazolin et al., 2022). Esses compostos visam aumentar a eficácia sinérgica dos inseticidas e promover o aproveitamento sustentável das frações de óleo antes consideradas resíduos.

O desenvolvimento de formulações para o manejo da resistência dos insetos, por meio de frações químicas do óleo essencial de *P. aduncum* enriquecidas com diferentes compostos, busca aumentar a eficácia dos inseticidas e promover a sustentabilidade na agricultura. Essa abordagem não apenas oferece uma alternativa sustentável para o controle de pragas, mas também amplia a utilização de recursos da biodiversidade amazônica na indústria de agroquímicos, contribuindo para a geração de novos produtos comerciais e melhoria da eficácia dos produtos existentes.

Esta publicação está de acordo com o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável). Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) são uma coleção de 17 metas globais estabelecidas pela Assembleia Geral das Nações Unidas e contam com o apoio da Embrapa para que sejam atingidas.

Material e métodos

Obtenção das frações do óleo essencial de *Piper aduncum* L., identificação e quantificação dos constituintes

Toda a produção do óleo essencial e experimentação relatada neste trabalho foram conduzidas na Embrapa Acre, localizada na Rodovia BR-364, km 14, sentido Rio Branco-Porto Velho, no município de Rio Branco, Acre.

Plantas de *P. aduncum* foram coletadas em área de produção da Embrapa Acre, separando-se somente as folhas e talos finos para secagem. O óleo essencial foi obtido em um destilador, utilizando o princípio de arraste de vapor em um sistema de caldeira aquecida a diesel. O óleo essencial foi redestilado por meio do sistema de destilação fracionada, utilizando coluna empacotada (segredo industrial). O processo teve a duração de 4 horas,

coletando-se três frações que foram caracterizadas quimicamente.

Os óleos e as frações retificadas foram analisados por cromatografia em fase gasosa em equipamento Agilent 7890A com detector de ionização de chama (CG-DIC) e coluna capilar HP-5-MS (5,00%-fenil-95,00%-metilsilicone, 30,00 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O detector foi operado a 280 °C e o injetor a 250 °C. As amostras foram dissolvidas a 0,10% em hexano e 1,00 µL foi injetado com divisão de fluxo (1:20). A temperatura do forno variou de 60 a 240 °C, a uma taxa de 3 °C min⁻¹. O gás carreador usado foi o hidrogênio (1,50 mL min⁻¹). Para a quantificação, as áreas brutas obtidas no CG-DIC foram normalizadas utilizando-se um padrão interno (octanoato de metila) e corrigidas com os fatores de resposta teóricos em planilha Excel (Bizzo et al., 2020) expressos como área relativa percentual.

A identificação foi realizada em cromatógrafo Agilent 7890A acoplado a espectrômetro de massas Agilent 5775C (CG-EM), operado no modo ionização eletrônica (70 ev), taxa de varredura de 3,15 scan s⁻¹, na região de 35 a 350 u. As temperaturas da linha de transferência, fonte de ionização e analisador foram de 260, 200 e 150 °C, respectivamente. O hélio foi utilizado como gás carreador (1,00 mL min⁻¹). A coluna e demais condições de análises foram as mesmas utilizadas para a análise quantitativa. A caracterização química foi feita pela comparação dos espectros de massas obtidos no banco de dados do CG-EM e pelo cálculo dos índices de retenção linear (IRLs), que foram comparados com dados da literatura (Adams, 2007). Para a determinação dos IRLs, foi injetada uma mistura de alcanos lineares (C₉ a C₂₆) e calculados os índices segundo Van den Dool e Kratz (1963).

Dessa forma, puderam ser definidas, tomando-se como referência os diferentes teores de dilapiol, as três frações: terpênic, intermediária e fenilpropanoica. Nessa fase experimental, foi considerada apenas a fração intermediária.

Adição de compostos às frações retificadas para a composição de *blends*

Após a caracterização química da fração intermediária do Oepa foi elaborado um *blend* completo pela combinação de 36 compostos presentes em grande parte nos óleos essenciais de Piperaceae, adquiridos na sua forma purificada na Sigma Aldrich Brasil com pureza superior a 98,00%.

Foram utilizados 7 fenilpropanoídeos: anetol, eugenol, miristicina, *p*-anisaldeído, (*E*)-cinamaldeído, sarisan e dilapiol; 12 monoterpenos: (-)-β-pineno, (-)-α-pineno, (+)-limoneno, (+)-3-careno, mirceno,

o-cimeno, *p*-cimeno, sabineno, terpinoleno, α -felandreno, α -terpineno, γ -terpineno; 14 monoterpênos oxigenados: (-)-terpinen-4-ol, *L*-carvona, (+)-carvona, citronelal, (-)-endo-borneol, carvacrol, nerol, eucaliptol (1,8 cineol), geraniol, isoborneol, *L*-linalol, *L*-mentona, timol e α -terpineol; 1 sesquiterpêno: β -cariofileno; e 2 sesquiterpênos oxigenados: nerolidol e óxido de cariofileno.

Inicialmente, apenas um *blend* completo foi produzido e armazenado em geladeira doméstica a 6 °C, utilizando-se quantidade equivalente de cada composto (1:1) (Tak et al., 2017) em três proporções diferentes no enriquecimento da fração intermediária.

Foram utilizadas três proporções do *blend* completo de compostos na combinação com cada fração: 2,00% (V/V) (1,00 μ L de cada composto líquido e 1,00 μ g de cada composto sólido), 10,00% (V/V) (5,60 μ L de cada composto líquido e 5,60 μ g de cada composto sólido) e 25,00% (V/V) (13,90 μ L

de cada composto líquido e 13,90 μ g de composto sólido) completados em vidro âmbar até que o volume final atingisse 2,00 mL. Esses frascos foram fechados com batoque e tampa rosqueada, permanecendo sob refrigeração até o momento de sua utilização. De forma resumida, a porcentagem de participação de cada grupo químico na composição da fração intermediária (F2), antes e após a adição dos diferentes percentuais do *blend* de compostos, pode ser observada na Figura 1.

Dessa forma, foram submetidas à avaliação do efeito sinérgico essas proporções do *blend* completo (2,00, 10,00 e 25,00% (V/V)) em combinação com os inseticidas dursban (organofosforado), ciflutrina (piretroide sintético) e metomil (carbamato), todos adquiridos na forma purificada na Sigma Aldrich. Os tratamentos assim constituídos foram comparados entre si e pela combinação do butóxido de piperonila (PBO), tomado a dez vezes (Stewart, 1998), com a DL_{40} de cada inseticida.

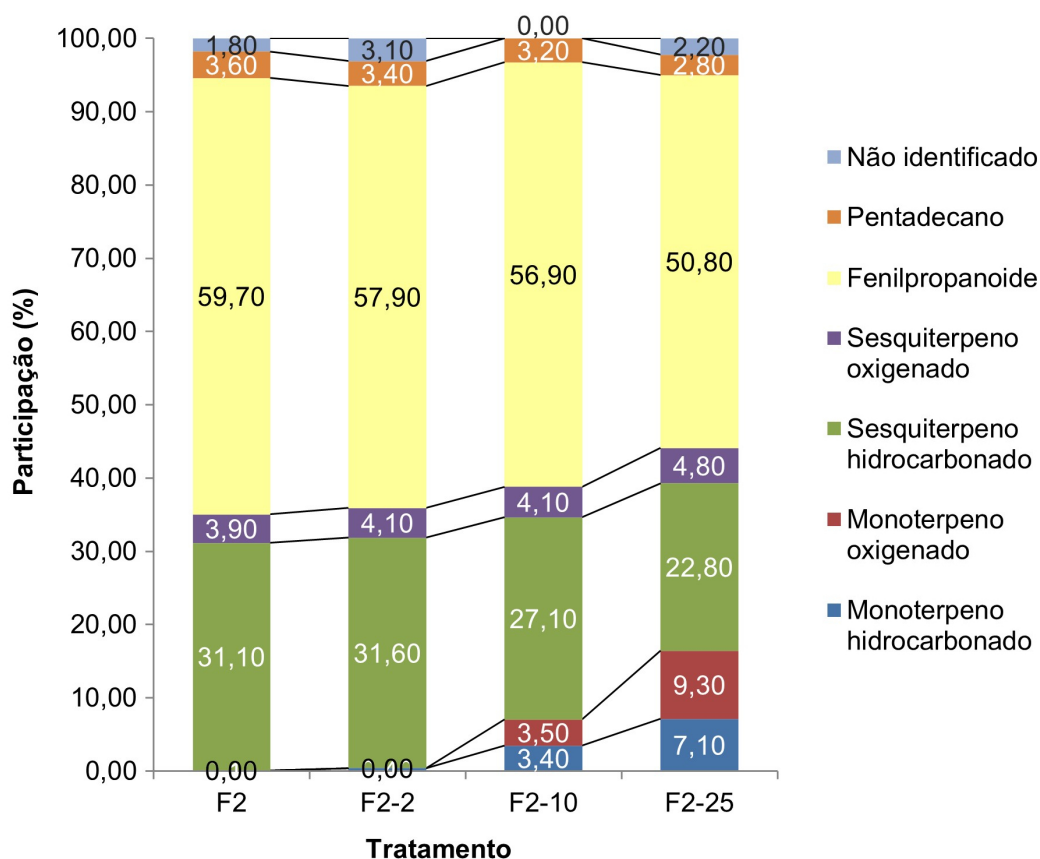


Figura 1. Porcentagem de participação de cada grupo químico utilizado na composição da fração intermediária (F2) após a adição dos diferentes percentuais do *blend* de compostos: F2-2 (enriquecida a 2,00%), F2-10 (enriquecida a 10,00%) e F2-25 (enriquecida a 25,00%).

