



**LUCIANO DE SOUZA**

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Illicium verum*, *Myristica fragrans* e  
*Schinus molle*: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE  
INIBITÓRIA ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DE EFEITOS  
LETAIS E SUBLETAIS SOBRE *Drosophila suzukii***

**LAVRAS-MG  
2021**

**LUCIANO DE SOUZA**

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Illicium verum*, *Myristica fragrans* e *Schinus molle*:  
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE INIBITÓRIA ENZIMÁTICA E  
AVALIAÇÃO DE EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS SOBRE *Drosophila suzukii***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/ Bioquímica, para obtenção do título de Mestre.

Profª. Dra. Maria das Graças Cardoso  
Orientadora

Prof. Dr. Khalid Haddi  
Coorientador

**LAVRAS-MG  
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Souza, Luciano de.

Óleos essenciais de *Illicium verum*, *Myristica fragrans*  
e *Schinus molle*: caracterização química, atividade inibitória  
enzimática e avaliação dos efeitos letais e subletais sobre  
*Drosophila suzukii* / Luciano de Souza. - 2021.

78 p. : il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Coorientador(a): Khalid Haddi.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Inibição da acetilcolinesterase. 2. Toxicologia. 3. Alterações  
morfológicas. I. Cardoso, Maria das Graças. II. Haddi, Khalid. III.  
Título.

O conteúdo desta obra é de responsabilidade do(a) autor(a) e de seu orientador(a).

**LUCIANO DE SOUZA**

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Illicium verum*, *Myristica fragrans* e *Schinus molle*:  
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE INIBITÓRIA ENZIMÁTICA E  
AVALIAÇÃO DE EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS SOBRE *Drosophila suzukii***

**ESSENTIAL OILS OF *Illicium verum*, *Myristica fragrans* and *Schinus molle*:  
CHEMICAL CHARACTERIZATION, ENZYMATIC INHIBITORY ACTIVITY AND  
EVALUATION OF LETHAL AND SUBLETHAL EFFECTS ON *Drosophila suzukii***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/ Bioquímica, para obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 15 de abril de 2021.

Dra. Maria das Graças Cardoso – UFLA  
Dr. Khalid Haddi – UFLA  
Dr. Rafael Neodini Remedio – UFLA  
Dr. Luiz Gustavo de Lima Guimarães – UFSJ

Profª. Dra. Maria das Graças Cardoso  
Orientadora

Prof. Dr. Khalid Haddi  
Coorientador

**LAVRAS-MG  
2021**

**À minha querida mãezinha...**

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade da vida, por todo aprendizado e pela coragem de sempre seguir em frente.

À Universidade Federal de Lavras, que inicialmente me acolheu como servidor público e agora contribui para meu desenvolvimento acadêmico através do Programa de Pós-graduação em Agroquímica do Departamento de Química desta instituição.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Às instituições de fomento à pesquisa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro à pesquisa e ciência brasileira.

À profa. Dra. Maria das Graças Cardoso, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, por compartilhar seu conhecimento e experiências de vida, pelos sábios conselhos, pela paciência e por acreditar em meu potencial. A senhora inegavelmente me transformou pessoal e profissionalmente.

Ao prof. Dr. Khalid Haddi, por ter-me coorientado, por ter compartilhado seus conhecimentos sobre insetos e toxicologia, e por ter colaborado com meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos meus pais, Antônio e Judith, por todo o carinho, ensinamentos e bases morais que norteiam minha vida.

Aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos e demais familiares, que se fazem presentes em minha vida, por todo o afeto, incentivo e encorajamento.

À Camila, por tantos anos de amizade, papos-cabeça, momentos de diversão e convivência, considero-te imensamente, best!

À Jojo, por ter-se feito presente em minha vida durante esses anos de mestrado, pelos conselhos e momentos de descontração, admiro-te muito!

À Vanuzia, por toda a ajuda nos experimentos realizados no Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais, sua colaboração foi fundamental!

Ao técnico do laboratório de histologia do Departamento de Medicina Veterinária, Isaac Konig, pelo auxílio indispensável nos experimentos de histologia e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Departamento de Química, por toda a infraestrutura disponibilizada para a realização do meu projeto de mestrado.

Ao Departamento de Entomologia, por toda a infraestrutura disponibilizada para a realização dos experimentos com insetos.

Ao Departamento de Medicina Veterinária, por toda a infraestrutura disponibilizada para a realização dos experimentos de histologia.

À Dra. Lidiany Zacaroni, pelas análises cromatográficas dos óleos essenciais que foram realizadas no Centro de Análise e Prospecção e Química - CAPQ.

Aos amigos do Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais e de Análise de Qualidade de Aguardente, apesar de não ter estado com vocês durante muito tempo, tenho um carinho muito especial por todos.

A todos os meus amigos, pelos momentos de lazer, pelos conselhos e incentivos que tornaram essa jornada mais leve.

Aos professores do programa de pós-graduação em Agroquímica e aos funcionários do Departamento de Química, por toda a atenção e pela ajuda prestada.

Aos membros da banca, pela disponibilidade de contribuir para a melhoria do presente trabalho.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização desta etapa em minha vida.

Obrigado!!!

*“O espírito sem limites é o maior tesouro do homem.”*

*(J. K. Rowling)*



## RESUMO

*Drosophila suzukii* é um inseto-praga emergente capaz de causar severos danos econômicos e seu controle é feito, normalmente, com inseticidas sintéticos. Óleos essenciais representam uma fonte alternativa para o controle de pragas, sendo uma opção ambientalmente correta e sustentável. Tal atividade pode ocorrer por ação neurotóxica, além disso, podem promover efeitos subletais apreciáveis, como a redução de oviposição, alterações morfológicas e efeito repelente. Objetivou-se neste trabalho determinar o rendimento da extração dos óleos essenciais de *Illicium verum*, *Myristica fragrans* e *Schinus molle*; caracterizá-los quimicamente; avaliar a atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase; determinar a toxicidade desses óleos sobre *D. suzukii* e, por fim, avaliar os efeitos subletais do óleo de *I. verum* sobre a morfologia de fêmeas desta espécie de inseto. O rendimento das extrações foi de 2,49% para *I. verum*, 5,14% para *M. fragrans* e 1,08% para *S. molle*. Os compostos majoritários presentes nos óleos essenciais foram (*E*)-anetol (99,61%) para o óleo de *I. verum*; para *M. fragrans* foram sabineno (27,39%), limoneno (25,51%),  $\beta$ -pineno (17,95%) e  $\alpha$ -pineno (17,77%) e para *S. molle* foram limoneno (25,55%), biciclogermacreno (22,93%), sabineno (19,66%) e *trans*- $\beta$ -cariofileno (12,74%). Os valores para Concentração de Inibição para 50% (CI<sub>50</sub>) da enzima acetilcolinesterase foram de 0,117; 0,057 e 0,047  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *I. verum*, *M. fragrans* e *S. molle*, respectivamente. Os dados toxicológicos revelaram que a Concentração Letal para 50% dos indivíduos (CL<sub>50</sub>) de *D. suzukii* foi de 1,9; 26,5 e 58,7  $\mu\text{L mL}^{-1}$  para *I. verum*, *M. fragrans* e *S. molle*, respectivamente. As análises histológicas e histoquímicas revelaram alterações no teor de carboidratos, espessura das fibras musculares, área de gotas lipídicas do corpo gorduroso e espessura epitelial do intestino médio de insetos expostos ao óleo de *I. verum*. Os resultados mostram que todos os óleos inibiram satisfatoriamente a enzima acetilcolinesterase e apresentaram toxicidade apreciável sobre *D. suzukii*. Em especial o óleo de *I. verum* apresentou baixíssima CL<sub>50</sub> e causou severas alterações morfológicas nos insetos, tornando-se uma promissora alternativa ao controle de insetos-praga.

**Palavras-chave:** Inibição da acetilcolinesterase. Toxicologia. Alterações morfológicas. Mosca-da-asa-manchada. Anis-estrelado. Noz-moscada.

## ABSTRACT

*Drosophila suzukii* is an emerging insect pest capable of causing severe economic damage and its control is usually done with synthetic insecticides. Essential oils represent an alternative source for pest control, being an environmentally friendly and sustainable option. Such activity can occur by neurotoxic action, in addition, they can promote appreciable sublethal effects such as the reduction of oviposition, morphological changes and repellent effect. The objectives of this study were to determine the extraction yield of the essential oils of *Illicium verum*, *Myristica fragrans* and *Schinus molle*; perform their chemical characterization; evaluate the inhibitory activity of the acetylcholinesterase enzyme; to determine the toxicity of these oils on *D. suzukii* and, finally, to evaluate the sublethal effects of *I. verum* oil on the morphology of females of this insect species. The extraction yield was 2.49% for *I. verum*, 5.14% for *M. fragrans* and 1.08% for *S. molle*. The major compounds present in essential oils were (*E*)-anethole (99.61%) in *I. verum* oil; for *M. fragrans* were sabinene (27.39%), limonene (25.51%),  $\beta$ -pinene (17.95%) and  $\alpha$ -pinene (17.77%) and for *S. molle* they were limonene (25.55%), bicyclogermacrene (22.93%), sabinene (19.66%) and *trans*- $\beta$ -karyophyllene (12.74%). The values for Inhibition Concentration for 50% (IC<sub>50</sub>) of the enzyme acetylcholinesterase were 0.117; 0.057 and 0.047  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for *I. verum*, *M. fragrans* and *S. molle*, respectively. The toxicological data revealed that the Lethal Concentration for 50% of the individuals (LC<sub>50</sub>) of *D. suzukii* was 1.9; 26.5 and 58.7  $\mu\text{L mL}^{-1}$  for *I. verum*, *M. fragrans* and *S. molle*, respectively. Histological and histochemical analyzes revealed changes in carbohydrate content, thickness of muscle fibers, area of lipid droplet in the fat body and epithelial thickness of the midgut of insects exposed to the oil of *I. verum*. All the oils satisfactorily inhibited the enzyme acetylcholinesterase and showed appreciable toxicity on *D. suzukii*. Especially the oil of *I. verum*, which had a very low LC<sub>50</sub> and caused severe morphological changes in insects, making it a promising alternative to the control of insect pests.

**Keywords:** Acetylcholinesterase inhibition. Toxicology. Morphological changes. Spotted-winged fly. Star anise. Nutmeg.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Esquema da rota de biossíntese de metabólitos secundários em plantas. ....	17
Figura 2 - Estruturas do isopreno, isopentenil e dimetilalil difosfato.....	19
Figura 3 - Biossíntese de terpenos pela via do mevalonato (continua).....	20
Figura 4 - Biossíntese de terpenos pela via DXPS (continua). ....	22
Figura 5 - Estrutura básica de um fenilpropanoide.....	25
Figura 6 - Biossíntese de fenilpropanoides (continua). ....	26
Figura 7 - Árvore da espécie <i>Schinus molle</i> .....	31
Figura 8 - Destaque de folhas e inflorescências de <i>Schinus molle</i> . ....	31
Figura 9 - Fruto da espécie <i>Myristica fragrans</i> . ....	33
Figura 10 - Fruto maduro e sementes de <i>Myristica fragrans</i> .....	33
Figura 11 - Frutos e sementes da espécie <i>Illicium verum</i> . ....	35
Figura 12 - Adultos da espécie <i>Drosophila suzukii</i> . ....	41

### SEGUNDA PARTE

Figura 13 - Cromatogramas obtidos para os óleos essenciais.....	57
Figura 14 - Estrutura química dos componentes majoritários dos óleos essenciais. ....	59
Figura 15 - Curvas de inibição da enzima acetilcolinesterase. ....	60
Figura 16 - Cortes histológicos de <i>Drosophila suzukii</i> pertencentes aos grupos controles água e DMSO. ....	62
Figura 17 - Cortes histológicos de <i>Drosophila suzukii</i> pertencentes aos tratamentos CL <sub>20</sub> e CL <sub>50</sub> .....	63

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

Tabela 1 - Teor de umidade e rendimento dos óleos essenciais de <i>Illicium verum</i> , <i>Myristica fragrans</i> e <i>Schinus molle</i> .....	56
Tabela 2 - Composição dos óleos essenciais de <i>Illicium verum</i> , <i>Myristica fragrans</i> e <i>Schinus molle</i> .....	58
Tabela 3 - Valores estimados de $CI_{50}$ para a inibição de acetilcolinesterase.....	60
Tabela 4 - Desempenho toxicológico dos óleos essenciais sobre <i>Drosophila suzukii</i> . ....	61
Tabela 5 - Dados obtidos nas análises morfométricas. ....	69

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE .....</b>	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
2.1 Metabólitos secundários de plantas .....	16
2.2 Óleos essenciais .....	17
2.2.1 Biossíntese dos constituintes dos óleos essenciais.....	18
2.2.1.1 Terpenos.....	19
2.2.1.2 Fenilpropanoides.....	25
2.3 Plantas em estudo.....	29
2.3.1 Plantas da família Anacardiaceae .....	30
2.3.1.1 <i>Schinus molle</i> .....	30
2.3.2 Plantas da família Myristicaceae .....	32
2.3.2.1 <i>Myristica fragrans</i> .....	32
2.3.3 Plantas da família Schisandraceae .....	33
2.3.3.1 <i>Illicium verum</i> .....	34
2.4 Potencialidades biológicas de óleos essenciais.....	35
2.4.1 Atividade inseticida de óleos essenciais .....	36
2.4.2 Atividade inibitória da acetilcolinesterase .....	38
2.5 Insetos .....	39
2.5.1 Insetos-praga .....	40
2.6 Inseto em estudo: <i>Drosophila suzukii</i> .....	40
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO .....</b>	<b>48</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>48</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>50</b>
2.1 Material vegetal .....	50
2.2 Extração e rendimento dos óleos essenciais .....	50
2.3 Caracterização química dos óleos essenciais.....	51
2.4 Inibição da enzima acetilcolinesterase.....	52
2.5 Insetos .....	53

2.6 Avaliação toxicológica dos óleos essenciais.....	53
2.7 Análise Histopatológica .....	54
2.7.1 Histoquímica .....	54
2.7.1.1 Técnica de Ácido Periódico-Schiff para detecção de polissacarídeos.....	55
2.7.1.2 Coloração com Azul de Bromofenol para detecção de proteínas .....	55
2.7.2 Análises morfométricas .....	55
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
3.1 Rendimento e composição química dos óleos essenciais .....	56
3.2 Inibição da enzima acetilcolinesterase.....	59
3.3 Toxicidade dos óleos essenciais sobre <i>Drosophila suzukii</i> .....	59
3.4 Histopatologia .....	60
3.4.1 Grupos controle I e II.....	63
3.4.2 Tratamento I.....	65
3.4.3 Tratamento II .....	66
3.4.4 Análise morfométrica.....	67
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>75</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção agrícola, uma das principais atividades econômicas do Brasil, sofre, anualmente, perdas consideráveis, entre outros fatores, pela ação de insetos que atingem o *status* de praga. Os prejuízos são decorrentes da destruição das mais variadas estruturas vegetais pelo inseto, por meio de seus hábitos alimentares ou comportamentais e, adicionalmente, pela transmissão de patógenos causadores de inúmeras doenças.