Avaliação toxicológica das combinações das frações do óleo essencial de *Piper aduncum* L. com os inseticidas

Para cada inseticida e cada uma das combinações do *blend* completo foi adotada a metodologia a seguir:

Em todos os bioensaios foram utilizadas larvas de terceiro instar da espécie *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), obtidas por meio de uma criação artificial de insetos, conforme metodologia proposta por Shmidt et al. (2001).

Inicialmente, foram realizados testes preliminares com o propósito de determinar os padrões ideais para experimentação seguindo-se a metodologia descrita por Finney (1971).

Foram estabelecidas entre cinco e sete concentrações de cada tratamento de forma isolada, 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 50,00% de mortalidade (DL_{50}) para cada inseticida e/ou formulação a ser avaliada.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Em todos os bioensaios definitivos, lagartas de *S. frugiperda*, no terceiro instar, foram confinadas isoladamente em placas de Petri (5,00 x 1,50 cm), mantidas em câmara climatizada à temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de $70,00 \pm 5,00\%$ 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.

Os bioensaios toxicológicos por contato tópico consistiram na aplicação, com auxílio de uma microsseringa graduada, de 1,00 μ L de cada tratamento a ser avaliado no dorso do pronoto das larvas de *S. frugiperda* que já estavam individualizadas nas placas de Petri. As placas foram organizadas sequencialmente em bandeja de plástico transparente retangular, sendo armazenadas em câmara climatizada BOD com temperatura controlada de 25 ± 2 °C e fotofase de 12 horas.

Em todos os bioensaios os dados de mortalidade de concentração-resposta foram submetidos à análise de Probit, utilizando-se o programa de análises estatísticas SAS (SAS Institute, 2001) para determinar a DL_{50} de cada combinação testada. Os valores de mortalidade foram corrigidos pela mortalidade da testemunha utilizando-se a fórmula de Abbott (1925).

Avaliação do potencial sinérgico das combinações de compostos com as frações do óleo essencial de *Piper aduncum* L. em relação aos inseticidas

A partir dos resultados das análises de Probit, descritas anteriormente, foi tomado um meio das DL_{50} de cada fração combinada com as diferentes proporções dos *blends* para uma nova combinação com as DL_{40} de cada inseticida, visando manter o princípio da avaliação de sinergia, segundo Bernard e Philogène (1993).

A partir desse ponto, novos valores da DL_{50} foram obtidos para as combinações, utilizando-se a análise de Probit.

As eficácias sinérgicas das combinações avaliadas foram comparadas por meio do valor do fator de sinergismo (FS), baseado em Guedes et al. (1995), ($FS = DL_{50}$ i.a. inseticida/ DL_{50} do inseticida combinado com o sinérgico) revelando a potência relativa das combinações consideradas. Para a diferenciação dos tratamentos com relação ao efeito sinérgico, foi considerada como diferença significativa a ausência da sobreposição dos valores dos intervalos de confiança a 95,00% dos FSs das combinações avaliadas (Van Frankenhuyzen, 2009) e, conseqüentemente, a sobreposição desses valores indica a ausência de diferença significativa entre os tratamentos comparados.

Além disso, foram consideradas como sinérgicas as combinações cujo valor do FS tenha sido maior que 1. Por outro lado, valores de FS iguais a 1 e abaixo de 1 indicaram efeitos aditivos e antagônicos, respectivamente (Abbassy et al., 2009).

Outro parâmetro avaliado para todas as combinações foram os valores do coeficiente angular obtido na análise de Probit admitida como uma regressão linear. Tal coeficiente indica a rapidez da resposta de mortalidade quando o inseto-alvo é submetido a pequenas variações de doses das combinações (Carvalho et al., 2017), demonstrando o espectro da correlação de sensibilidade entre a mortalidade e a concentração do tratamento. Os maiores valores desse coeficiente na comparação dos tratamentos indicam que um menor intervalo de tempo é necessário para promover a mortalidade do alvo e, conseqüentemente, os menores valores indicam que um maior intervalo de tempo é necessário para expressar a letalidade do xenobiótico (Araújo et al., 2012).

Resultados e discussão

Análise da fração intermediária do óleo essencial de *Piper aduncum* L.

As três frações destiladas foram denominadas tomando-se como referência os diferentes teores

de dilapiol: fração terpênica (26,00%), fração intermediária (59,10%) e fração fenilpropanoica (85,30% de dilapiol). Nessa fase experimental foi considerada apenas a fração intermediária, caracterizada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição (área %) da fração intermediária do óleo essencial de *Piper aduncum* L.

Composto identificado	IRL _{calc} ⁽¹⁾	IRL _{lit} ⁽²⁾	Área (%)
α -pineno	931	932	n.q. ⁽³⁾
canfeno	945	946	n.q.
sabineno	970	969	n.q.
β -pineno	974	974	0,1
mirreno	989	988	n.q.
α -felandreno	1.002	1.002	n.q.
δ -3-careno	1.009	1.008	n.q.
α -terpineno	1.015	1.014	n.q.
<i>p</i> -cimeno	1.022	1.022	n.q.
limoneno	1.025	1.024	n.q.
1,8-cineol	1.029	1.026	n.q.
(<i>Z</i>)- β -ocimeno	1.034	1.032	n.q.
(<i>E</i>)- β -ocimeno	1.044	1.044	n.q.
γ -terpineno	1.054	1.054	n.q.
terpinoleno	1.085	1.086	n.q.
linalol	1.099	1.095	n.q.
neo-allo-ocimeno	1.137	1.140	n.q.
mentona	1.150	1.148	n.q.
isoborneol	1.152	1.155	n.q.
borneol	1.161	1.165	n.q.
terpinen-4-ol	1.174	1.174	n.q.
α -terpineol	1.188	1.186	n.q.
carvona	1.240	1.239	n.q.
piperitona	1.250	1.249	n.q.
(<i>E</i>)-anetol	1.281	1.282	n.q.
acetato de bornila	1.281	1.284	n.q.
safrol	1.285	1.285	n.q.
n.i. ⁽⁴⁾	1.321	–	n.q.

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Composto identificado	IRL _{calc} ⁽¹⁾	IRL _{lit} ⁽²⁾	Área (%)
timol	1.291	1.289	n.q.
carvacrol	1.300	1.298	n.q.
δ -elemeno	1.330	1.335	0,2
α -cubebeno	1.343	1.348	0,3
n.i.	1.357	–	n.q.
ciclosativeno	1.359	1.369	0,2
α -ylangeno	1.364	1.373	n.q.
α -copaeno	1.369	1.374	1,1
β -cubebeno	1383	1.387	0,2
β -elemeno	1.385	1.389	0,4
α -gurjuneno	1.401	1.409	0,2
(<i>E</i>)-cariofileno	1.413	1.417	17,4
β -copaeno	1.421	1430	0,5
γ -elemeno	1.426	1.434	0,2
aromadendreno	1.430	1.439	n.q.
α -humuleno	1.445	1.452	3,2
β -santaleno	1.452	1.457	0,9
<i>allo</i> -aromadendreno	1.452	1.458	n.q.
<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	1.466	1.475	0,2
n.i.	1.469	–	1,3
γ -muuroleno	1.470	1.478	n.q.
germacreno D	1.472	1480	n.q.
γ -curcumeno	1473	1.481	n.q.
β -selineno	1.477	1.489	n.q.
<i>trans</i> -muurola-4(14),5-dieno	1.483	1.493	n.q.
n.i.	1.487	–	0,5
biciclogermacreno	1.488	1.494	n.q.
asaricina	1.491	1.495	n.q.
<i>n</i> -pentadecano	1.495	1.500	3,6
(<i>E,E</i>)- α -farneseno	1.503	1.505	0,2
β -bisaboleno	1.503	1.505	n.q.
δ -amorfenol	1.508	1.511	0,3
cubebol	1.508	1.514	0,3
miristicina	1.516	1.517	n.q.

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Composto identificado	IRL _{calc} ⁽¹⁾	IRL _{lit} ⁽²⁾	Área (%)
δ-cadineno	1.516	1.522	4,5
(Z)-nerolidol	1.528	1.531	n.q.
trans-cadina-1,4-dieno	1.525	1.533	0,5
α-calacoreno	1.535	1.544	0,6
elemicina	1.555	1.555	0,6
germacreno B	1.547	1.559	n.q.
(E)-nerolidol	1.559	1.561	0,9
espatulenol	1.569	1.577	0,5
óxido de cariofileno	1.574	1.582	1,3
viridiflorol	1.583	1.592	0,9
epóxido de humuleno II	1.600	1.608	n.q.
dilapiol	1.619	1.620	59,1
Total de componentes identificados			98,2
Total de monoterpenos			0,1
Total de monoterpenoides oxigenados			0,0
Total de sesquiterpenos			32,9
Total de sesquiterpenoides oxigenados			3,9
Outros			63,3

⁽¹⁾ Índice de retenção linear experimental (IRL_{calc}), calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963). ⁽²⁾ Índice de retenção linear da literatura (IRL_{lit}) (Joulain; König, 1998; Adams, 2007). ⁽³⁾ Não quantificado (n.q.) (<0,10%). ⁽⁴⁾ Não identificado (n.i.).

Traço (-): informação não aplicável.

Efeito sinérgico da combinação do inseticida metomil com a fração intermediária (F2) do óleo essencial de *Piper aduncum* L. enriquecida com um blend de compostos

Independentemente da combinação do inseticida metomil com a fração intermediária do Oepa, quer enriquecida com os diferentes compostos ou não, assim como com o butóxido de piperonila (PBO), foram observados efeitos sinérgicos significativos (FSs > 1) em todos os tratamentos. Tal tendência de resultado pode ainda ser observada, independentemente da porcentagem de participação do blend de compostos, na composição da combinação (Figura 2).