Os danos provocados por esses invertebrados são potencializados, principalmente, pela interação humana com o meio ambiente, através da extinção de espécies predadoras, da inserção de espécies exóticas em novos ecossistemas, da prática de monoculturas que possibilitam uma grande disponibilidade de recursos para as pragas e, também, pela utilização de técnicas de controle inadequadas.

O controle de infestações é mais eficiente quando há o monitoramento periódico da cultura, o que possibilita a rápida identificação de possíveis problemas e tomada de medidas menos drásticas. Aliado a isso, a adoção do manejo integrado de pragas é o caminho mais indicado a se seguir, pois a eliminação de plantas hospedeiras, o uso de mudas melhoradas geneticamente, a manutenção de predadores naturais na área agrícola, rotação de culturas e o uso de inseticidas seletivos e indicados para a cultura em questão diminuem as perdas da produção e não demandam gastos excessivos.

Entretanto, o uso de inseticidas sintéticos é feito de forma indiscriminada e abusiva. Como consequência dessa prática, tem-se a contaminação do solo, fontes hídricas e o ar. Normalmente, por serem moléculas persistentes, são ingeridas pelos humanos por meio da alimentação, pelo consumo de produtos de origem vegetal ou animal que tiveram contato com essas substâncias, estando relacionadas ao desenvolvimento de uma série de patologias, que vão desde alterações hepáticas, ao câncer e até a distúrbios neurológicos, em razão da toxicidade desses pesticidas. Quanto aos insetos-praga, o uso descontrolado dos produtos disponíveis no mercado tem promovido a seleção de populações resistentes, o que tem colaborado para a potencialização dos danos provocados por esses indivíduos.

Em decorrência disso, a busca por novas substâncias a serem empregadas no controle de pragas faz-se necessária. Nas últimas décadas, os produtos de origem natural ganharam destaque em pesquisas científicas em razão da sua grande disponibilidade, por serem

ambientalmente corretos, biodegradáveis e serem pouco nocivos a ecossistemas. Dentre todas as classes de produtos naturais, os óleos essenciais tornam-se alvo interessante em função de sua composição consistir em uma mistura de vários compostos lipofílicos, que facilmente interagem com membranas e tecidos celulares, e que oferecem variados mecanismos de ação, o que auxilia no retardamento do desenvolvimento do processo de resistência por parte de microorganismos, insetos e outros.

O presente trabalho objetiva-se a encontrar alternativas no controle de *Drosophila suzukii*, um inseto-praga, utilizando-se dos benefícios decorrentes do emprego de óleos essenciais.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Metabólitos secundários de plantas

Metabolismo pode ser compreendido como a totalidade das reações químicas que ocorrem no interior das células de organismos vivos, com a finalidade de prover energia e sintetizar moléculas indispensáveis à manutenção das condições ideais para sobrevivência de indivíduos. Tais reações são catalisadas por enzimas específicas que garantem a ocorrência dessas transformações de forma ordenada, de tal modo que o conjunto das etapas envolvidas nesses processos é chamado de rota metabólica. Os compostos químicos obtidos como produto nessas reações são denominados de metabólitos, que podem ser classificados como primários e secundários. Os metabólitos primários correspondem aos carboidratos, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e outros compostos que são responsáveis pela nutrição e participam de vias metabólicas fundamentais à vida do organismo (SIMÕES *et al.*, 2017).

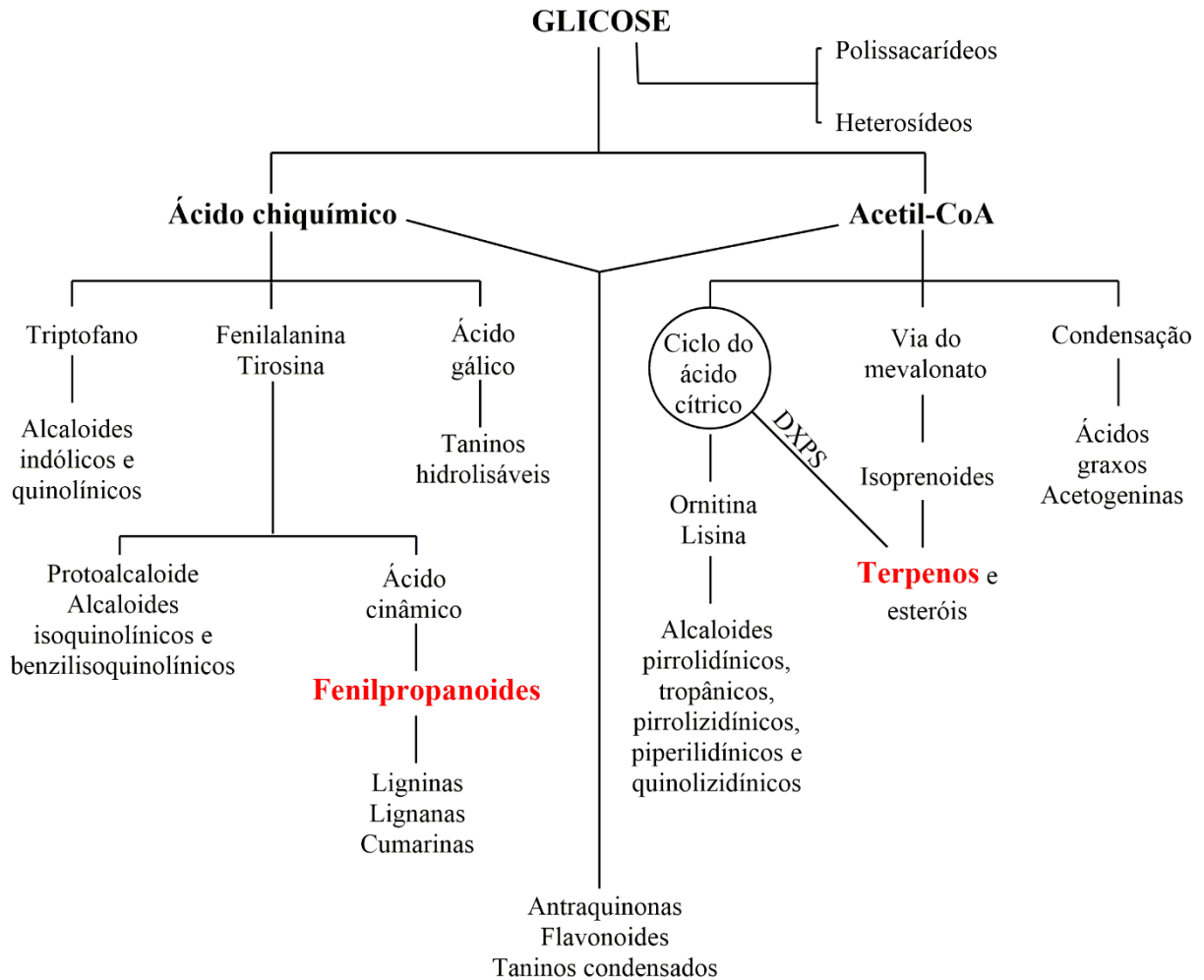
Em espécies vegetais, os metabólitos secundários são produzidos e armazenados em misturas normalmente complexas e apresentam finalidade diversificada. Atuam principalmente na defesa contra herbivoria ou ataque de patógenos, mas são utilizados também como sinalizadores químicos para atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, ou atuam como mediadores em relações simbióticas com outras plantas e microorganismos. Esses metabólitos se subdividem em várias classes, como os alcaloides, flavonoides, taninos, cumarinas, óleos essenciais (terpenos e fenilpropanoides), entre outros (WINK, 2008).

Os metabólitos secundários apresentam importante fonte de compostos de interesse econômico e tecnológico, sendo amplamente empregados em alimentos, cosméticos, medicamentos e preparações farmacêuticas. Em decorrência disso, o metabolismo secundário das plantas tem despertado grande interesse, devido ao seu crescente uso, o que tem implicado em um aumento no número de estudos que buscam elucidar as rotas bioquímicas que sintetizam esses metabólitos nos vegetais (TIWARI *et al.*, 2016).

Os metabólitos secundários são originados a partir do metabolismo da glicose, por meio dos intermediários ácido chiquímico e acetil-CoA, como esquematizado na Figura 1. A partir do ácido chiquímico, são formados taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcaloides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanoides; esses compostos apresentam aromaticidade. A partir do acetil-CoA, são originados os aminoácidos alifáticos e alcaloides

derivados deles, terpenos, esteroides, ácidos graxos e triglicerídeos. Os terpenos podem ser sintetizados também pela via da 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS) (PEREIRA; CARDOSO, 2012; TEXEIRA, 2016).

Figura 1 - Esquema da rota de biossíntese de metabólitos secundários em plantas.



Fonte: adaptado de Simões *et al.*, 2017.

## 2.2 Óleos essenciais

Óleos essenciais são definidos como “produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d’água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos” pela *International Standard Organization* (ISO). Recebem também a nomenclatura de óleos voláteis, etéreos ou essências, em decorrência de suas propriedades físico-químicas, que englobam o aspecto de serem líquidos oleosos, insolúveis em água, voláteis e, na maioria dos casos, possuírem aroma intenso e agradável. Apresentam

como características a alta instabilidade à luz, calor ou presença de oxigênio; são lipossolúveis e possuem coloração normalmente variando de incolor a ligeiro amarelo, mas óleos ricos em azuleno apresentarão coloração azulada, como o óleo essencial de camomila (ALEKSIC; KNEZEVIC, 2014; SIMÕES *et al.* 2017).

Os óleos essenciais são conhecidos e utilizados pelos humanos desde a Idade Média e, atualmente, continuam a ser de extrema importância para as áreas industrial e científica. Podem ser extraídos, principalmente, de plantas aromáticas, a partir de raízes, cascas, caules, botões florais, flores, frutos e sementes (BAKKALI *et al.* 2008).

Os constituintes dos óleos essenciais são biossintetizados em estruturas secretoras, em que o metabólito é formado em glândulas endógenas que eventualmente se rompem e liberam as substâncias na cavidade dessas estruturas. São armazenados em células secretoras e epidérmicas, cavidades, canais secretores e tricomas glandulares (BAKKALI *et al.* 2008).

Esses óleos podem participar de forma ativa nas interações ecológicas das plantas com outros indivíduos, sendo esses animais, microorganismos ou outras plantas. Desempenham a função de promover a manutenção da sobrevivência das plantas, conferindo a elas a capacidade de adaptação às condições do ambiente em que se encontram, como maior proteção contra herbívoros, funções ecológicas (atração de polinizadores e dispersores de sementes) e efeitos alelopáticos com outras plantas (CASTRO *et al.*, 2008).

A composição química dos óleos essenciais e a proporção de cada constituinte são determinadas pelos genes da espécie vegetal em questão. Contudo, fatores edafoclimáticos, representados pelas variações das estações do ano, índice de chuvas, radiação solar, altitude, poluição, entre outros, podem interferir na biossíntese dos metabólitos secundários. Podem ocorrer, também, variações promovidas por fatores decorrentes do processo de colheita e manuseio do material vegetal, como o método de cultivo, idade da planta, horário de colheita, secagem, estocagem, entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; BLANK *et al.*, 2010).

### **2.2.1 Biossíntese dos constituintes dos óleos essenciais**

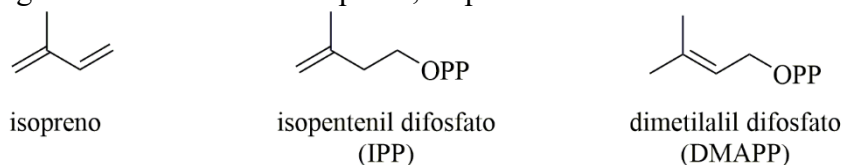
Os compostos químicos que formam os óleos essenciais estão divididos em duas classes principais, os terpenos, normalmente monoterpenos e sesquiterpenos, e fenilpropanoides (SANGWAN *et al.*, 2001; SIMÕES *et al.* 2017). Os constituintes apresentam funções orgânicas muito variadas, podendo ser hidrocarbonetos terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e

compostos sulfurados. O óleo essencial de determinada espécie vegetal pode conter poucos constituintes ou vários componentes, dos quais apenas pouquíssimos apresentarão concentração elevada, sendo chamados de constituintes majoritários; os demais em baixa concentração são chamados de minoritários e os de baixíssima concentração denominados de traços (SIMÕES *et al.* 2017).

### 2.2.1.1 Terpenos

Os terpenos são formados a partir de dois intermediários básicos, o isopentenil difosfato (IPP) e o dimetilalil difosfato (DMAPP). Os compostos terpênicos compreendem uma grande variedade de metabólitos secundários de origem vegetal. São classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas que possuem. Aqueles com 10 átomos de carbonos, que contêm duas unidades isoprênicas, são classificados como monoterpenos, os de 15 átomos de carbono (três unidades isoprênicas) são os sesquiterpenos e aqueles de 20 átomos de carbono (quatro unidades isoprênicas) são os diterpenos (TAIZ; ZEIGER, 2004; SIMÕES *et al.*, 2017). As estruturas do isopreno, IPP e DMAPP são apresentadas na Figura 2.

Figura 2 - Estruturas do isopreno, isopentenil e dimetilalil difosfato.



Fonte: do autor.

Os terpenos podem ser biossintetizados a partir de metabólitos primários, partindo-se de duas rotas metabólicas distintas. A primeira via consiste na rota de metabolismo do mevalonato, que é apresentada na Figura 3. Nessa via três moléculas de acetil-CoA são unidas por uma série de reações enzimáticas para formar o ácido mevalônico. Esse intermediário é, então, pirofosforilado, descarboxilado e desidratado, formando o isopentenil difosfato (IPP), sempre através da ação de enzimas específicas. Essa é a unidade prenilada ativa para a formação dos terpenos, que se interconverte por isomerização em dimetilalil difosfato (DMAPP). As moléculas de IPP e seu isômero DMAPP reagem para formar terpenos maiores, em reações do tipo “cabeça-cauda”. A adição eletrofílica de unidades de IPP e DMAPP, pela ação da enzima prenil-transferase, forma o intermediário geranyl difosfato

(GPP, C<sub>10</sub>), que condensa com outra unidade IPP, fornecendo o farnesildifosfato (FPP, C<sub>15</sub>). Por fim, a junção de FPP com outra unidade de IPP leva à produção de geranylgeranila difosfato (GGPP, C<sub>20</sub>), precursor dos diterpenos (DEWICK, 2009).

Figura 3 - Biossíntese de terpenos pela via do mevalonato (continua).

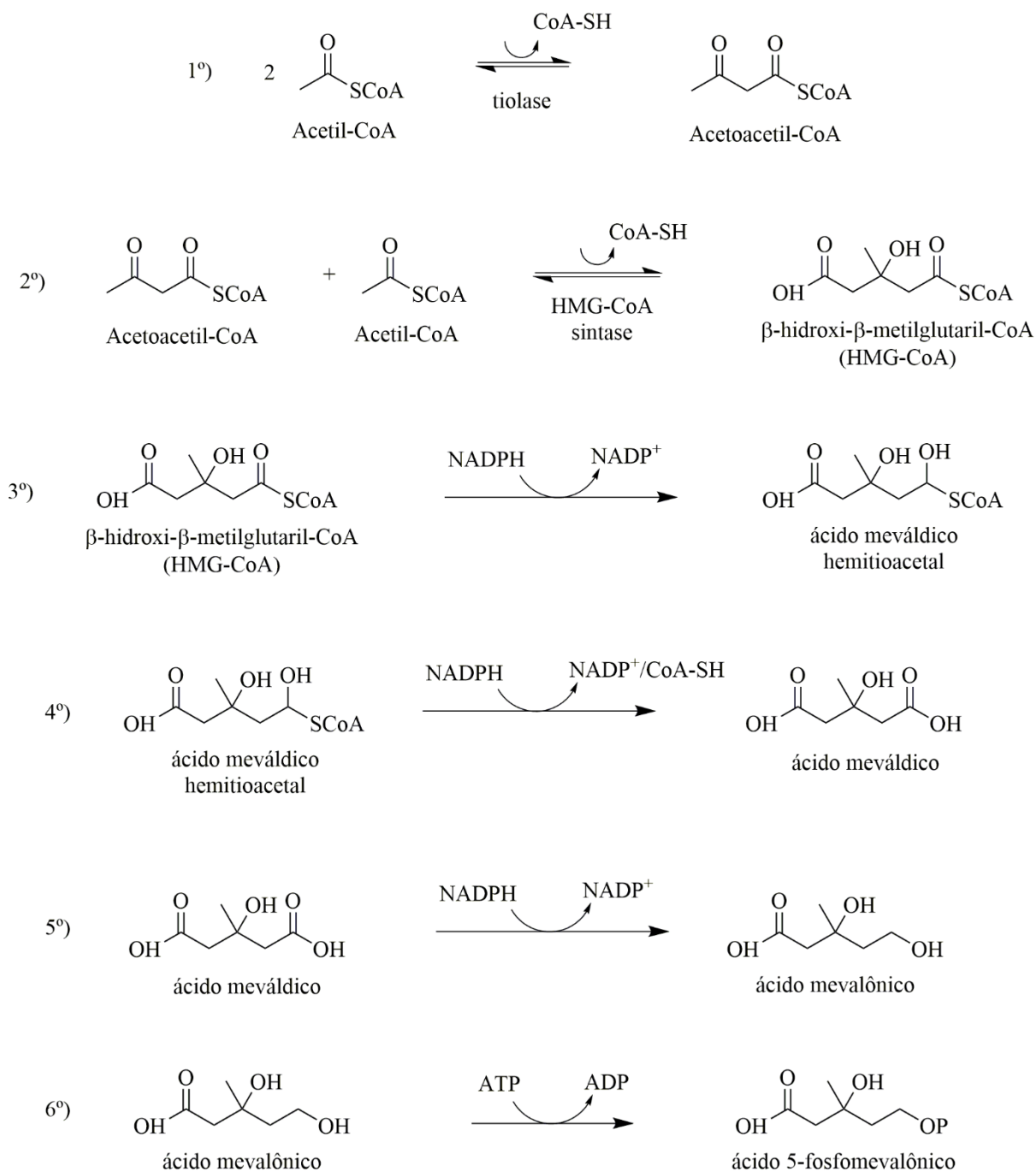


Figura 3 – Biossíntese de terpenos pela via do mevalonato (continua).

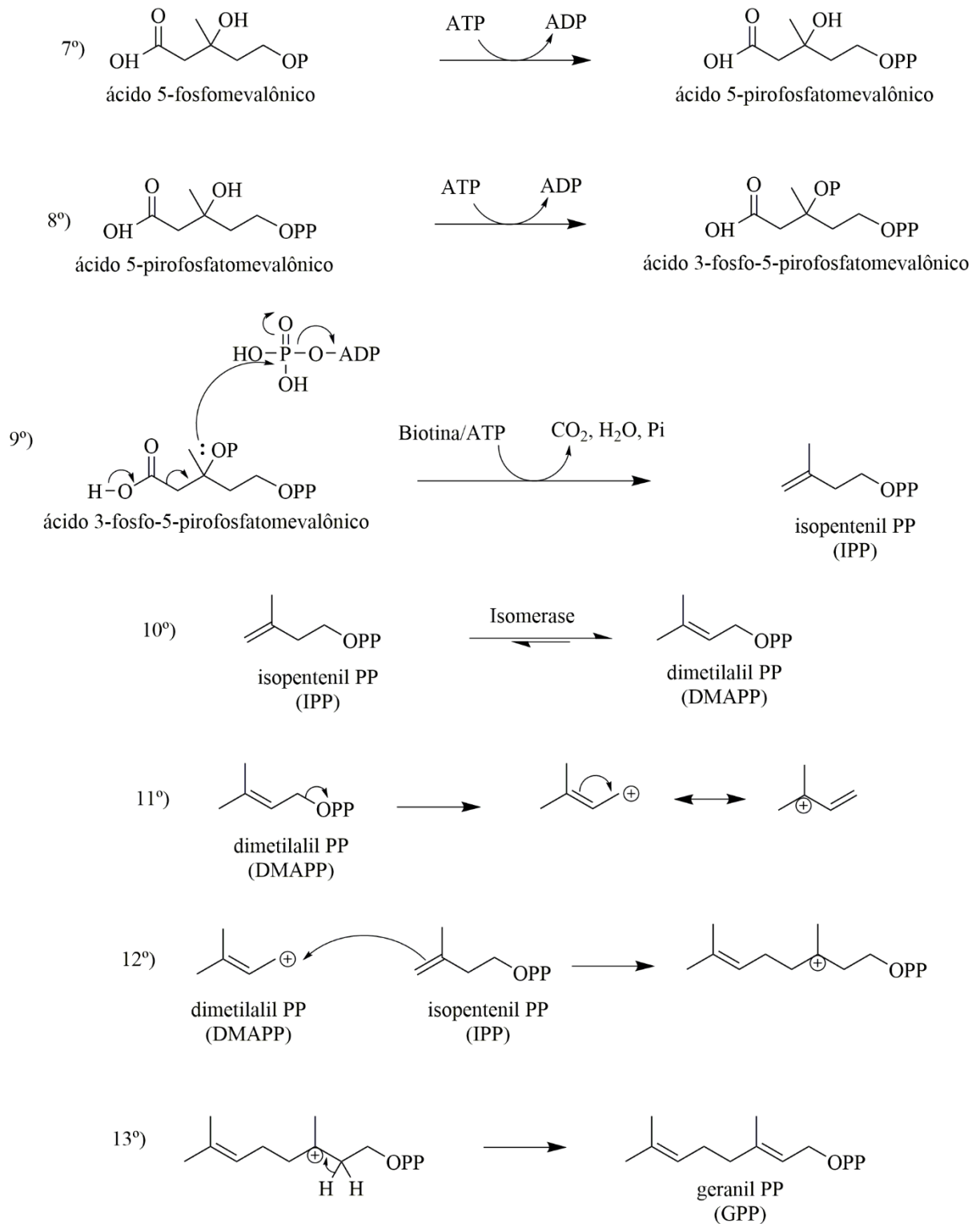
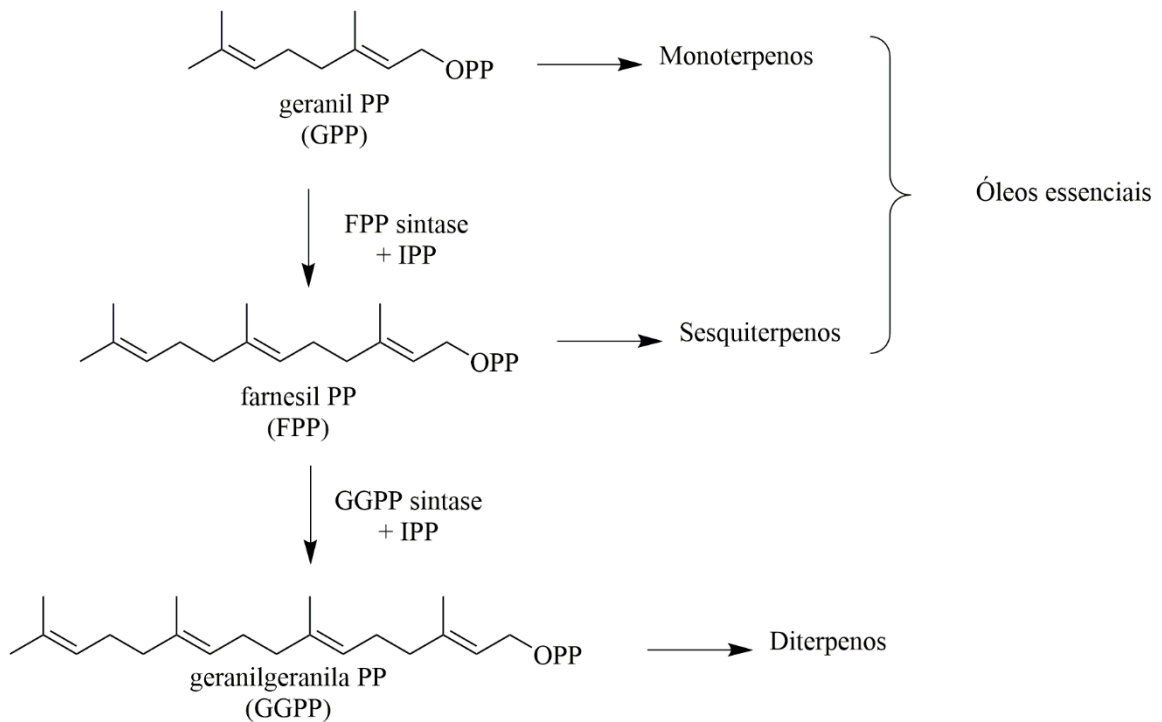


Figura 3 – Biossíntese de terpenos pela via do mevalonato (conclusão).



Fonte: adaptado de Dewick (2009).

A segunda via de biossíntese de terpenos é a 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS), apresentada na Figura 4. Essa rota metabólica ocorre nos plastídios e nela o piruvato e o D-gliceraldeído-3-fosfato formam o 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato que, por sua vez, dá origem ao 2-C-metil-D-eritritol-4P (MEP). Posteriormente, são formados por sucessivas reações o isopentenil difosfato (IPP) e o dimetilalil difosfato (DMAPP) (DEWICK, 2009).

Figura 4 - Biossíntese de terpenos pela via DXPS (continua).

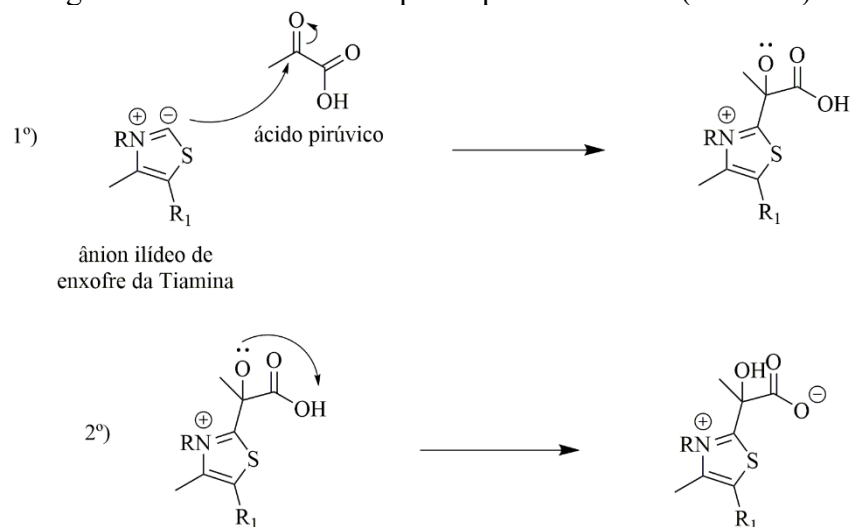


Figura 4 – Biosíntese de terpenos pela via DXPS (continua).