O maior valor de FS = 1,94 (IC = 1,83–1,95) observado para o metomil combinado com o butóxido de piperonila não diferiu significativamente do valor de FS = 1,93 (IC = 1,77–2,00) obtido para a combinação desse inseticida com a fração sem enriquecimento, assim como da fração enriquecida com 2,00% (V/V) do blend completo de compostos [FS = 1,87 (1,62–1,98)]. A partir desse ponto, os valores dos FSs foram significativamente decrescentes, na seguinte ordem de combinação do metomil, com fração enriquecida com 25,00% (V/V) do blend completo de compostos [FS = 1,42 (1,34–1,43)] e com 10,00% (V/V) do blend de compostos [FS = 1,23 (1,19–1,23)].

Dessa forma, pode-se constatar uma tendência de decréscimo dos valores dos FSs à medida que aumenta a quantidade do *blend* na combinação.

Os carbamatos, como o metomil, possuem ação inseticida por inibir enzimas acetilcolinesterases (AChE), classe de esterases que regula os níveis de acetilcolina, ao catalisar a hidrólise dessa acetilcolina nos terminais dos impulsos nervosos dos insetos. Carbamatos ligam-se ao sítio ativo dessa enzima e a inibem irreversivelmente, gerando um acúmulo de acetilcolina, resultando na morte do inseto (Aldridge, 1950).

Portanto, uma alteração do mecanismo de acetilcolinesterase produz um espectro amplo de resistência aos inseticidas do tipo carbamato (São Paulo, 2001). A fração intermediária apresentou uma quantidade insignificante de monoterpenos (0,01%). No entanto, alguns compostos desse grupo químico adicionados a essa fração possuem teoricamente a capacidade de inibir esterases e são relatados como sinergistas de inseticidas do tipo carbamato

(Tong; Bloomquist, 2013). Assim, os monoterpenoides β -pineno, limoneno, α -terpineno, γ -terpineno, terpinen-4-ol, eucaliptol, linalol, timol, carvacrol e mentona poderiam ter influenciado no discreto efeito sinérgico, principalmente quando combinados em enriquecimentos de maior proporcionalidade (10,00 e 25,00% (V/V)), o que não pôde ser observado. Por inibir várias enzimas da família das esterases, o mais provável nesse caso é que o sesquiterpeno (*E*)-cariofileno tenha tido a maior influência na sinergia, uma vez que participou de forma majoritária em 17,40% da composição final da fração intermediária. A tendência positiva dessa participação pode ser evidenciada somente na combinação da fração com 2,00% (V/V) com o *blend* de compostos. A partir desse ponto, observaram-se decréscimos inesperados dos valores do FS mesmo que a porcentagem da participação do (*E*)-cariofileno na composição final da fração enriquecida tenha se mantido sem alterações significativas.

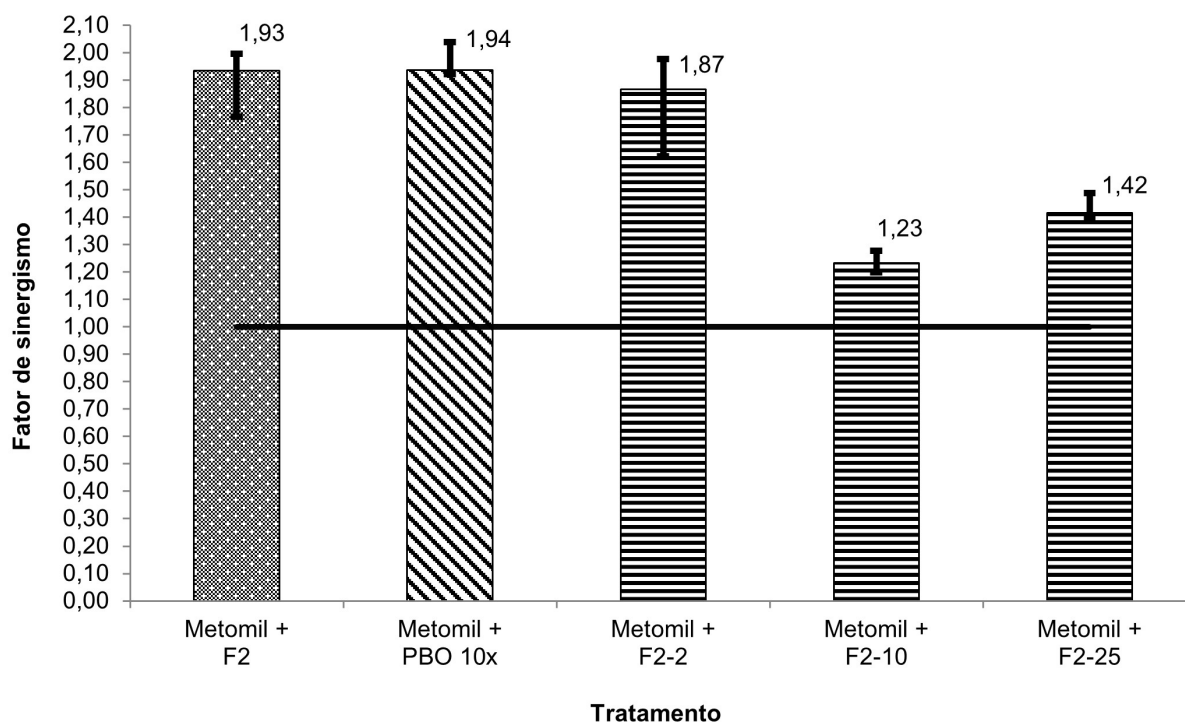


Figura 2. Fatores de sinergismo da fração intermediária (F2) com adição de butóxido de piperonila – PBO (10 vezes) e após a combinação dos diferentes percentuais do *blend* de compostos: F2-2 (enriquecida a 2,00%), F2-10 (enriquecida a 10,00%) e F2-25 (enriquecida a 25,00%), combinados com o inseticida metomil para o controle de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797).

Adicionalmente, os fenilpropanoides presentes na composição do óleo como elemicina (0,60%) e dilapiol (59,10%) e suas variações de combinação com o *blend* podem ter um papel importante na expressão do efeito sinérgico, uma vez que inibem não somente esterases como também monooxigenases dependentes do citocromo P450 e glutathione S-transferase (Lichtenstein et al., 1974; Liu, 2015).

Esses valores do FS para o inseticida metomil combinado com a fração intermediária do Oepa, independentemente do enriquecimento com o *blend* de compostos, foram discretamente superiores do que aqueles obtidos por Fazolin et al. (2017), quando avaliaram o efeito sinérgico do Oepa com 71,90% de dilapiol com esse inseticida pela via de contaminação tópica sobre larvas de *S. frugiperda* (variação do FS entre 0,93 e 1,10). No entanto, pela via de contaminação residual, os FSs obtidos por Fazolin et al. (2017) (variação entre 16,5 e 17,2) foram maiores que os observados no presente trabalho. Isso pode demonstrar a importância do dilapiol como sinérgico de inseticidas inibidores de AChE a depender da via de contaminação do inseto-alvo.

Em observações anteriores a este trabalho, os valores dos fatores de sinergismo da fração terpênicica do Oepa, com as mesmas combinações de enriquecimento com esse inseticida, foram superiores aos observados para a fração intermediária neste trabalho, independentemente da porcentagem do *blend* de compostos adicionado a ela.

As esterases e as monooxigenases dependentes do citocromo P450 catalisam reações que envolvem o metabolismo xenobiótico e conseqüentemente a destoxificação de quase todas as classes de inseticidas (Hemingway; Ranson, 2000), ficando a cargo das glutathione S-transferases as reações por conjugação (Hemingway, 2000), que devem ser consideradas na avaliação da mortalidade dos insetos quando ocorrem alterações em seus respectivos mecanismos de atuação, principalmente quando são inibidas.

Esse complexo de reações enzimáticas pode não responder de forma linear à adição de compostos considerados inibidores das enzimas envolvidas no processo. A significativa redução do efeito sinérgico da fração intermediária, na medida em que o *blend* foi adicionado de forma crescente, pode ser explicada pelo antagonismo que geralmente ocorre entre alguns compostos quando associados em determinadas proporções ao mirceno, α -pineno e β -pineno (Pavela 2014, 2015), sendo possível a

redução do efeito sinérgico pela inativação cumulativa desses compostos. Pela presença crescente de monoterpenos hidrocarbonados no *blend*, o aumento de seus teores na composição da fração pode ter sido decisivo na queda dos valores do FS (Figura 2).

A complexidade dessas reações ao nível de fração do Oepa pode ainda ser amplificada quando estão envolvidos o α -pineno e β -pineno. Por se tratar de compostos com ação bivalente, podem inibir em certas condições e ativar em outras o mesmo grupo de família de enzimas como as monooxigenases P450 (Brattsten et al., 1977). Tais resultados podem exigir avaliações caso a caso na elaboração de formulações sinérgicas a partir de óleos essenciais ricos em α -pineno e β -pineno com outros compostos, com vistas a formulações inseticidas. Seria oportuna e melhor a relação entre a proporção desses compostos com os demais dentro da formulação, quando é definida na rota bioquímica da destoxificação a ocorrência da separação dos efeitos totalmente ambíguos para esse grupo enzimático durante a ação desses monoterpenos (Fazolin et al., 2022).