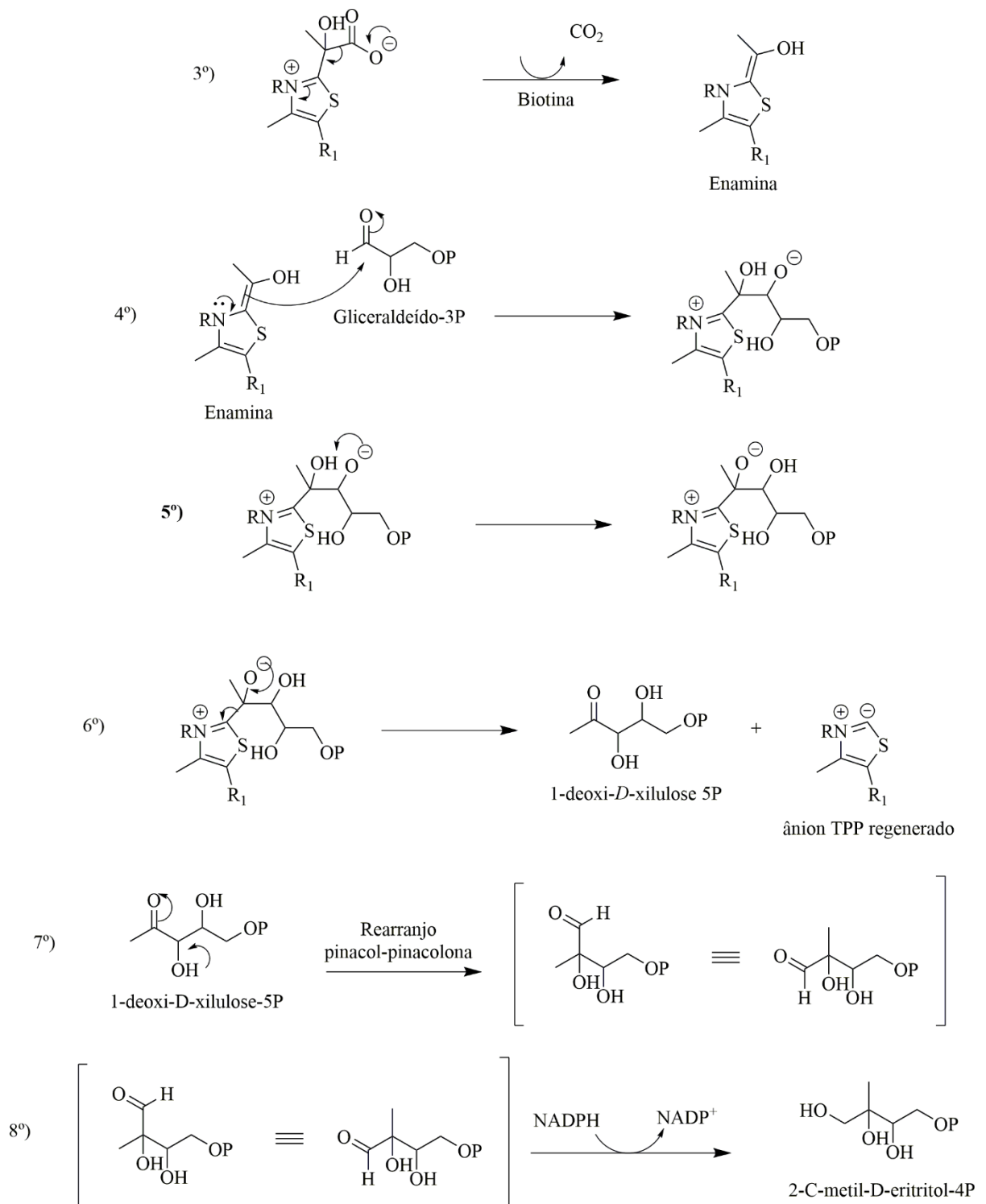
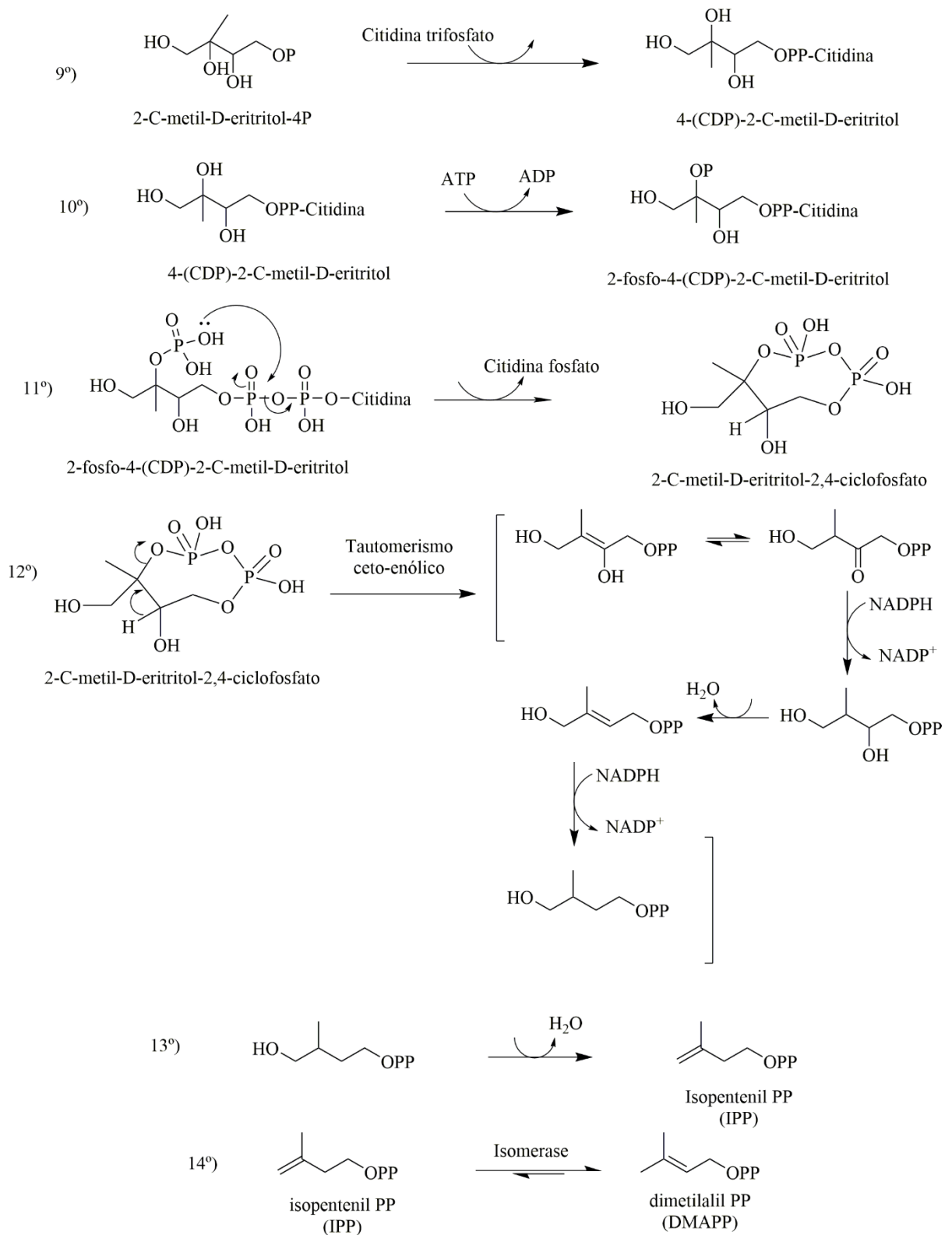




Figura 4 – Biossíntese de terpenos pela via DXPS (conclusão).



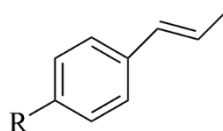
Fonte: adaptado de Dewick (2009).

Originadas através de um precursor comum, o acetil-CoA, as estruturas terpênicas sintetizadas pelas rotas do mevalonato e DXPS podem sofrer diversas modificações por meio de reações de redução, oxidação e ciclização catalisadas por enzimas, formando vários derivados terpênicos, que constituem um dos maiores grupos de metabólitos secundários vegetais (DEWICK, 2009).

### 2.2.1.2 Fenilpropanoides

Os fenilpropanoides são metabólitos secundários presentes em um grande número de espécies vegetais. São caracterizados por apresentarem uma estrutura básica formada por um anel benzênico unido a uma cadeia lateral insaturada com três átomos de carbono, conforme mostrado na Figura 5 (ALEKSIC; KNEZEVIC, 2014).

Figura 5 - Estrutura básica de um fenilpropanoide.



R = H ou OH

Fonte: do autor.

Os fenilpropanoides são produzidos a partir da via do ácido chiquímico e apresentam menor abundância do que os terpenos. Quando apresentam uma hidroxila no anel benzênico na posição *para* em relação à cadeia carbônica lateral, são derivados do aminoácido tirosina, e quando a hidroxila não está presente no composto, são derivados da fenilalanina (DEWICK, 2009). Os fenilpropanoides também podem conter em suas estruturas outros grupos funcionais oxigenados. Nessa rota metabólica ocorre, primeiramente, a formação do ácido chiquímico por meio da condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato (via glicolítica) e a eritrose-4-fosfato (via das pentoses). Após ser formado, o ácido chiquímico sofre várias reações, até ser convertido nos aminoácidos fenilalanina e tirosina. Pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (FAL), os aminoácidos perdem uma molécula de amônia, formando os ácidos cinâmico a partir da fenilalanina e *p*-cumárico a partir da tirosina. Por fim, através de reações de redução, oxidação e ciclização, os ácidos cinâmico e *p*-cumárico originam diversos fenilpropanoides (SIMÕES *et al.*, 2017). Essa via metabólica é apresentada na Figura 6.

Figura 6 - Biossíntese de fenilpropanoides (continua).

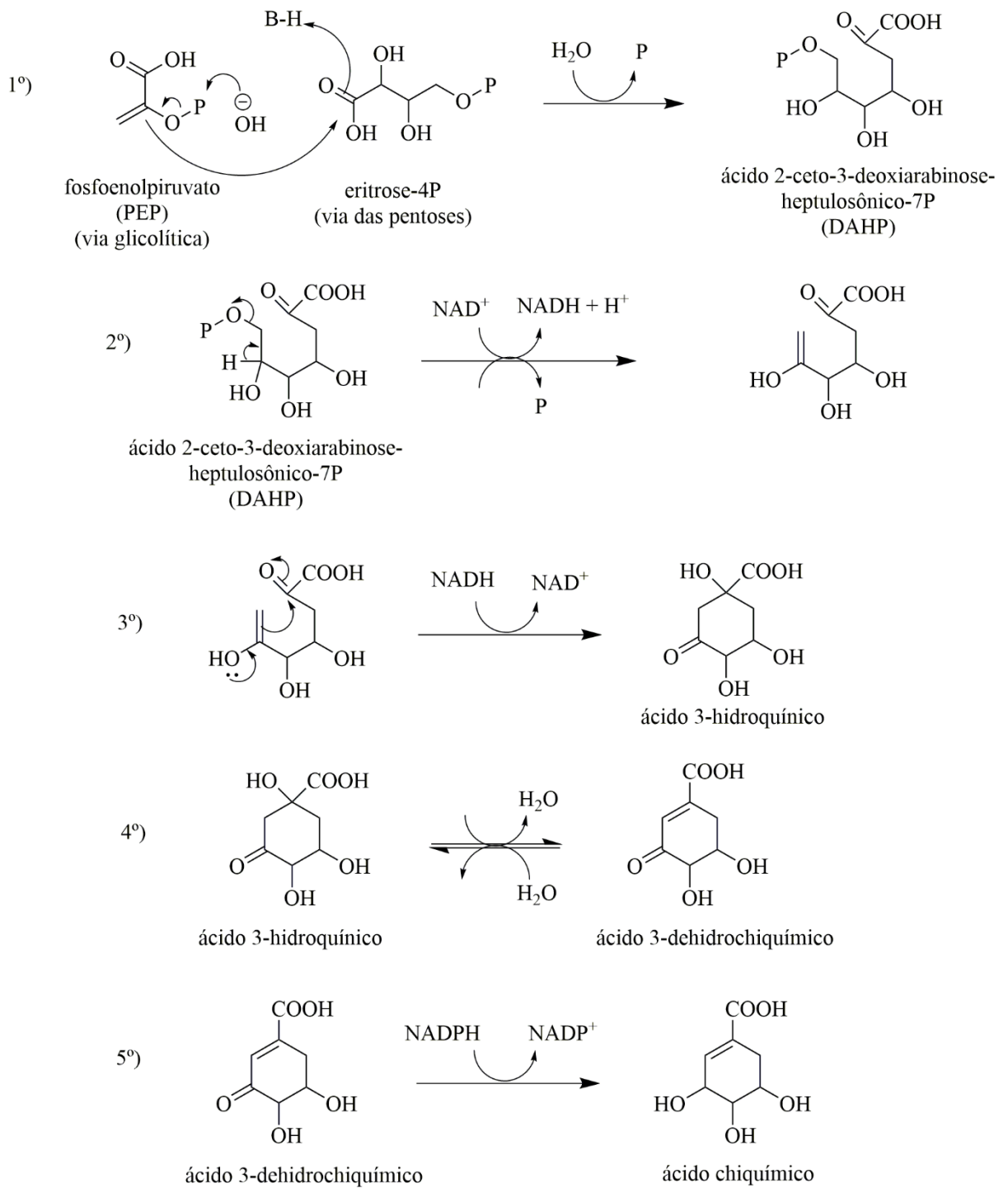


Figura 6 – Biossíntese de fenilpropanoides (continua).

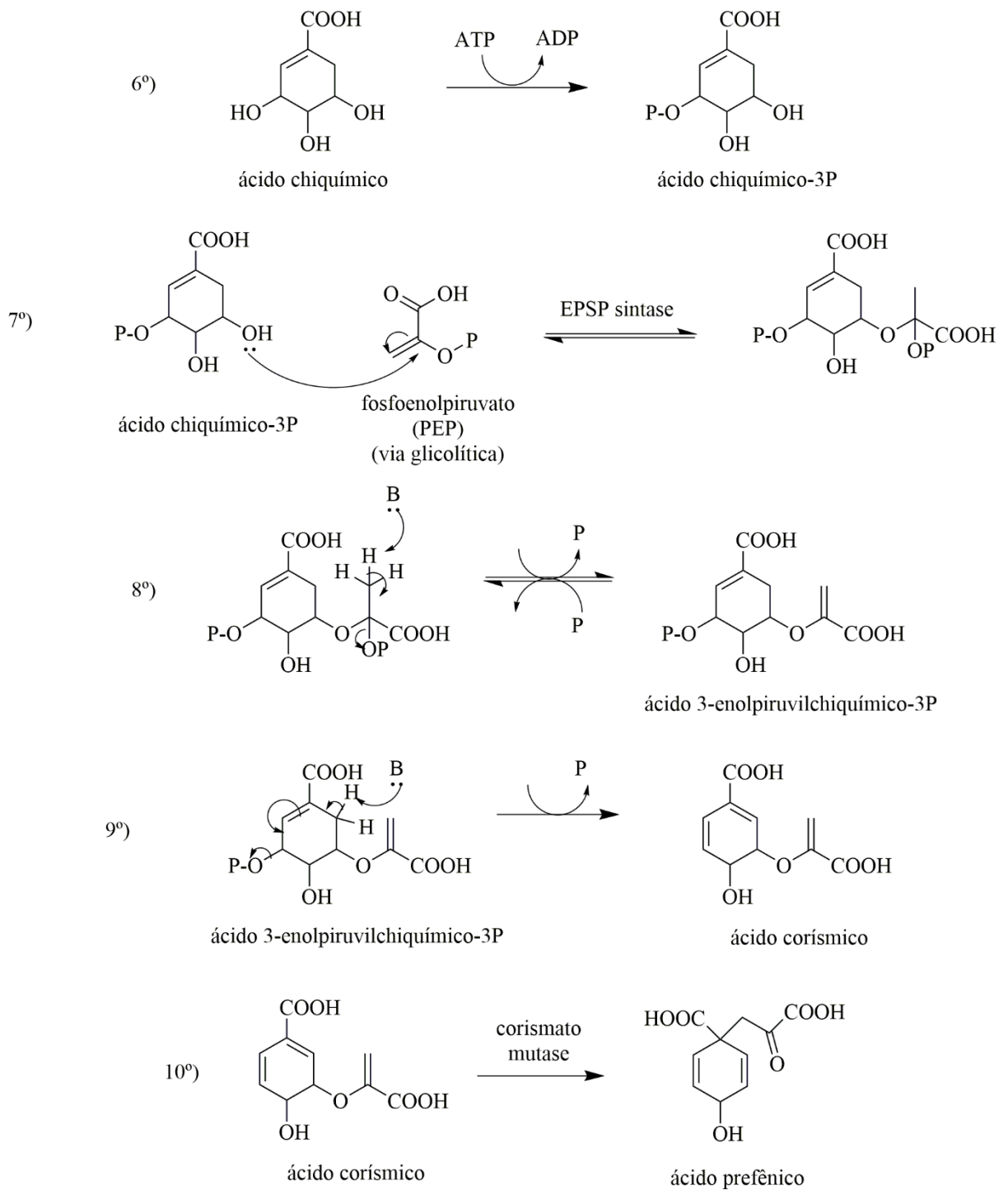
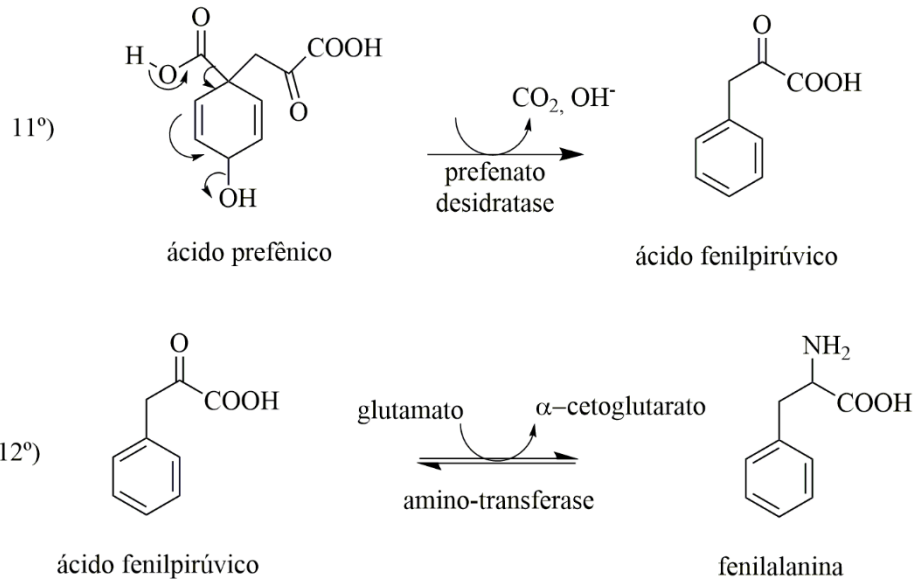
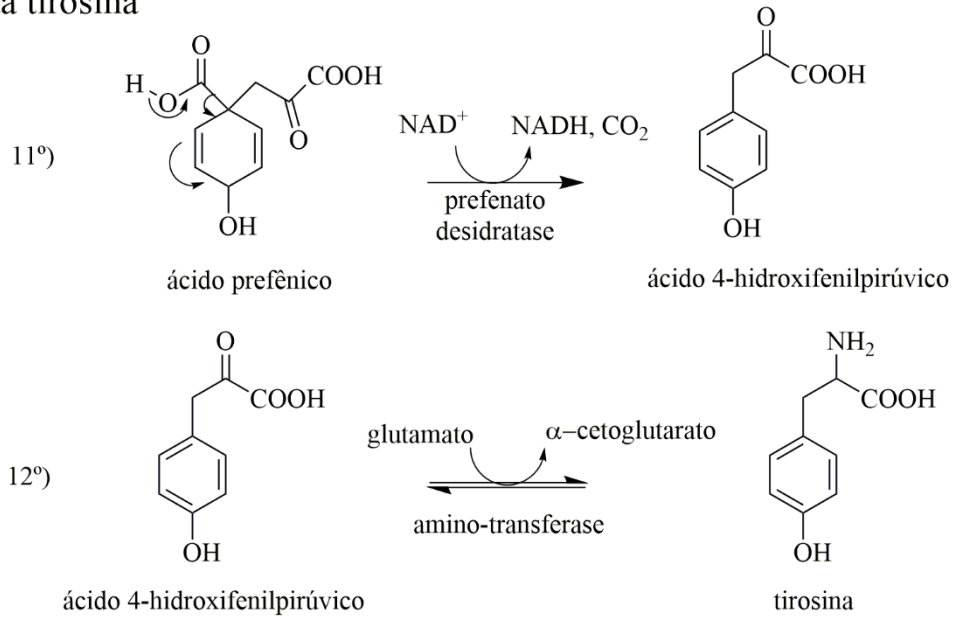


Figura 6 – Biossíntese de fenilpropanoídes (continua).

## Síntese da fenilalanina



## Síntese da tirosina



## Síntese de fenilpropanoídes

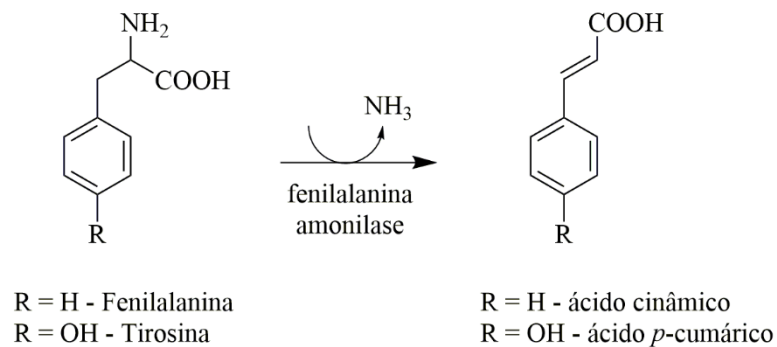
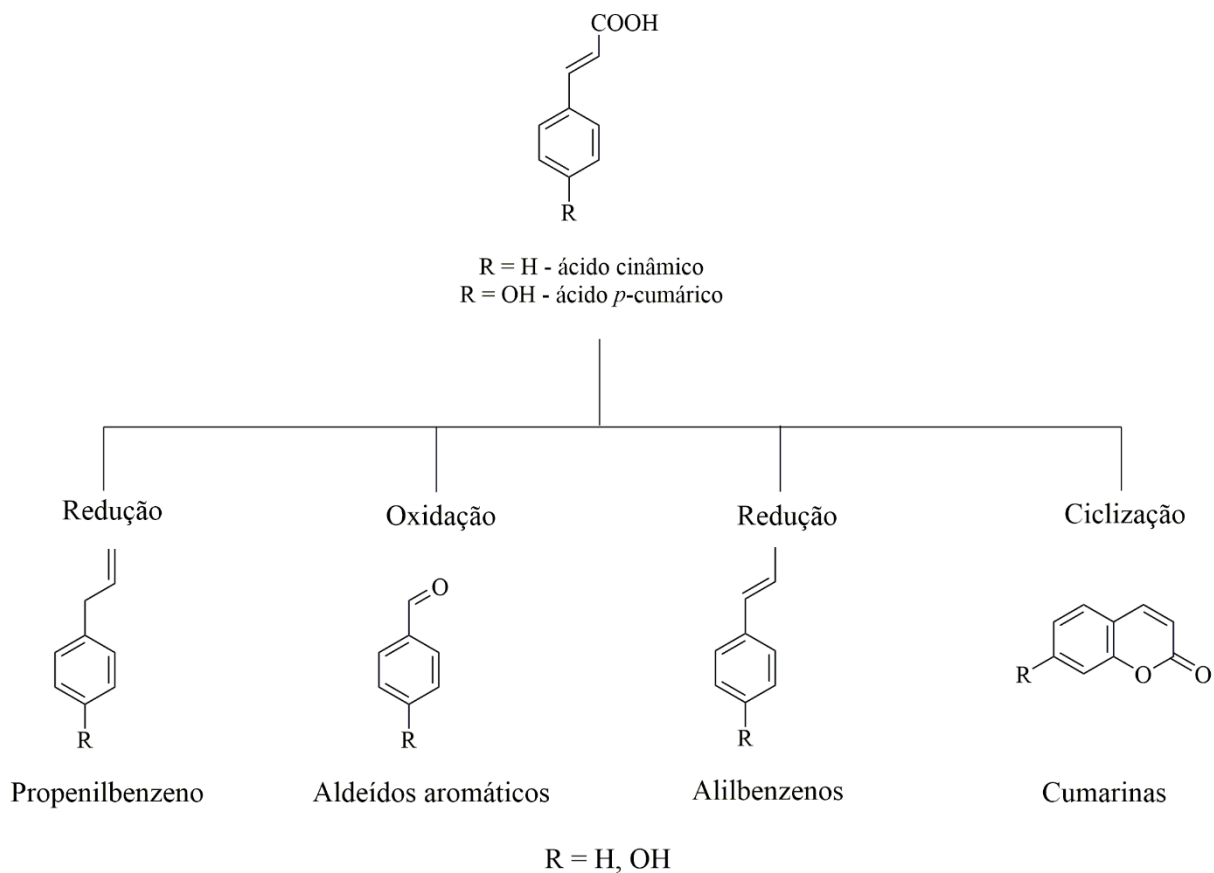


Figura 6 – Biossíntese de fenilpropanoides (conclusão).



Fonte: adaptado de Simões *et al.*, 2017.

### 2.3 Plantas em estudo

As plantas produzem um elevado número de metabólitos secundários, que podem ser chamados, também, de compostos fitoquímicos. A diversidade desses fitoquímicos está relacionada à família a que as plantas pertencem. Podem ocorrer, inclusive, mudanças significativas na composição em diferentes espécies do mesmo gênero (WETZEL; WHITEHEAD, 2020). A variação de moléculas fitoquímicas encontrada na natureza é originada nos diferentes mecanismos de seleção que as espécies vegetais enfrentaram com sucesso durante seu processo evolutivo (LEWINSOHN; GIJZEN, 2009).

Considerando essa grande diversidade química em plantas de famílias diferentes e buscando explorar o potencial das variadas classes de constituintes de óleos essenciais, o presente estudo utilizou três espécies vegetais para investigação. A primeira, *Schinus molle*, pertence à família Anacardiaceae, a segunda, *Myristica fragrans*, pertence à família Myristicaceae e, por fim, *Illicium verum*, que pertence à família Schisandraceae.

### 2.3.1 Plantas da família Anacardiaceae

A família Anacardiaceae abrange cerca de 81 gêneros e mais de 800 espécies que estão presentes nas regiões tropicais e subtropicais de todo o planeta, podendo se estender, também, a regiões temperadas. São encontradas em ambientes secos a úmidos, variando entre espécies arbóreas, arbustos, cipós e raramente subarbustos. Apresentam canais resinosos nos caules, floemas de pecíolos, grandes nervuras de folhas, flores e frutos. Além disso, normalmente exsudam metabólitos que causam dermatites por contato. Entretanto, alguns frutos de plantas dessa família são importantes para a agricultura, como manga (gênero *Mangifera*), caju (*Anacardium*), pimenta-rosa (*Schinus*) e pistache (*Pistachi*). Além desses, a amarula, fruto de *Sclerocarya birrea*, uma espécie nativa da África, é utilizado para a produção do popular licor de Creme de Amarula (PELL *et al.*, 2011).

#### 2.3.1.1 *Schinus molle*

*Schinus molle*, apresentada na Figura 7, é uma espécie arbórea nativa da América do Sul, incluindo o território brasileiro, sendo popularmente conhecida como aroeira-salsa, aroeira-branca, aroeira-mansa ou pimenta-rosa. É encontrada naturalmente nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. A palavra *Schinus* vem de *schinos*, proveniente do verbo grego *schizein*, que significa "cortar, fazer incisão", devido ao corte feito no tronco da planta para que flua sua resina, enquanto o termo latim *molle*, provém de *muli*, nome que os índios do Peru deram à referida planta (ZENG *et al.*, 2003).

Essa espécie atinge alturas que variam entre quatro e oito metros, com tronco grosso e inclinado. Suas folhas são verde-claro-acinzentadas, compostas com quatro a 12 jugos, folíolos subcoriáceos, glabros, de três a oito cm de comprimento, conforme pode ser visto em detalhes na Figura 8. Seus frutos possuem epicarpo que passa do verde ao marrom-avermelhado quando maduros, flores pequenas e amarelo-esverdeadas nas extremidades dos ramos e uma madeira dura, pouco elástica e de boa durabilidade sob condições naturais. É utilizada principalmente na fabricação de moirões e esteios e tem grande emprego na arborização e no paisagismo urbano em geral, uma vez que é tolerante a condições climáticas adversas (LORENZI, 2000; CARVALHO, 2003).

Figura 7 - Árvore da espécie *Schinus molle*.



Fonte: Lorenzi, 2000.

A aroeira-salsa é quimicamente caracterizada pela presença de flavonoides, taninos e óleos essenciais. Esses últimos atuam na atração de polinizadores, na proteção contra ataques de predadores, perda de água e na variação da temperatura (SANTOS *et al.*, 2010).

Figura 8 - Destaque de folhas e inflorescências de *Schinus molle*.



Fonte: Lorenzi, 2000.