Ao mesmo tempo em que ocorreu um decréscimo na potencialização do metomil pela fração intermediária enriquecida com o *blend* de compostos a 10,00 e 25,00% (V/V), foi observado um valor significativamente alto do coeficiente angular (1,31 e 1,55, respectivamente) que diferiu do valor do coeficiente angular (1,81) da combinação desse inseticida com o PBO (Figura 3). Tal resultado indica que esses tratamentos apresentam uma resposta de mortalidade mais rápida diante de pequenas variações das concentrações das combinações comparadas (Carvalho et al., 2017). Isso implica em uma maior correlação de sensibilidade entre a mortalidade e a concentração da amostra e, conseqüentemente, em um menor intervalo de tempo necessário para a promoção da mortalidade do inseto-alvo (Araújo et al., 2012).

Valor considerado intermediário do coeficiente angular de 1,25 (1,11–1,40) foi observado para o inseticida tomado de forma isolada.

As combinações do metomil com a fração intermediária sem enriquecimento, fração enriquecida a 2,00% (V/V), consideradas como sinérgicas, apresentaram baixa velocidade de resposta à intoxicação do alvo, com valores do coeficiente angular de 0,77 (0,67–0,86) e 0,56 (0,53–0,59), respectivamente (Figura 3).

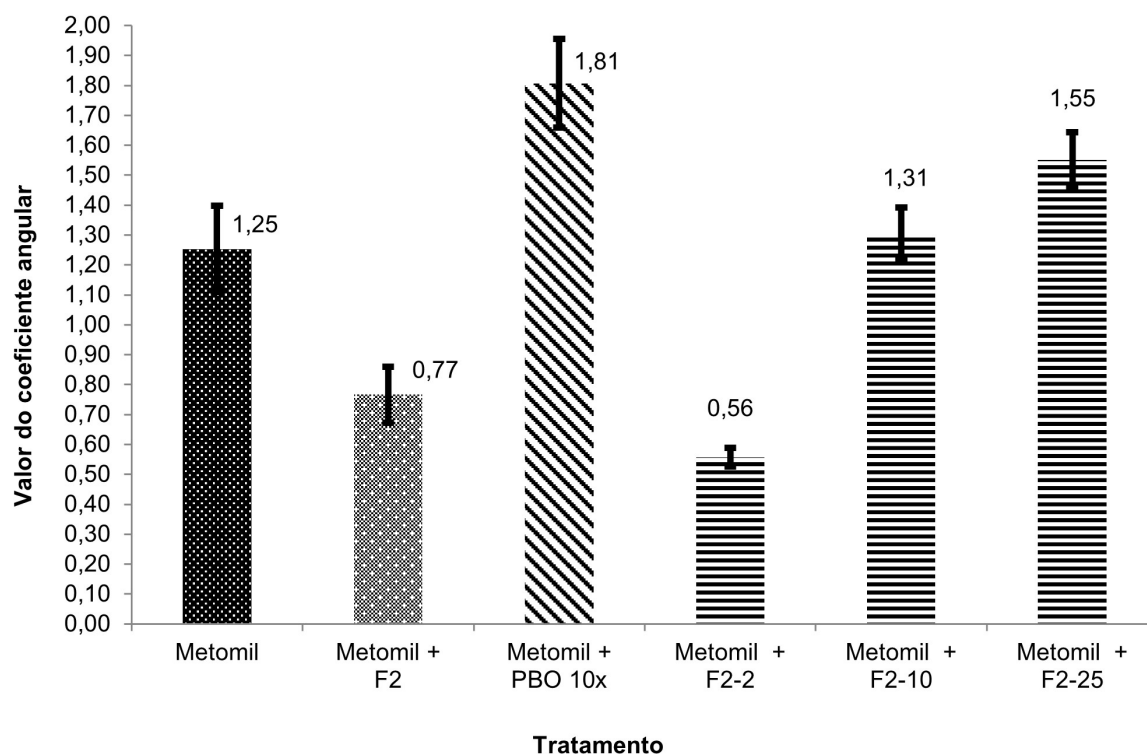


Figura 3. Coeficientes angulares das retas obtidas pela regressão linear de dose-resposta da fração intermediária (F2) com adição de butóxido de piperonila – PBO (10 vezes) e após a combinação dos diferentes percentuais do *blend* de compostos: F2-2 (enriquecida a 2,00%), F2-10 (enriquecida a 10,00%) e F2-25 (enriquecida a 25,00%), combinados com o inseticida metomil para o controle de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797).

Tomando-se como referência as particularidades de cada combinação e considerando-se os resultados extremos, um alto valor de potencialização do inseticida metomil, indicado pelo elevado valor do fator de sinergismo, quando combinado à fração intermediária sem enriquecimento, pode apresentar o inconveniente de uma lenta resposta de mortalidade em função do baixo valor do coeficiente angular. Por outro lado, uma baixa potencialização, embora sinérgica, observada nas combinações desse inseticida com a fração enriquecida adicionada a 10,00 e 25,00% (V/V), pode apresentar uma rápida resposta de mortalidade em função do alto valor do seu coeficiente angular.

Efeito sinérgico da combinação do inseticida dursban com a fração intermediária (F2) do óleo essencial de *Piper aduncum* L. enriquecida com um *blend* de compostos

Todas as combinações do inseticida dursban com as frações enriquecidas, independentemente da porcentagem proporcional do *blend* na combinação, apresentaram FSs > 1, indicando efeito sinérgico (Figura 4). Esses valores não diferiram

significativamente entre si e variaram de 1,36 a 1,14, considerando-se os intervalos de confiança. Embora considerados como indicadores do efeito sinérgico para o inseticida dursban, ficaram muito próximos do limite da aditividade.

A combinação do inseticida com o PBO, assim como com a fração intermediária do *Oepa* sem enriquecimento, apresentou efeito antagônico, revelado pelos valores dos FSs < 1 [FS = 0,24 (0,22–0,25) e 0,90 (0,79–0,98)], respectivamente (Figura 4).

Fazolin et al. (2017) determinaram, em larvas de *S. frugiperda* por via de contato tópico, FSs para diferentes inseticidas organofosforados combinados com *Oepa* com teor de dilapiol de 71,90%. Os valores do FS variaram para profenofós de 0,008 a 5,4; fenitrotiona de 6,3 a 33,8; e clorpirifós de 0,18 a 2,5. Com exceção do clorpirifós, maiores proporções do *Oepa* na combinação ocasionaram menores efeitos sinérgicos, indicando que a proporção do sinergista na combinação é outro fator de importância relevante. Esses resultados sugerem que as respostas para ação sinérgica ou antagônica podem ainda depender do tipo de inseticida fosforado considerado.

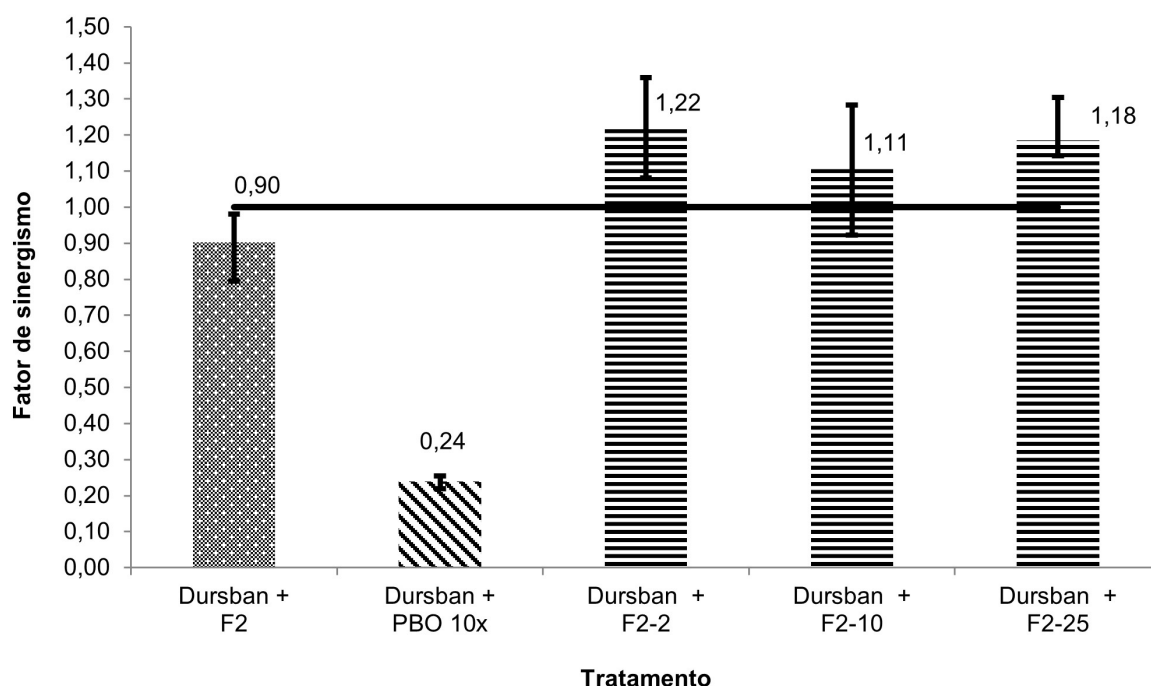


Figura 4. Fatores de sinergismo da fração intermediária (F2) com adição de butóxido de piperonila – PBO (10 vezes) e após a combinação dos diferentes percentuais do *blend* de compostos: F2-2 (enriquecida a 2,00%), F2-10 (enriquecida a 10,00%) e F2-25 (enriquecida a 25,00%), combinados com o inseticida dursban para o controle de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797).

Essa influência da proporcionalidade, tanto em combinações com princípios ativos de inseticidas químicos ou por *blends* de compostos sinérgicos, necessita do estabelecimento de proporções entre o agente a ser sinérgico e o sinérgico propriamente dito (Fazolin et al., 2022). Para tanto, a construção de isobogramas específicos na formulação desses agentes de controle é de fundamental importância. A descrição da ação conjunta de dois produtos/compostos por meio desse método permite que os princípios e alterações ligados à análise das associações possam ser claramente evidenciados (Kruse et al., 2006).