### 2.3.2 Plantas da família Myristicaceae

A família Myristicaceae abrange cerca de 17 gêneros e 370 espécies que se desenvolvem entre os trópicos do planeta. As plantas dessa família frequentemente são árvores perenes de médio porte, raramente são arbustos ou cipós, e normalmente são aromáticas. A espécie de maior importância econômica é *Myristica fragrans*, ou noz-moscada, que é utilizada como especiaria, sendo amplamente produzida na Ásia e países caribenhos (KÜHN, KUBITZKI; 1993; JANOVEC; GARCÍA, 2004).

#### 2.3.2.1 *Myristica fragrans*

*Myristica fragrans* é uma espécie arbórea nativa das ilhas Banda, em Molucas na Indonésia. As principais áreas de cultivo de noz-moscada são a Indonésia e Granada, mas também é produzida em menor escala no Sri Lanka, Índia, China, Malásia e ilhas do Pacífico (REMA; KRISHNAMOORTHY, 2012; SARMA *et al.*, 2014).

Essa espécie é uma árvore cônica que tem altura variando de quatro a dez metros. É uma planta dioica com flores masculinas e femininas, ocorrendo em árvores diferentes. Os frutos, apresentados na Figura 9, são pendentes, largamente piriformes, amarelos, lisos, com sete a dez centímetros de comprimento e carnudos. Eles se dividem em duas metades quando maduros, mostrando a semente brilhante marrom-escuro ovoide com dois a três centímetros de comprimento com um tegumento duro, conforme apresentado na Figura 10. A semente da noz-moscada é grande, com endosperma ruminado (REMA; KRISHNAMOORTHY, 2012; KUETE, 2017).

O interesse pela noz-moscada surgiu na Idade Média quando os europeus descobriram as aplicações na culinária e medicina popular dessa especiaria. Em razão do valor que essa planta adquiriu, um conflito foi travado pela conquista das Ilhas Banda, principal local produtor até então. No final do século XIX, o seu uso estava se espalhando e novas aplicações surgiram explorando o potencial abortivo, afrodisíaco e alucinógeno. Atualmente é empregada no tratamento de artrite, diarreia, flatulência e outros distúrbios gastrointestinais pela medicina popular (SMITH, 2014).

Figura 9 - Fruto da espécie *Myristica fragrans*.



Fonte: Sarma *et al.*, 2014.

Figura 10 - Fruto maduro e sementes de *Myristica fragrans*.



Fonte: Sarma *et al.*, 2014.

Essa espécie apresenta como compostos fitoquímicos óleo essencial, óleo fixo, saponinas, compostos polifenólicos, taninos, epicatequina, entre outros. A farmacologia para essa espécie engloba atividade anticâncer, antidepressiva, antidiabética, antiinflamatória, analgésica, antimicrobiana, antioxidante, entre outros potenciais (REMA; KRISHNAMOORTHY, 2012; KUETE, 2017).

### 2.3.3 Plantas da família Schisandraceae

Inicialmente a família Schisandraceae englobava apenas dois gêneros, *Schisandra* e *Kadsura*, que totalizavam 50 espécies nativas do sudeste asiático e uma espécie de *Schisandra*

que ocorre no sudeste dos Estados Unidos. As plantas dessa família são trepadeiras lenhosas ou entrelaçadas, e notadamente aromáticas (KENG, 1993b). Entretanto, nos últimos anos, essa família passou a englobar outras famílias, das quais se pode destacar a Illiciaceae (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY, 2009; THE ANGIOSPERM PHYLOGENY *et al.*, 2016).

A família Illiciaceae englobava cerca de 42 espécies, que se caracterizavam por serem árvores pequenas ou arbustos aromáticos, nativas do sudeste asiático e norte-americano. Uma espécie que se destaca desta extinta família taxonômica é *Illicium verum*, seu fruto popularmente chamado de anis-estrelado é utilizado como especiaria (KENG, 1993a; SAUNDERS, 1997).

### 2.3.3.1 *Illicium verum*

*Illicium verum* ou anis-estrelado é frequentemente chamado, também, de anis-estrelado-chinês, pertence à família Schisandraceae. Seu fruto é uma importante especiaria do oriente. Essa espécie é nativa do sudeste da China. O anis-estrelado era conhecido fora da China em períodos anteriores à era cristã, ao lado de um seletivo grupo de plantas como canela e cravo. Foi inserida na Europa no final do século XVI por um navegador inglês. Hoje é uma especiaria popular em alguns países asiáticos e, até certo ponto, na Europa e na América do Norte (GEORGE, 2012; ROCHA; CANDIDO TIETBOHL, 2016).

É uma espécie arbórea perene que atinge altura variando entre oito e dez metros. As folhas são aromáticas. A parte comercial da árvore é a fruta, que mede entre 2,5 a 4,5 centímetros de diâmetro e consiste em cerca de oito carpelos em forma de barco dispostos em forma de verticilo em torno do eixo central. Os carpelos têm cerca de nove a 19 milímetros de comprimento e cada carpelo é internamente marrom avermelhado, brilhante e contém uma única semente frágil, plana, oval, amarela acastanhada, como pode ser visto na Figura 11. A fruta inspirou o nome anis-estrelado pelo atraente arranjo de carpelos em forma de estrela. Possui aroma de alcaçuz mais pungente e poderoso que o de erva-doce (GEORGE, 2012).

Essa espécie era utilizada na antiguidade na culinária e medicina popular por chineses e indianos para tratar infecções bacterianas, ação diurética e no combate a problemas estomacais. Atualmente é empregado na produção de cosméticos, produtos alopatóicos, aromaterapia, panificação e produção de bebidas ( WANG *et al.*, 2011; GEORGE, 2012; ROCHA; CANDIDO TIETBOHL, 2016).

Figura 11 - Frutos e sementes da espécie *Illicium verum*.



Fonte: Rocha; Candido Tietbohl, 2016.

O perfil fitoquímico é caracterizado pela ocorrência de óleo essencial, lignanas e flavonoides. Esses metabólitos secundários desempenham as atividades antibacteriana, antioxidante, inseticida, analgésica, sedativa e anticonvulsivante (WANG *et al.*, 2011).

#### 2.4 Potencialidades biológicas de óleos essenciais

Há séculos os seres humanos conhecem e exploram as mais diversas atividades biológicas dos óleos essenciais. Têm sido amplamente utilizados com finalidade bactericida, antiviral, fungicida, antiparasitária, inseticida, além de outras aplicações medicinais e cosméticas. Atualmente são de extrema valia para as indústrias farmacêutica, sanitária, cosmética, agrícola e alimentícia (BAKKALI *et al.*, 2008; JUGREET *et al.*, 2020).

Esse grande espectro de atividades biológicas está relacionado, entre outros fatores, à diversidade química dos constituintes dos óleos essenciais. Hidrocarbonetos, como limoneno, farneseno e mirceno, apresentam atividade antibiótica, antiviral, antitumoral, descongestionante e estimulante. Óxidos, como óxidos de bisaboleno e linalool, e 1,8-cineol, estão relacionados à atividade antiinflamatória, expectorante e estimulante. Ésteres, como acetatos de geranila, bornila e linalila, apresentam atividade antiinflamatória, fungicida, antiespasmódica, sedativa e anestésica. Álcoois, como mentol, linalool e citronelol, apresentam potencial anestésico, antimicrobiano, antiinflamatório e antiséptico. Fenóis, como carvacrol, timol e chavicol, estimulam o sistema imune, são antimicrobianos, espasmolíticos e

anestésicos. Cetonas, como carvona, tujona e pulegona, são mucolíticos, sedativos, analgésicos, digestivos e antivirais. Por fim, aldeídos, como neral, geranial e citronelal, são antimicrobianos, antipiréticos, antivirais, vasodilatadores e sedativos (DJILANI; DICKO, 2012).

São vastos e atuais os relatos na literatura de publicações que comprovam tais atividades biológicas, como pode ser visto a seguir: Atividade antioxidante ( FERREIRA *et al.*, 2019; HUANG *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021), atividade antifúngica ( BRANDÃO *et al.*, 2020; ROANA *et al.*, 2021; ZIYAT *et al.*, 2021), atividade bactericida (ALCANTARA *et al.*, 2017; CAMARGO *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2021), atividade antiinflamatória (XIAO *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2021), atividade analgésica (SHARIF *et al.*, 2020; DOS SANTOS *et al.*, 2021), atividade antiviral (SNENE *et al.*, 2017; GU *et al.*, 2019), atividade inibitória enzimática (SURUCIC *et al.*, 2017; PAVLIC *et al.*, 2021), atividade inseticida ( TEIXEIRA *et al.*, 2014; DOS SANTOS *et al.*, 2021; FRANCA *et al.*, 2021), entre diversas outras atividades biológicas e publicações.

#### **2.4.1 Atividade inseticida de óleos essenciais**

Um crescente número de estudos passou a investigar o potencial inseticida de óleos essenciais como uma alternativa aos inseticidas sintéticos. O uso de produtos naturais de origem vegetal é normalmente visto como uma opção ambientalmente correta. Como consequência, metabólitos secundários de plantas podem servir como compostos promissores para o desenvolvimento de inseticidas com novos modos de ação (PRAKASH *et al.*, 2021).

Essa atividade está diretamente relacionada à presença de monoterpenos e sesquiterpenos, que apresentam ação neurotóxica rápida em insetos, agindo por meio de vários receptores neurais, e também exibindo efeitos subletais apreciáveis, interferindo na oviposição e promovendo repelência. Entretanto, o grande número de pesquisas não é convertido em produtos comerciais. Isso acontece, principalmente, por questões regulamentárias para aprovação do uso de novas substâncias inseticidas, elevado custo para produção em grande escala e demanda de óleo essencial por outras indústrias (ISMAN, 2019).

Castro *et al.* (2006) avaliaram a atividade repelente do óleo essencial de *Achillea millefolium* e *Thymus vulgaris* sobre *Spodoptera frugiperda*. Os autores concluíram que o óleo essencial de *Achillea millefolium* foi altamente atrativo para a espécie de praga em questão, provavelmente pela presença do terpeno germacreno-D, enquanto o de *Thymus*

*vulgaris* foi repelente. Texeira *et al.* (2014) avaliaram o efeito inseticida do óleo essencial de *Lippia origanoides* e *Mentha spicata* sobre o afídeo *Myzus persicae* em um teste de preferência, utilizando as concentrações de 0,1 e 5% de óleo essencial em água e Tween 80. Os resultados obtidos mostraram que quando utilizada a concentração de 5%, os insetos apresentaram mortalidade e redução da oviposição significativamente mais elevada que o controle. No mesmo ano, Lima *et al.* (2014) avaliaram a toxicidade dos óleos essenciais de *Illicium verum*, *Ageratum conyzoides*, *Ocotea odorifera* e *Piper hispidinervum* sobre outra espécie de afídeo denominada *Schizaphis graminum*. Os autores concluíram que todos os óleos apresentaram toxicidade para o afídeo, tornando-se uma alternativa para o controle dessa praga.

Erland *et al.* (2015) avaliaram a ação de nove óleos essenciais e três terpenos obtidos comercialmente sobre *Drosophila suzukii*, empregando os bioensaios de fumigação e por contato. Os resultados mostraram que o monoterpene linalol e o óleo essencial de *Lavandula latifolia* apresentaram o melhor desempenho no teste de fumigação e o terpeno 1,8-cineol e o óleo essencial de *L. latifolia* no teste de exposição por contato. Renkema *et al.* (2016) avaliaram a repelência provocada à *D. suzukii* pelos óleos essenciais obtidos comercialmente de gerânio, hortelã-pimenta, gengibre, eucalipto, citronela, lavanda, alecrim, tomilho, cedro-branco oriental, abeto de bálsamo, abeto branco e pinheiro-branco. Os resultados mostraram que o óleo de hortelã-pimenta apresentou melhor desempenho repelente, enquanto o de tomilho promoveu a mortalidade de insetos machos. Neste mesmo ano, Park *et al.* (2016) avaliaram o potencial inseticida sobre *D. suzukii* e inibição da acetilcolinesterase pelo óleo essencial de espécies da família Lamiaceae e de seus constituintes majoritários. Os autores concluíram que o óleo essencial de *Mentha piperita* e *Perilla frutescens* apresentaram melhor desempenho fumigante, enquanto *Satureja montana* e *Thymus zygis* apresentaram maior toxicidade por contato. O monoterpene perilaldeído promoveu maior inibição da enzima acetilcolinesterase. Posteriormente, Jang *et al.* (2017) avaliaram a atividade inseticida de óleos essenciais de plantas da família Myrtaceae e seus constituintes majoritários sobre *D. suzukii*. No ensaio de fumigação, *Eucalyptus citriodora* e *Melaleuca teretifolia* e o monoterpene geranial apresentaram melhor desempenho, enquanto no ensaio por contato *M. teretifolia* e o monoterpene neral foram mais efetivos.

Recentemente, Dos Santos *et al.* (2021) avaliaram a atividade inseticida do óleo essencial de flores da espécie *Tephrosia vogelii* sobre o afídeo *Cerosipha forbesi*. Foram identificados como constituintes desse óleo os terpenos  $\alpha$ -pineno, limoneno e *o*-cimeno, e

os sesquiterpenos oxigenados nerulidol, espatulenol e farnesol. Os ensaios para avaliação inseticida mostram que esse óleo apresentou bom desempenho nos experimentos realizados em laboratório e no campo. Em outra publicação, Franca *et al.* (2021) avaliaram a atividade inseticida do óleo essencial de *Piper capitarianum* sobre duas espécies do gênero *Aedes*. Os componentes majoritários encontrados no óleo foram *trans*-cariofileno (20,0%),  $\alpha$ -humuleno (10,2%),  $\beta$ -mirceno (10,5%),  $\alpha$ -selineno (7,2%) e linalol (6,0%). Foi observado que esse óleo essencial apresentou atividade inseticida para larvas e adultos das duas espécies em estudo.

Tem sido reportada, também, a capacidade de os óleos essenciais causarem alterações morfológicas em diversos órgãos de insetos. Franca *et al.* (2021), no mesmo trabalho citado anteriormente, relataram a alteração de estruturas externas abdominais em larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* quando submetidas ao óleo essencial de *Piper capitarianum*. Alves *et al.* (2018) reportaram que o óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* causou importantes alterações histológicas no intestino médio de larvas de *Culex quinquefasciatus*. Análises histoquímicas revelaram que o teor de polissacarídeos e glicoconjugados foram reduzidos drasticamente nas larvas submetidas ao óleo. Dutra *et al.* (2019), por sua vez, relataram que os óleos essenciais de *Piper corcovadensis*, *Piper marginatum* e *Piper arboreum* causaram alterações nocivas ao intestino médio de larvas de *Spodoptera frugiperda*. Tais alterações histopatológicas consistiram no alongamento das células colunares, formação de protrusões citoplasmáticas, redução do teor de carboidratos e diminuição da proliferação celular.

#### **2.4.2 Atividade inibitória da acetilcolinesterase**

A acetilcolinesterase é uma enzima da classe das serina-hidrolases responsável por encerrar a transmissão de um impulso nervoso por meio da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em acetato e colina nas vias colinérgicas dos sistemas nervosos central e periférico (QUINN, 1987).

A inibição dessa enzima é responsável por uma das vias de ação da atividade inseticida de óleos essenciais e dos inseticidas sintéticos pertencentes à classe dos organofosforados e carbamatos (CASIDA; DURKIN, 2013). Com a enzima desfuncionalizada, ocorre um acúmulo excessivo de acetilcolina nas regiões sinápticas, promovendo inicialmente uma superexcitação do artrópode, seguida de hiperextensão muscular, que culmina com completa imobilização do indivíduo ou morte (ENAN, 2001).

Muitos estudos têm avaliado o potencial de óleos essenciais para inibirem a enzima acetilcolinesterase. Lópes *et al.* (2019) avaliaram o potencial de inibição da enzima pelo óleo essencial de *Origanum syriacum*. A caracterização mostrou que o componente majoritário desse óleo foi o carvacrol, correspondendo a 82,6% da mistura. E a concentração de inibição para 50% da enzima (CI<sub>50</sub>) foi de 0,461 mg mL<sup>-1</sup>. Em outra pesquisa, Barbosa *et al.* (2020) avaliaram o potencial de inibição da enzima pelo óleo essencial da casca da fruta de *Myrciaria floribunda*. A caracterização indicou que os componentes majoritários foram  $\delta$ -cadineno (26,8%),  $\gamma$ -cadineno (15,69%),  $\gamma$ -muuroleno (6,21%),  $\alpha$ -muuroleno (6,11%) e (*E*)-cariofileno (5,54%). Foram obtidos valores para CI<sub>50</sub> de 0,08 e 23  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> para enzima comercial de *Electrophorus electricus* e extraído de *Crassostrea rhizophorae*, respectivamente.

## 2.5 Insetos

Os insetos pertencem à classe Insecta, que por sua vez, está subordinada à superclasse Hexapoda, que é caracterizada por indivíduos em fase adulta com corpo dividido em três principais regiões (cabeça, tórax e abdômen) e seis pernas. Dentro da classe Insecta, há a subdivisão em ordens representadas por linhagens que divergem entre si, sendo conhecidas por um conjunto de características bem distintas que permitem, quase sempre, fácil identificação. Como exemplos de ordens, têm-se: Coleoptera (besouros), Diptera (moscas), Lepidoptera (borboletas e mariposas), entre outras. Essa classe compreende um grande número de espécies, sendo a maioria ainda não identificada (BROWN, 2001; RESH; CARDÉ, 2009; JARZEMBOWSKI, 2016).

Os insetos vivem em ambientes variados, aquáticos ou terrestres, sobre e sob o solo, durante a totalidade de sua vida ou parte dela. O ciclo de vida dos insetos permite a sua sobrevivência em uma grande variedade de condições, com extremos de frio ou calor, em períodos úmidos ou secos, ou ainda, em climas muito variáveis em curtos intervalos de tempo. Atuam em variados ecossistemas promovendo a reciclagem de nutrientes por meio da degradação de materiais vegetais ou de origem animal; promovem a propagação de plantas, incluindo a polinização e dispersão de sementes; servem de alimento para espécies de vertebrados, como aves, mamíferos, répteis e anfíbios (GULLAN; CRASTON, 2014a).

Esses seres vivos são de extrema importância em função da sua grande diversidade, pelo papel ecológico que desempenham, pela influência que exercem na agricultura e por



serem vetores de transmissão de doenças aos seres humanos e outras espécies (SCUDDER, 2009).

### 2.5.1 Insetos-praga

Uma população de inseto pode receber o *status* de praga em função da abundância de indivíduos e os efeitos negativos que causam. Normalmente, esses efeitos decorrem da prática alimentar dos insetos sobre a fisiologia do hospedeiro, que podem ser plantas, animais ou humanos. O nível de dano varia de acordo com a espécie praga e com o hospedeiro. Por exemplo, moscas da fruta, mesmo em baixos índices populacionais, promovem danos estéticos que comprometem a comercialização do produto. Já gafanhotos causam danos em pastagens quando atingem altas densidades populacionais (GULLAN; CRASTTON, 2014b).

Especificamente em plantas, os danos podem ser variados e atingir todos os órgãos vegetais. Serão considerados danos diretos quando a parte comprometida é a de interesse comercial e, indireto, quando a estrutura atingida não possui valor econômico, mas ser importante para a fisiologia vegetal, comprometendo a sua produtividade. Além disso, os insetos podem atuar indiretamente ao transmitir vírus, bactérias, fungos e outros patógenos, ou injetar substâncias toxicogênicas durante o processo alimentar (GALLO, 2002).

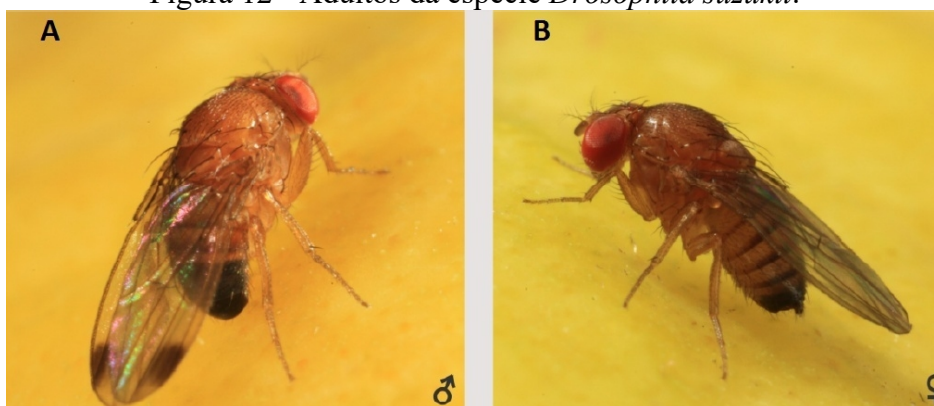
Alguns fatores colaboram para que insetos se tornem praga. Dentre esses fatores, podem-se destacar a inserção de espécies exóticas em ambientes que não possuem predadores naturais específicos. Adicionalmente, um inseto pode ser inofensivo até se tornar o vetor de doenças, ou ainda, insetos nativos podem se tornar praga para plantas exóticas inseridas em seu habitat. Não menos importante, a prática da monocultura favorece a proliferação de insetos especialistas ou espécies generalistas em razão do grande aglomerado de recursos alimentares e, por fim, o uso indiscriminado de inseticidas favorece a seleção de indivíduos resistentes (GULLAN; CRASTTON, 2014b).

### 2.6 Inseto em estudo: *Drosophila suzukii*

*D. suzukii*, Figura 12, é uma espécie de mosca, (Diptera: Drosophilidae), que apresenta grande potencial para causar danos econômicos, pois as fêmeas possuem ovipositor serrilhado que lhes permitem infestar frutos saudáveis e não danificados antes da colheita, apresentando

grande variedade de hospedeiros, como amoras, mirtilos, cerejas, uvas, morangos, framboesas e espécies selvagens, além de frutas apodrecidas caídas ao solo (LEE *et al.*, 2011).

Figura 12 - Adultos da espécie *Drosophila suzukii*.



Fonte: Andreazza *et al.*, 2016.

Nativa do leste asiático, os primeiros relatos de ocorrência no Brasil, dessa praga em potencial, remontam à Região Sul do país, na cidade de Nova Veneza em fevereiro de 2013, seguida por Erechim em março, Botuverá em abril, Vila Maria e Osório em maio. É impossível determinar com precisão por onde e quando essa espécie foi inserida em território nacional, mas dados de coletas anteriores sugerem que a entrada se deu pelos estados do Sul durante o verão de 2012/2013 (DEPRÁ *et al.*, 2014).

Os indivíduos adultos medem de dois a três milímetros, possuem olhos vermelhos, tórax e abdômen de coloração marrom pálido. Os machos, Figura 11A, se diferem das fêmeas, Figura 11B, pela presença de uma mancha escura próxima à borda de cada asa. A fêmea põe de um a três ovos por local de postura, chegando até a, aproximadamente, 380 ovos durante sua vida completa. Os ovos são translúcidos, de coloração branco-leitosa e brilhante; à medida que a larva se desenvolve, o aspecto leitoso se extingue. As larvas também são branco-leitosas, com corpo cilíndrico e aparelho bucal de coloração preta, desenvolvem-se dentro da fruta hospedeira, apresentando três instares. O processo alimentar da larva cria áreas na polpa da fruta de aspecto repugnante, inviabilizando a sua comercialização. Completado o desenvolvimento larval, formam-se as pupas, que inicialmente são amarelo-acinzentadas, posteriormente ficam castanhas e, por fim, amareladas e enrijecidas (WALSH *et al.*, 2011).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTARA, J. M. *et al.* Chemical Composition and Bactericidal Activity of the Essential Oils of Four Species of Annonaceae Growing in Brazilian Amazon. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 4, p. 619-622, 2017.
- ALEKSIC, V.; KNEZEVIC, P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. **Microbiological Research**, v. 169, 240-254, 2014.
- ALVES, K. F. *et al.* *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) essential oil toxicity to *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 31, p. 31718-31726, 2018.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, D. C. D. *et al.* Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory potential, in silico, of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg fruit peel essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 151, p. 10, 2020.
- BLANK, A. F. *et al.* Comportamento fenotípico e genotípico de populações de manjeriço. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 28, n. 3, p. 305-310, 2010.
- BRANDÃO, R. M. *et al.* Antifungal and antimycotoxigenic effect of the essential oil of *Eremanthus erythropappus* on three different *Aspergillus* species. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 35, n. 5, p. 524-533, 2020.
- BROWN, B. V. Insects, Overview. In: LEVIN, S. A. (Ed.). **Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)**. Waltham: Academic Press, 2001. p. 308-312.
- CAMARGO, K. C. *et al.* Antibacterial action of the essential oil from in *Cantinoa carpiifolia* benth. Against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 35, n. 1, p. 99-106, 2020.
- CARVALHO, P. E. R. Aroeira-Salsa: *Schinus molle*. In: \_\_\_\_\_. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. v.1. 1.ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. Cap. 14, p. 169-176.
- CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. **Annu Rev Entomol.** v. 58, p. 99-117, 2013.
- CASTRO, D. P. *et al.* Não-preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera: noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Rev. brasil. pl. med.** v. 8, n.4, 2006.
- CASTRO, N. E. A. *et al.* Avaliação de rendimento e dos constituintes químicos do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. colhidas em diferentes épocas do ano em municípios de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 1, p. 70-75, 2008.

DEPRÁ, M. *et al.* The first records of the invasive pest *Drosophila suzukii* in the South American continent. **J. Pest Scie**, v. 87, p.379-383, 2014.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. Hoboken: J. Wiley, 2009. 327 p.

DJILANI, A.; DICKO, A. The therapeutic benefits of essential oils. In: BOUAYED, J. **Nutrition, wellbeing and health**. Rijeka: IntechOpen, 2012. p.155-178.

DOS SANTOS, A. T. B. *et al.* Chemical identification and insecticidal effect of *Tephrosia vogelii* essential oil against *Cerosipha forbesi* in strawberry crop. **Crop Protection**, v. 139, 2021.

DOS SANTOS, E. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory articular effects of essential oil and camphor isolated from *Ocimum kilimandscharicum* Gurke leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, 2021.

DUTRA, K. A. *et al.* Morphological and immunohistochemical study of the midgut and fat body of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: noctuidae) treated with essential oils of the genus *Piper*. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 94, n. 7, p. 498-513, 2019.

ENAN E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. v. 130, n.3, p.325-37, 2001.

ERLAND, L. A. E. *et al.* Insecticidal and oviposition deterrent effects of essential oils and their constituents against the invasive pest *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae). **Crop Protection**, v. 78, p. 20-26, 2015.

FERREIRA, V. R. F. *et al.* Colorimetric, electroanalytical and theoretical evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium aromaticum* L., *Origanum vulgare* L., *Mentha spicata* L. and *Eremanthus erythropappus* M. essential oils, and their major constituents. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 20, p. 7653-7662, 2019.

FRANCA, L. P. *et al.* *Piper capitarianum* essential oil: a promising insecticidal agent for the management of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 8, p. 9760-9776, 2021.

GALLO, D. *et al.* Importância das pragas das plantas. In: \_\_\_\_\_. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. Cap. 3, p. 11-106.

GEORGE, C. K. 24 - Star anise. In: PETER, K. V. (Ed.). **Handbook of Herbs and Spices (Second Edition)**: Woodhead Publishing, 2012. p. 487-503.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GU, S. H. *et al.* Antitumor, Antiviral, and Anti-Inflammatory Efficacy of Essential Oils from *Atractylodes macrocephala* Koidz. Produced with Different Processing Methods. **Molecules**, v. 24, n. 16, 2019.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. H. Importance, diversity and conservation of insects. In: \_\_\_\_\_. **The Insects: an outline of entomology**. 5. ed. Hoboken: Ed. John Wiley & Sons Ltd. , 2014a, p. 1-25.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. H. Pest management. In: \_\_\_\_\_. **The Insects: an outline of entomology**. 5. ed. Hoboken: Ed. John Wiley & Sons Ltd. , 2014b, p. 418-455.

HUANG, K. *et al.* Characteristics of two cedarwood essential oil emulsions and their antioxidant and antibacterial activities. **Food Chemistry**, v. 346, 2021.

ISMAN, M. B. Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. **Phytochemistry Reviews**, p. 7, 2019.

JANG, M. *et al.* Biological activity of Myrtaceae plant essential oils and their major components against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Pest Management Science**, v. 73, n. 2, p. 404-409, 2017.

JANOVEC, J. P.; GARCÍA, R. Tropical forests: Myristicaceae. In: BURLEY, J. (Ed.). **Encyclopedia of Forest Sciences**. Oxford: Elsevier, 2004. p.1762-1767.

JARZEMBOWSKI, E. A. Insects. In: **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**: Elsevier, 2016.