Os inseticidas fosforados como o dursban, após contato e/ou ingestão, agem como inibidores das enzimas acetilcolinesterases, responsáveis por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina. A enzima é fosforilada pelo inseticida, ficando inativa. Ocorre o acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, que provoca uma hiperatividade nervosa e conseqüente colapso do sistema nervoso. Além disso, também ocorre a dessensibilização do receptor de acetilcolina que cessa o impulso nervoso, levando o inseto à morte (Eldefrawi, 1976; Eldefrawi et al., 1982; São Paulo, 2001).

Portanto, uma alteração do mecanismo de acetilcolinesterase produz um espectro amplo de resistência aos inseticidas organofosforados, à

semelhança dos inseticidas tipo carbamato (São Paulo, 2001). Dessa forma, os mesmos compostos presentes na composição da fração intermediária possuem a capacidade de inibir esterases e são relatados como sinérgicos de inseticidas organofosforados (Lichtenstein et al., 1974; Abbassy et al., 2009; López; Pascual-Villalobos, 2010).

Deve ser ressaltado, no entanto, que a fosforilação da AChE envolve um conjunto complexo de reações que inclui outras enzimas. Dessa forma, dependendo do local específico em que ocorre a fosforilação e das características da quinase (enzimas responsáveis por adicionar grupo fosfato a resíduos de aminoácidos específicos em proteínas-alvo) envolvida, a fosforilação da AChE pode levar a diferentes resultados. Por exemplo, a fosforilação em determinadas posições pode resultar na inibição da atividade da AChE, enquanto em outras posições pode ter efeitos opostos (Jokanović, 2001).

No entanto, é importante observar que a fosforilação da acetilcolinesterase não é o principal mecanismo de regulação da AChE (Gigliolli et al., 2011) e sim a carbamilação, conforme discutido anteriormente. A fosforilação pode desempenhar um papel secundário na regulação da AChE, mas seu papel exato e os efeitos resultantes dependem do seu local específico e das quinases envolvidas (Jokanović, 2001).

Isso pode explicar a diferença de resposta entre o inseticida do tipo carbamato, metomil, em relação ao fosforado dursban, principalmente esse último, quanto ao antagonismo apresentado na sua combinação com a fração sem enriquecimento e com o butóxido de piperonila. Já a semelhança do efeito sinérgico observado pelos valores dos FSs para os dois inseticidas quando da adição do *blend* de compostos, independentemente da proporção, revela que possuem atividade sinérgica, mesmo que de forma discreta (Figuras 1 e 3).

Como mencionado anteriormente, monoterpenos com β -pineno, limoneno, α -terpineno, γ -terpineno, terpinen-4-ol, eucaliptol, linalol, timol, carvacrol e mentona, além do sesquiterpeno (*E*)-cariofileno, são reconhecidamente inibidores de esterases (Tong; Bloomquist, 2013) e estiveram presentes na composição da fração intermediária, bem como na composição obtida após a adição do *blend* de compostos em diferentes porcentagens. Dessa forma, podem contribuir na expressão do efeito sinérgico para o inseticida carbamato diferentemente do inseticida fosforado. O mesmo pode ser inferido para o efeito dos fenilpropanoides como miristicina, metil-eugenol e o dilapiol, que podem apresentar um papel importante na expressão do efeito sinérgico, uma vez que inibem não

somente esterases como também monooxigenases dependentes do citocromo P450 e glutatona S-transferase (Lichtenstein et al., 1974; Liu, 2015).

Como mencionado anteriormente, esse complexo de reações enzimáticas pode não responder de forma linear à adição de compostos considerados inibidores das enzimas envolvidas no processo.

Na comparação com os coeficientes angulares das combinações sinérgicas do *blend* de compostos com o inseticida dursban, o maior valor [1,38 (1,29–1,47)] foi observado para o inseticida sem nenhuma adição de compostos, diferindo significativamente dos demais valores dos coeficientes angulares dos outros tratamentos avaliados, à exceção da combinação do inseticida com a fração enriquecida com 25,00% (V/V) do *blend* de compostos [1,15 (0,98–1,31)] (Figura 5).

Não diferiram significativamente entre si os valores dos coeficientes angulares do inseticida dursban combinado com as frações: a) sem enriquecimento 0,69 (0,62–0,76); b) enriquecidas e adicionadas a 2,00% (V/V) ao inseticida 0,69 (0,63–0,75); e c) adição a 10,00% (V/V) 0,67 (0,60–0,75). O menor valor do coeficiente angular foi observado para a combinação do dursban com o PBO 0,51 (0,46–0,56), que diferiu significativamente de todos os demais tratamentos.

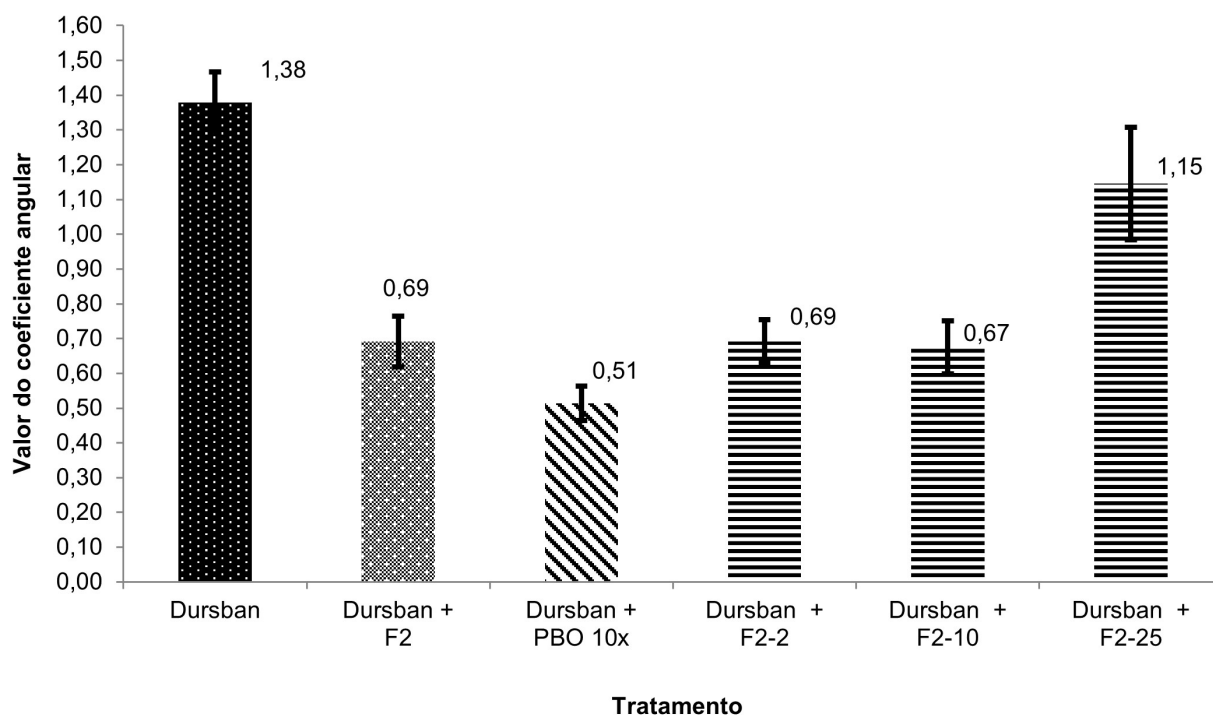


Figura 5. Coeficientes angulares das retas obtidas pela regressão linear de dose-resposta da fração intermediária (F2) com adição de butóxido de piperonila – PBO (10 vezes) e após a combinação dos diferentes percentuais do *blend* de compostos: F2-2 (enriquecida a 2,00%), F2-10 (enriquecida a 10,00%), F2-25 (enriquecida a 25,00%), combinados com o inseticida dursban para o controle de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797).

Tal resultado indica que a combinação da fração sem enriquecimento com o inseticida dursban, assim como com o PBO, além de apresentar antagonismo ao inseticida (Figura 4), não acelera a resposta de mortalidade (Carvalho et al., 2017). Resultado semelhante foi observado para as combinações do inseticida com a fração intermediária enriquecida com 2,00 e 10,00% (V/V), que embora apresentando efeito sinérgico não proporcionaram uma aceleração significativa da resposta à mortalidade.

Isso implica em uma menor correlação de sensibilidade entre a mortalidade e a concentração da amostra e, conseqüentemente, um maior intervalo de tempo necessário para a promoção da mortalidade do inseto-alvo (Araújo et al., 2012).

Já o inseticida dursban, combinado com a fração enriquecida a 25,00% (V/V), apresentou um valor de coeficiente angular que, junto ao significativo efeito sinérgico, configura-se uma alternativa promissora dessa combinação na formulação como inseticida.

Efeito sinérgico da combinação do inseticida ciflutrina com a fração intermediária (F2) do óleo essencial de *Piper aduncum* L. enriquecida com um blend de compostos

Independentemente da combinação do inseticida ciflutrina com a fração intermediária do Oepa, quer enriquecida com os diferentes compostos ou não, assim como com o butóxido de piperonila (PBO), foram observados efeitos sinérgicos significativos ($FSs > 1$) em todos os tratamentos. Tal resultado pode ainda ser observado, independentemente da porcentagem de participação do *blend* de compostos, na composição da combinação (Figura 6). O maior valor de $FS = 43,54$ ($IC = 45,60-37,46$), observado para a ciflutrina combinada com a fração sem enriquecimento, diferiu significativamente de todos os demais tratamentos avaliados. A combinação dessa fração com o *blend* de compostos a 10,00% (V/V) [$FS = 25,08$ ($27,17-22,94$)] diferiu significativamente tanto das demais combinações, independentemente das porcentagens de participação do *blend* completo de compostos, como também do inseticida combinado com o PBO (Figura 6).

O valor de $FS = 13,92$ ($IC = 16,39-11,26$), obtido para a combinação do inseticida ciflutrina com a fração enriquecida com 2,00% (V/V) do *blend* completo de compostos, não diferiu significativamente do valor de FS da fração enriquecida com 25,00% (V/V) do *blend* de compostos [$FS = 14,33$ ($18,05-12,53$)]. A combinação do PBO com esse inseticida apresentou um valor de $FS = 4,65$ ($4,48-4,70$) que diferiu

significativamente dos tratamentos considerados anteriormente.

Tais valores de FSs foram maiores que os obtidos por Fazolin et al. (2016b) ao avaliarem o efeito sinérgico do Oepa para diferentes inseticidas do grupo químico piretroides sintéticos, quando a cipermetrina apresentou a maior resposta sinérgica [$FS = 5,97$ ($5,52-7,14$)]. Para todos os piretroides avaliados, os valores de FSs decresceram à medida que menores proporções do sinérgico foram utilizadas na combinação, demonstrando a necessidade de maiores concentrações de compostos, incluindo o dilapio, na manifestação da sinergia.

Os piretroides foram desenvolvidos a partir do piretrum, que é uma mistura de substâncias obtidas da maceração da flor do crisântemo (*Chrysanthemum* spp.). Após o estabelecimento das rotas para a sua síntese, surgiu esse grupo de inseticidas classificados como ésteres do ácido crisântêmico (Zambolim et al., 2008) que atua interagindo com os canais de sódio distribuídos ao longo dos axônios, prolongando ou impedindo o fechamento normal após a transmissão do impulso nervoso. Dessa forma, os piretroides permitem o fluxo excessivo de íons de sódio para o interior da célula nervosa, ocasionando a hiperexcitabilidade e morte do inseto (Zambolim et al., 2008).

Embora na degradação dos piretroides estejam envolvidas as três classes de enzimas detoxificativas monooxigenases P450, glutatona S-transferase (GST) e esterases (ESTs), há relatos de que a atuação de esterases específicas pertencentes a uma grande superfamília de α/β proteínas hidrolases seja importante para a resistência aos piretroides (Oakeshott et al., 2005; Ai et al., 2010), sendo essa classe de enzimas considerada de menor importância para a degradação de piretroides (Kadous et al., 1983). Essas enzimas sequestram os inseticidas mais rapidamente do que os metabolizam, impedindo, desse modo, que cheguem ao local de ação. São importantes para a evolução da resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos e, em menor escala, aos piretroides (Kadous et al., 1983).

Resultados cinéticos obtidos por meio de espectrofotometria indicaram que os inseticidas piretroides, aletrina, deltametrina, fenpropatrina e cipermetrina afetam a GST, reduzindo a sua atividade catalítica, principalmente o composto deltametrina, que apresentou maior potencial inibitório. Embora os inseticidas aplicados neste estudo pertençam à mesma classe, mostraram mecanismos de inibição diferentes dependendo do composto (Ribeiro et al., 2022).

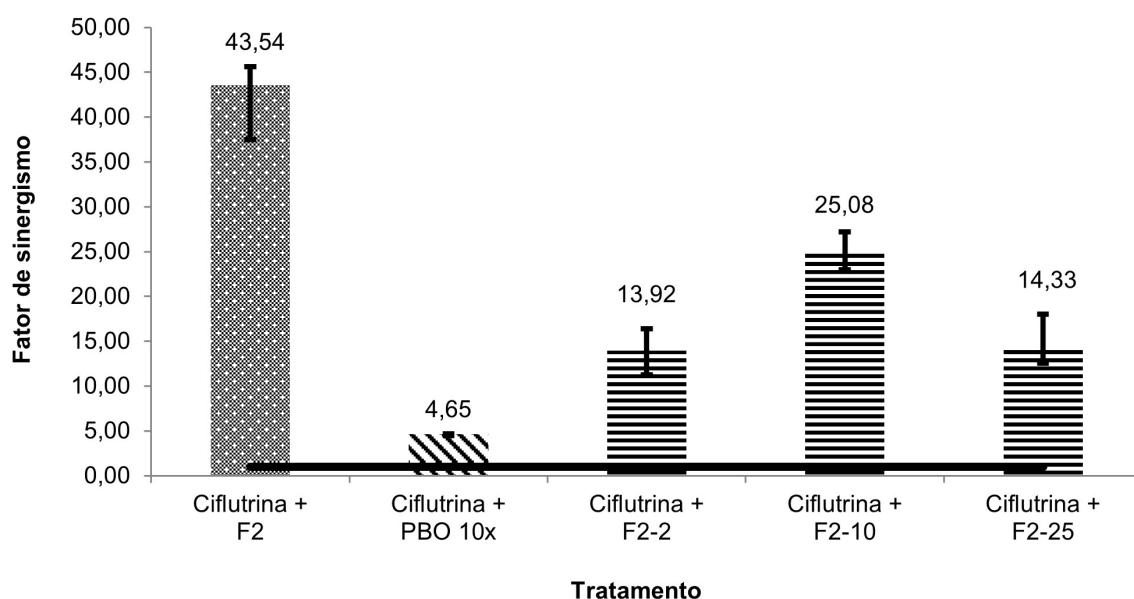


Figura 6. Fatores de sinergismo da fração intermediária (F2) com adição de butóxido de piperonila – PBO (10 vezes) e após a combinação dos diferentes percentuais do *blend* de compostos: F2-2 (enriquecida a 2,00%), F2-10 (enriquecida a 10,00%), F2-25 (enriquecida a 25,00%), combinados com o inseticida ciflutrina para o controle de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797).

A associação da resistência de noctúdeos como *S. frugiperda* aos inseticidas piretroides, com o aumento da desintoxicação pelas monooxigenases dependentes do citocromo P450, é relatada em diferentes regiões do mundo (Grubor; Heckel, 2007; Joußen et al., 2012; Han et al., 2015).

Compostos com reconhecida ação sinérgica para piretroides estão presentes na composição do *blend*, tais como, fenilpropanoides: eugenol (Norris et al., 2019), miristicina (Joffe et al., 2012), cinamaldeído (Yuan et al., 2019) e dilapiol (Joffe, 2011; Fazolin et al., 2015, 2016a, 2016b, 2016c, 2017); monoterpenos: limoneno (Joffe et al., 2012; Melo, 2017), 3-careno (Suwannayod et al., 2019) e α -terpineno (Melo, 2017); monoterpenoides oxigenados: terpinen-4-ol (Melo, 2017), carvacrol (Norris et al., 2015, 2019; Gross et al., 2017), neral (Norris et al., 2015; Gross et al., 2017), 1,8-cineol (Melo, 2017) e linalol (Suwannayod et al., 2019), além do sesquiterpeno β -cariofileno (Suwannayod et al., 2019). Esses compostos relacionados apresentam capacidade de inibição de pelo menos uma das três principais classes de enzimas detoxificativas.

Pode-se constatar que para a fração intermediária avaliada não foi verificada uma tendência ao acréscimo dos valores de FSs proporcional ao aumento da concentração do *blend* na combinação com a ciflutrina, observada para a fração terpênica avaliada nas mesmas condições experimentais.

Nesse caso, foi obtida uma variação com tendência decrescente FS na combinação do inseticida com a fração enriquecida com o *blend* de compostos que oscilou de FS = 13,92 (11,26–16,39) na proporção 2,00% (V/V), subindo para FS = 25,08 (27,17–22,94) na proporção 10,00% (V/V) e decrescendo finalmente para 14,33 (18,05–12,53) na proporção de 25,00% (V/V).

Dessa forma, as mesmas considerações sobre a necessidade de construção de isobogramas para definição das curvas de sinergismo, feitas anteriormente para os inseticidas organofosforados, também são válidas para esse grupo químico, uma vez que pode ter sido atingida a faixa de antagonismo quando foram adicionadas maiores porcentagens de compostos na combinação.

Os resultados sugerem a ocorrência de um nível restrito de sinergismo pela proporcionalidade dos compostos do *blend* entre si e/ou com os compostos da fração intermediária, como por exemplo, limoneno, 1,8-cineol, etc., com interferência positiva desse último na penetração de compostos na cutícula do inseto. Além disso, deve ser considerada a ação sinérgica da combinação desses terpenoides com o dilapiol, determinada por Fazolin et al. (2023), que pode ter influenciado no resultado obtido.

O expressivo valor do FS observado na fração sem enriquecimento combinada com a ciflutrina permite inferir que a quantidade de compostos

sinérgicos inibidores de P450 nessa fração deve ter sido suficiente para promover o sinergismo para a ciflutrina. Nesse caso, as adições de compostos realizadas para o enriquecimento da fração poderiam deslocar o efeito do sinergismo para o antagonismo, conforme a teoria levantada por Kruse et al. (2006).

Embora tenha sido menor que os demais tratamentos, o efeito sinérgico do PBO deve ser considerado por ter potencializado o piretroide em quatro vezes aproximadamente. É fato que esse valor foi menor que quaisquer combinações da ciflutrina com a fração intermediária, independente do enriquecimento (Figura 6).

Na comparação dos coeficientes angulares das combinações sinérgicas do *blend* de compostos com o inseticida ciflutrina, o maior valor [1,98 (1,74–2,22)] foi observado para a combinação desse inseticida sem a adição de quaisquer combinações da fração intermediária, independentemente do enriquecimento e suas variações percentuais no *blend* (Figura 7).

Todas as demais combinações do inseticida ciflutrina, quer com a fração sem enriquecimento quer com a enriquecida a 2,00, 10,00 e 25,00% (V/V) com o *blend* de compostos e o PBO, diferiram significativamente entre si (Figura 7). Dessa forma, em ordem decrescente de valores dos coeficientes angulares podem-se apontar as seguintes combinações da ciflutrina: com PBO (0,97); fração enriquecida com

blend a 10,00% (V/V) (0,84); fração enriquecida com *blend* a 25,00% (V/V) (0,66); fração sem enriquecimento (0,61) e finalmente fração enriquecida com *blend* a 2,00% (V/V) (0,50).

Quando comparados os valores dos coeficientes angulares do inseticida ciflutrina combinado à fração terpênica do Oepa com adição de diferentes concentrações do *blend* de compostos com a fração intermediária submetida às mesmas condições experimentais, não foi observada a mesma tendência de acréscimo no valor do coeficiente angular em função do aumento da concentração do *blend*. À semelhança dos valores dos FSs, pode ser observada uma variação nos valores dos coeficientes angulares.

A combinação da ciflutrina com a fração sem adição de compostos foi a que apresentou menor valor do coeficiente angular [0,61 (0,58–0,64)], diferindo significativamente de todos os demais tratamentos.

No entanto, considerando o alto valor do fator de sinergismo quando esse inseticida é combinado à fração intermediária sem adição de compostos, a menor velocidade de expressão da letalidade, devido ao baixo valor do coeficiente angular, pode ser compensada pela potencialização do inseticida e mereceria um ponderamento na tomada de decisão quanto à elaboração de uma formulação.

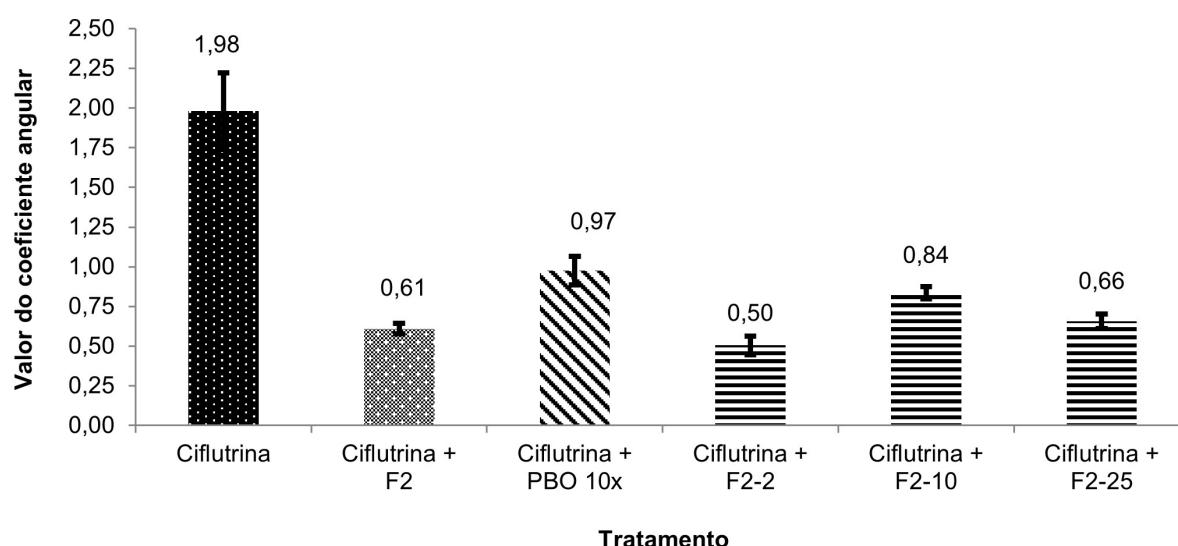


Figura 7. Coeficientes angulares das retas obtidas pela regressão linear de dose-resposta da fração intermediária (F2) com adição de butóxido de piperonila – PBO (10 vezes) e após a combinação dos diferentes percentuais do *blend* de compostos: F2-2 (enriquecida a 2,00%), F2-10 (enriquecida a 10,00%), F2-25 (enriquecida a 25,00%), combinados com o inseticida ciflutrina para o controle de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797).

Conclusões

- 1) A fração intermediária do Oepa, enriquecida ou não com os diferentes compostos, apresentou efeito sinérgico para o inseticida metomil.
- 2) Os menores valores do fator de sinergismo foram observados para o metomil combinado com a fração enriquecida com o *blend* adicionado a 10,00 e 25,00% (V/V).
- 3) Há uma tendência de decréscimo dos valores dos fatores de sinergismo com o aumento da concentração percentual do *blend* de compostos na combinação com o inseticida metomil.
- 4) A fração intermediária sem qualquer enriquecimento combinada ao inseticida dursban foi a única a apresentar efeito antagônico à semelhança da combinação com o PBO.
- 5) A fração intermediária combinada com 2,00, 10,00 e 25,00% (V/V) do *blend* de compostos apresentou discreto efeito sinérgico para a toxicidade do inseticida dursban.
- 6) Não há variação nos valores dos fatores de sinergismo com o aumento da concentração percentual do *blend* de compostos na combinação com o inseticida dursban.
- 7) A fração intermediária do Oepa, enriquecida ou não com os diferentes compostos, apresentou efeito sinérgico para o inseticida ciflutrina.
- 8) O maior valor do fator de sinergismo foi observado para a ciflutrina combinada com a fração sem enriquecimento que necessita, no entanto, de um tempo maior para a promoção da mortalidade de larvas de *S. frugiperda*.
- 9) Há um acréscimo dos valores dos fatores de sinergismo com o aumento da concentração percentual do *blend* de compostos até 10,00% (V/V) na combinação com o inseticida ciflutrina.
- 10) O inseticida ciflutrina, comparado ao metomil e dursban, foi o que apresentou maiores valores de resposta sinérgica pela adição da fração intermediária em todas as proporções com os *blends* de compostos avaliados.

Referências

- ABBASSY, M. A.; ABDELGALEIL, S. A.; RABIE, 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, June 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00854.x>
- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 2, p. 265-267, Apr. 1925. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry**. Illinois: Allured Publishing: Carol Stream, 2007. 804 p.
- AI, G.; ZOU, D.; SHI, X.; LI, F.; LIANG, P.; SONG, D.; GAO, X. HPLC Assay for characterizing alpha-cyano-3-phenoxybenzyl pyrethroids hydrolytic metabolism by *Helicoverpa armigera* (Hübner) based on the quantitative analysis of 3-phenoxybenzoic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 694-70, Jan. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf9030376>.
- AKHTAR, Y.; ISMAN, M. B. Plant natural products for pest management: the magic of mixtures. In: ISHAAYA, I.; PALLI, S. R.; HOROWITZ, A. R. **Advanced technologies for managing insect pests**. Berlin: Springer, 2013. p. 231-247.
- ALDRIDGE, W. N. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E 605) and analogues. **Biochemical Journal**, v. 46, n. 4, p. 451, Apr. 1950. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj0460451>.
- ARAÚJO, M. J.; CÂMARA, C. A.; BORN, F. S.; MORAES, M. M.; BADJI, C. A. Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 57, n. 2, p. 139-155, June 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9545-x>.
- BERNARD, C. B.; PHILOGÈNE B. J. R. Insecticide synergists: role, importance, and perspectives. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 38, n. 2, p. 199-223, Feb. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1080/15287399309531712>.
- 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>.
- BIZZO, H. R.; BARBOZA, E. G.; SANTOS, M.; GAMA, P. E. Um conjunto de planilhas eletrônicas para identificação e quantificação de constituintes de óleos essenciais. **Química Nova**, v. 43, n. 1, p. 98-105, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170458>.
- BRASTSTEN, L. B.; WILKINSON, C. F.; EISNER, T. Herbivore-plant interactions: Mixed-function oxidases and secondary plant substances. **Science**, v. 196, n. 4296,

p. 1349-1352, June 1977. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.196.4296.1349>.

CARVALHO, J. R.; PRATISSOLI, D.; VIANNA, U. R.; HOLTZ, A. M. **Análise de probit aplicada a bioensaios com insetos**. Colatina: IFES, 2017. 102 p.

DO LABORATÓRIO à lavoura: como são os testes e o controle de agroquímicos. Brasília, DF: CNA, 2019. Disponível em: <https://cnabrasil.org.br/noticias/do-laboratorio-a-lavoura-como-sao-os-testes-e-o-controle-de-agroquimicos>. Acesso em: 29 out. 2021.

ELDEFRAWI, A. T. The acetylcholine receptor and its interaction with insecticide. In: WILKINSON, C. F. (ed.). **Insect biochem physiology**. New York: Plenum Press, 1976. p. 297-326.

ELDEFRAWI, A. T.; MANSOUR, N.; ELDEFRAWI, M. E. Insecticides affecting acetylcholine receptor interactions. **Pharmacy Theory**, v. 16, n. 1, p. 45-65, 1982. DOI: [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(82\)90031-6](https://doi.org/10.1016/0163-7258(82)90031-6).

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; MEDEIROS, A. F. M.; GOMES, L. P.; DA SILVA, I. M.; SILVA, M. S. de F. Potencial sinérgico do óleo de *Piper aduncum* para inseticidas formulados com misturas de princípios ativos. **Revista de Ciências Agrárias / Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 59, n. 4, p. 362-369, 2016c. Disponível em: <https://btcc.ufra.edu.br/index.php/ajaes/article/view/2389>. Acesso em: 12 out. 2023.

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@ambiente On-line**, v. 11, n. 3, p. 232-240, jul./set. 2017. DOI: <https://doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v11i3.3995>.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; 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, 2016a. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n6p3903>.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; MEDEIROS, A. F. M.; GOMES, L. P.; SILVA, I. M. da; SILVA, M. S. de F. Sinérgico alternativo para o manejo da resistência da lagarta do cartucho do milho a piretroides. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 14, n. 3, p. 316-325, 2015. DOI: <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v14n3p316-325>.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; MEDEIROS, A. F. M.; SILVA, I. M. da; GOMES, L. P.; SILVA, M. S. de F. Synergistic potential of dillapiole-rich essential oil with synthetic pyrethroid insecticides against fall armyworm. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 382-388, Mar. 2016b. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141500>.

FAZOLIN, M.; MONTEIRO, A. F. M.; BIZZO, H. R.; GAMA, P. E.; VIANA, L. de O.; LIMA, M. E. C. de. Insecticidal activity of *Piper aduncum* oil: variation in dillapiole content and chemical and toxicological stability during storage. **Acta Amazonica**, v. 52, n. 3, p. 179-188, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392202102292>.

FAZOLIN, M.; BIZZO, H. R.; MONTEIRO, A. F. M.; LIMA, M. E. C.; MAISFORTE, N. S.; GAMA, P. E. Synergism in two-component insecticides with dillapiole against fall armyworm. **Plants**, v. 12, n. 17, 3042, Sept. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12173042>.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. London: Cambridge University, 1971.

FONTGALLAND, I. L. **Economia circular e consumo sustentável**. Campina Grande: Amplla, 2022. 86 p.

GIGLIOLLI, A. A. S.; LUCENA, A. L. M.; LAPENTA, A. S. Identificação e caracterização das esterases em *Tribolium castaneum* Coleoptera: Tenebrionidae. **SaBios - Revista de Saúde e Biologia**, v. 6, n. 1, jan./abr. 2011. Disponível em: <https://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios/article/view/769>. Acesso em: 12 out. 2023.

GROSS, A. D.; NORRIS, E. J.; KIMBER, M. J.; BARTHOLOMAY, L. C.; COATS, J. R. Essential oils enhance the toxicity of permethrin against *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 31, n. 1, p. 55-62, Mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/mve.12197>.

GRUBOR, V. D.; HECKEL, D. G. Evaluation of the role of CYP6B cytochrome P450s in pyrethroid resistant australian *Helicoverpa armigera*. **Insect Molecular Biology**, v. 16, n. 1, p. 15-23, Feb. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00697.x>.

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/4309/1595>. Acesso em: 12 out. 2023.

HAN, Y.; YU, W.; ZHANG, W.; YANG, Y.; WALSH, T.; OAKESHOTT, J. G.; WU, Y. Variation in P450-mediated fenvalerate resistance levels is not correlated with CYP337B3 genotype in Chinese populations of *Helicoverpa armigera*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 129-135, June 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.004>.

HANDA S. K.; DEWAN, R. S. Evaluation of dillapiole and dihydrodillapiole as synergists for pyrethrins in dust formulations. **Pyrethrum Post**, v. 13, p. 45-46, 1974.

- HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 11, p. 1009-1015, Nov. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00079-5).
- HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 371-391, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.371>.
- INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL. **Patentes**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/inpi/pt-br/servicos/patentes>. Acesso em: 30 nov. 2023.
- ISMAN, M. B.; TAK, J. **Commercialization of insecticides based on plant essential oils: past, present, and future**. Boca Raton: CRC Press, 2017. p. 27-40.
- JOFFE, T. **Evaluation of potential pyrethrum synergists on agriculturally significant insect species**. 2011. 262 f. Thesis (Doctorate in Philosophy) – School of Agricultural Science/TIAR, Hobart, University of Tasmania, Australia.
- JOFFE, T.; GUNNING, R. V.; ALLEN, G. R.; KRISTENSEN, M.; ALPTEKIN, S.; FIELD, L. M.; MOORES, G. D. Investigating the potential of selected natural compounds to increase the potency of pyrethrum against houseflies *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Pest Management Science**, v. 68, n. 2, p. 178-184, Feb. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.2241>.
- JOKANOVIĆ, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicology**, v. 166, n. 3, p. 139-160, Sept. 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00463-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00463-2).
- JOULAIN, D.; KÖNIG, W. A. **The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons**. Hamburg: E. B. Verlag, 1998. 661 p.
- JOUBEN, N.; AGNOLET, S.; LORENZ, S.; SCHONE, S. E.; ELLINGER, R.; SCHNEIDER, B.; HECKEL, D. G. Resistance of Australian *Helicoverpa armigera* to fenvalerate is due to the chimeric P450 enzyme CYP337B3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 38, p. 15206-15211, Sept. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1202047109>.
- KADOUS, A. A.; GHIASUDDIN, S. M.; MATSUMURA, F.; SCOTT, J. G.; TANAKA, K. Difference in the picrotoxinin receptor between the cyclodiene-resistant and susceptible strains of the german cockroach. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 19, n. 2, p. 157-166, Apr. 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(83\)90135-9](https://doi.org/10.1016/0048-3575(83)90135-9).
- KNOWLES, C. O. Miscellaneous pesticides. In: HAYES, W. J.; LAWS, E. R. (ed.). **Handbook of pesticide toxicology**. San Diego, CA: Academic Press, 1991. v. 3, p. 1471-1526.
- KRUSE, N. D.; VIDAL, R. A.; TREZZI, M. M. Curvas de resposta e isoblograma como forma de descrever a associação de herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenóides. **Planta Daninha**, v. 24, n. 3, p. 579-587, set. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582006000300022>.
- 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>.
- 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. 23-28, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1020974725437>.
- LIU, S. Q. **The Activity of analogs of the natural product dillapiol and sessamol as detoxification enzyme inhibitors and insecticide synergists**. 2015. 183 f. Thesis (Doctorate in Philosophy degree in Biology) – University of Ottawa, Ottawa, Canada.
- 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>.
- LÓPEZ, M. D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 284-288, Mar. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.11.005>.
- MELO, J. P. R. **Produtos formulados à base de óleos essenciais para o manejo de populações de traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) resistentes ao ingrediente ativo deltametrina**. 2017. 121 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola, Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- NORRIS, E. J.; GROSS, A. D.; DUNPHY, B. M.; BESSETTE, S.; BARTHOLOMAY, L.; COATS, J. R. Comparison of the insecticidal characteristics of commercially available plant essential oils against *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 2, p. 993-1002, Sept. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/jme/tjv090>.

NORRIS, E. J.; GROSS, A. D.; BARTHOLOMAY, L. C.; COATS, J. R. Plant essential oils synergize various pyrethroid insecticides and antagonize malathion in *Aedes aegypti*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 33, n. 4, p. 453-466, Dec. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/mve.12380>.

OAKESHOTT, J. G.; CLAUDIANOS, C.; CAMPBELL, P. M.; NEWCOMB, R. D.; RUSSELL, R. J. Biochemical genetics and genomics of insect esterases. In: GILBERT, L. I. (ed.). **Comprehensive molecular insect science**. Elsevier: Amsterdam, 2005. p. 309-381.

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

PAVELA, R. Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say larvae. **Parasitology Research**, v. 114, n. 10, p. 3835-3853, Oct. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4614-9>.

PAVELA, R. Acute, synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Bois. (Lep., Noctuidae) larvae. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 247-258, Sept. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.030>.

RIBEIRO, E. B.; BADEA, M.; RIBEIRO, D. B.; COSTA, A. R.; SANTOS, D. R. D.; MARQUES, P. R.; NUNES, G. S. Atividade inibitória de pesticidas piretroides sobre a glutatona S-transferase. **Química Nova**, v. 45, n. 2, p. 138-144, 2022. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170804>.

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

SHMIDT, F. V.; MONNERAT, R. G.; BORGES, M.; CARVALHO, R. S. da. **Metodologia de criação para avaliação de agentes entomopatogênicos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 32 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular técnica, 11).

STEWART, D. The evaluation of synergistic action in the laboratory and field. In: JONES, D. G. (ed.). **Piperonyl butoxide**: the insecticide synergist. London: Academic Press, 1998. p. 173-198.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado de Saúde. Superintendência de Controle de Epidemias. **Manual de segurança em controle químico de vetores**. São Paulo: Sucev, 2001. Disponível em: <https://www.saude.sp.gov.br/coordenadoria-de-controle-de-doencasvetores/programas/seguranca-do-trabalhador/manual-de-seguranca-em-controle-quimico-de-vetores>. Acesso em: 18 out. 2024.

SUWANNAYOD, S.; SUKONTASON, K. L.; PITASAWAT, B.; JUNKUM, A.; LIMSOPATHAM, K.; JONES, M. K.; THAVARA, U. Synergistic toxicity of plant essential oils combined with pyrethroid insecticides against blow flies and the house fly. **Insects**, v. 21, n. 10, e178, June 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects10060178>.

TAK, J. H.; JOVEL, E.; ISMAN, M. B. Synergistic interactions among the major constituents of lemongrass essential oil against larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Journal of Pest Science**, v. 90, p. 735-744, Mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0827-7>.

TONG, F.; BLOOMQUIST, J. R. Plant essential oils affect the toxicities of carbaryl and permethrin against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 4, p. 826-832, July 2013. DOI: <https://doi.org/10.1603/me13002>.

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. London: Academic Press, 1998. p. 1-5.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X).

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>.

YUAN, L.; YANG, X.; YU, X.; WU, Y.; JIANG, D. Resistance to insecticides and synergistic and antagonistic effects of essential oils on dimethrin toxicity in a field population of *Culex quinquefasciatus* Say. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 928-936, Mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.115>.

ZAMBOLIM, L.; da CONCEIÇÃO M. Z.; SANTIAGO, T. **O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários**. 3. ed. Viçosa: UFV/DFP, 2008. 64 p.



*Ministério da
Agricultura e Pecuária*