JUGREET, B. S. *et al.* Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. **Trends in Food Science & Technology**, v. 101, p. 89-105, 2020.

KENG, H. Illiciaceae. In: KUBITZKI, K. *et al.* **The Families and Genera of Vascular Plants Flowering plants. Dicotyledons (Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families)**. Berlin: Springer-Verlag, 1993a. v. 2, p.344-347.

KENG, H. Schisandraceae. In: KUBITZKI, K. *et al.* **The Families and Genera of Vascular Plants Flowering plants. Dicotyledons (Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families)**. Berlin: Springer-Verlag, 1993b. v.2, p.589-592.

KUETE, V. Chapter 23 - *Myristica fragrans*: A Review. In: KUETE, V. (Ed.). **Medicinal Spices and Vegetables from Africa**: Academic Press, 2017. p. 497-512.

KÜHN, U.; KUBITZKI, K. Myristicaceae. In: KUBITZKI, K. *et al.* **The Families and Genera of Vascular Plants Flowering plants. Dicotyledons (Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families)**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. v. 2, p.457-467.

KUMAR, A. *et al.* Chemical composition, bactericidal kinetics, mechanism of action, and anti-inflammatory activity of *Isodon melissoides* (Benth.) H. Hara essential oil. **Natural Product Research**, v. 35, n. 4, p. 690-695, 2021.

LEE, J. C. *et al.* In Focus: Spotted wing *Drosophila*, *Drosophila suzukii*, across perspectives. **Pest Management Science**, v. 67, n. 11, p. 1349-1351, 2011.

LEWINSOHN, E.; GIJZEN, M. Phytochemical diversity: The sounds of silent metabolism. **Plant Science**, v. 176, n. 2, p. 161-169, 2009.

- LIMA, R. K. *et al.* Composição química e toxicidade de óleos essenciais para o pulgão-verde *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852). **Arq. Inst. Biol.** v. 81, n.1, p. 22-29, 2014.
- LOPEZ, V. *et al.* Efficacy of *Origanum syriacum* Essential Oil against the Mosquito Vector *Culex quinquefasciatus* and the Gastrointestinal Parasite *Anisakis simplex*, with Insights on Acetylcholinesterase Inhibition. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 15, 2019.
- LORENZI, H. Anacardiaceae. In: \_\_\_\_\_. **Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. v. 1. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000. Cap. 1, p. 1-12.
- PARK, C. G. *et al.* Insecticidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of Lamiaceae plant essential oils and their major components against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 507-513, 2016.
- PAVLIC, B. *et al.* Antioxidant and enzyme-inhibitory activity of peppermint extracts and essential oils obtained by conventional and emerging extraction techniques. **Food Chemistry**, v. 338, 2021.
- PELL, S. K. *et al.* Anacardiaceae. In: KUBITZKI, K. **The Families and Genera of Vascular Plants: Flowering plants. Eudicots (Sapindales, Curcubitales, Myrtaceae)**. Berlin: Springer-Verlag, 2011. v. 10 p.8-50.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Palmas, v. 3, n. 4, p. 46-152, nov. 2012.
- PRAKASH, B. *et al.* Chapter 16 - Prospects of plant products in the management of insect pests of food grains: current status and future perspectives. In: SINHA, R. P. e HÄDER, D.-P. (Ed.). **Natural Bioactive Compounds**: Academic Press, 2021. p. 317-335.
- QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chemical Reviews**, v. 87, n. 5, p. 955-979, 1987.
- REMA, J.; KRISHNAMOORTHY, B. 22 - Nutmeg and mace. In: PETER, K. V. (Ed.). **Handbook of Herbs and Spices (Second Edition)**: Woodhead Publishing, 2012. p. 399-416.
- RENKEMA, J. M. *et al.* Plant essential oils and potassium metabisulfite as repellents for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Scientific Reports**, v. 6, p. 10, 2016.
- RESH, V. H.; CARDÉ, R. T. Chapter 133 - Insecta, Overview. In: RESH, V. H. e CARDÉ, R. T. (Ed.). **Encyclopedia of Insects (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2009. p. 501-502.
- ROANA, J. *et al.* Antifungal Activity of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil (TTO) and Its Synergy with Itraconazole or Ketoconazole against *Trichophyton rubrum*. **Molecules**, v. 26, n. 2, 2021.

ROCHA, L.; CANDIDO TIETBOHL, L. A. Chapter 85 - Staranise (*Illicium verum* Hook) Oils. In: PREEDY, V. R. (Ed.). **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. San Diego: Academic Press, 2016. p. 751-756.

SANGWAN, N. S. *et al.* Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 1, p. 3-21, 2001.

SANTOS, A. C. A. *et al.* Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n.2, p.154-159, 2010.

SARMA, Y. R. *et al.* Spices and Aromatics. In: VAN ALFEN, N. K. (Ed.). **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**. Oxford: Academic Press, 2014. p. 211-234.

SAUNDERS, R. M. K. Illiciaceae. **Flora Malesiana - Series 1, Spermatophyta**, v. 13, n. 1, p. 169-184, 1997.

SCUDDER, G. G. E. The importance of insects. In: FOOLLIT, R. G.; ADLER, P. H. **Insect Biodiversity: science and society**. 5. ed. Oxford: Ed. Wiley-Blackwell, 2009, cap. 2, p. 7-35.

SHARIF, M. *et al.* In vivo analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil from *Tanacetum balsamita* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, 2020.

SIMÕES, C. M. D. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 7. ed.. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SMITH, M. Nutmeg. In: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)**. Oxford: Academic Press, 2014. p. 630-631.

SNENE, A. *et al.* In vitro antimicrobial, antioxidant and antiviral activities of the essential oil and various extracts of wild (*Daucus virgatus* (Poir.) Maire) from Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 109-115, 2017.

SURUCIC, R. *et al.* Variations in Chemical Composition, Vasorelaxant and Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activities of Essential Oil from Aerial Parts of *Seseli pallasii* BESSER (Apiaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, n. 5, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TEIXEIRA, M. L. *et al.* Essential Oils from *Lippia origanoides* Kunth. and *Mentha spicata* L.: Chemical Composition, Insecticidal and Antioxidant Activities. **American Journal of Plant Sciences**. v. 5, 2014.

TEIXEIRA, M. L. **Óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) e *Lippia origanoides* Kunth.:** composição química, atividade antioxidante e potencial farmacológico. 2016. 191 p. Tese (Doutorado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY, G. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.161, n. 2, p. 105-121, 2009.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY, *et al.* An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.181, n. 1, p. 1-20, 2016.

TIWARI, P. *et al.* Plant secondary metabolism linked glycosyltransferases: An update on expanding knowledge and scopes. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 714-739, 2016.

WALSH, D. B. *et al.* *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): Invasive Pest of Ripening Soft Fruit Expanding its Geographic Range and Damage Potential. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 2, n.1, p.1-7, 2011.

WANG, G. W. *et al.* *Illicium verum*: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 1, p. 10-20, 2011.

WETZEL, W. C.; WHITEHEAD, S. R. The many dimensions of phytochemical diversity: linking theory to practice. **Ecology Letters**, v. 23, n. 1, p. 16-32, 2020.

WINK, M. Plant secondary metabolism: Diversity, function and its evolution. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 8, p. 1205-1216, 2008.

XIAO, S. S. *et al.* The anti-inflammatory potential of *Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl essential oil in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, Mar 2021.

ZENG, Y. Q. *et al.* Isolation of two triterpenoids and a biflavanone with anti-inflammatory activity from *Schinus molle* fruits. **Planta Medica**, v. 69, n. 10, p. 893-898, Oct 2003.

ZHANG, C. *et al.* Antioxidant, hepatoprotective and antifungal activities of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Food Chemistry**, v. 346, 2021.

ZHAO, X. G. *et al.* Chemical Composition, Antibacterial, Anti-Inflammatory, and Enzyme Inhibitory Activities of Essential Oil from *Rhynchanthus beesianus* Rhizome. **Molecules**, v. 26, n. 1, 2021.

ZIYAT, H. *et al.* In Vitro Evaluation of the Antifungal Activity of Ghassoul-Based Formulations with Oregano and Thyme Essential Oils against *Penicillium sp.* **Journal of Chemistry**, v. 2021, 2021.



## SEGUNDA PARTE – ARTIGO

**Título: Óleos essenciais de *Illicium verum*, *Myristica fragrans* e *Schinus molle* impactam a sobrevivência, atividade da acetilcolinesterase e morfologia interna de *Drosophila suzukii*.**

### RESUMO

*Drosophila suzukii* é um inseto-praga emergente capaz de causar severos danos econômicos. O controle dessa espécie é feito normalmente com inseticidas sintéticos. Recentemente, a busca por formas alternativas de controle tem sido encorajada, principalmente por métodos ambientalmente corretos e sustentáveis. Os objetivos deste trabalho foram determinar a composição química e o rendimento de extração dos óleos essenciais de *Illicium verum*, *Myristica fragrans* e *Schinus molle*; avaliar a inibição da acetilcolinesterase; determinar a toxicidade desses óleos sobre *D. suzukii*; e por fim, avaliar os efeitos subletais do óleo de *I. verum* sobre a morfologia de fêmeas desse inseto. Obtiveram-se rendimentos de 2,49% para *I. verum*, 5,14% para *M. fragrans* e 1,08% para *S. molle*. Os compostos majoritários foram (*E*)-anetol (99,61%) no óleo de *I. verum*; para *M. fragrans*, foram sabineno (27,39%), limoneno (25,51%),  $\beta$ -pineno (17,95%) e  $\alpha$ -pineno (17,77%); e para *S. molle*, foram limoneno (25,55%), biciclogermacreno (22,93%), sabineno (19,66%) e *trans*- $\beta$ -cariofileno (12,74%). Os valores de Concentração de Inibição para 50% (CI<sub>50</sub>) da acetilcolinesterase foram de 0,117; 0,057 e 0,047  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e os valores para Concentração Letal para 50% dos indivíduos (CL<sub>50</sub>) sobre *D. suzukii* foram de 1,9; 26,5 e 58,7  $\mu\text{L mL}^{-1}$  para *I. verum*, *M. fragrans* e *S. molle*, respectivamente. As análises histológicas e histoquímicas revelaram alterações nos teores de carboidratos, espessura das fibras musculares, área de gotas lipídicas do corpo gorduroso e espessura epitelial do intestino médio de insetos expostos ao óleo de *I. verum*. Nesse sentido, pode-se concluir que esses óleos essenciais são fontes de compostos bioativos com ação inseticida promissora sobre *D. suzukii*, especialmente o de *I. verum*.

**Palavras-chave:** Inibição da acetilcolinesterase. Toxicologia. Alterações morfológicas

### 1 INTRODUÇÃO

*Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) é uma espécie de mosca que apresenta grande potencial para causar danos econômicos. Esses insetos podem infestar uma grande variedade de hospedeiros, como frutas vermelhas e espécies selvagens, além de frutos apodrecidos ao solo (LEE *et al.*, 2011). É uma espécie nativa do leste asiático e foi relatada no Brasil pela primeira vez no verão de 2012/2013 na Região Sul do país (DEPRA *et al.*, 2014). Os machos se diferem das fêmeas pela presença de uma mancha escura próxima à borda de cada asa, característica que origina o nome popular de mosca-da-asa-manchada (WALSH *et*

*al.*, 2011). As fêmeas apresentam aparelho ovipositor serrilhado que lhes permitem infestar frutos imaturos e não danificados antes da colheita, característica única entre os integrantes do gênero *Drosophila* (KARAGEORGI *et al.*, 2017). A principal alternativa empregada para minimizar os danos econômicos gerados por esse inseto-praga é a utilização de inseticidas sintéticos (VAN TIMMEREN; ISAACS, 2013).

Recentemente, a atenção tem sido concentrada na busca por métodos de controle alternativos que sejam ambientalmente corretos, sustentáveis e eficazes (CLOONAN *et al.*, 2018). Nesse sentido, produtos de origem vegetal ganharam destaque em pesquisas, principalmente óleos essenciais em razão da disponibilidade de matéria-prima e boa relação custo-benefício (CAMPOLO *et al.*, 2018). A atividade inseticida de óleos essenciais pode ser provocada por ação neurotóxica, atuando sobre a enzima acetilcolinesterase, receptores ionotrópicos GABA e, de forma mais evidente, nos receptores metabotrópicos da octopamina (JANKOWSKA *et al.*, 2018). Além disso, estudos recentes têm reportado diversas alterações morfológicas em insetos expostos a óleos essenciais de diferentes plantas. Tais alterações podem ajudar a elucidar mecanismos envolvidos na ação inseticida dos óleos essenciais (ALVES *et al.*, 2018; CHAABAN *et al.*, 2019; DUTRA *et al.*, 2019; FRANCA *et al.*, 2021).

A composição química dos óleos essenciais varia entre famílias e gêneros distintos de plantas (RAJENDRAN; SRIRANJINI, 2008). *Illicium verum* pertence à família Schisandraceae, nativa das regiões tropicais e subtropicais da Ásia, é popularmente chamado de anis-estrelado em virtude da forma de seu fruto, que é utilizado como especiaria (HUANG *et al.*, 2010). *Myristica fragrans* pertence à família Myristicaceae, sua semente ovoide é utilizada como condimento e é popularmente conhecida como noz-moscada (GUPTA *et al.*, 2013). *Schinus molle* pertence à família Anacardiaceae, nativa das regiões subtropicais da América do Sul, sendo comumente chamada de pimenta-rosa (MARTINS *et al.*, 2014). A atividade inseticida do óleo essencial dessas espécies vegetais já foi reportada para alguns insetos-praga (LOPEZ *et al.*, 2014; VORIS *et al.*, 2018; MATOS *et al.*, 2020). Entretanto, o efeito dos óleos essenciais dessas plantas ainda não foi avaliado em *D. sukii*. Além disso, os efeitos de concentrações subletais desses óleos sobre a morfologia interna dessas moscas ainda não foram explorados.

O presente estudo tem com objetivo determinar o rendimento da extração e a caracterização química dos óleos essenciais de *I. verum*, *M. fragrans* e *S. molle*, bem como avaliar a toxicidade desses óleos sobre adultos de *D. sukii* e a atividade inibitória da

acetilcolinesterase. Por fim, avaliar os efeitos de concentrações subletais do óleo de *I. verum* sobre a morfologia interna de moscas fêmeas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

As folhas da espécie *S. molle* foram coletadas no Câmpus da Universidade Federal de Lavras (UFLA) no mês de março de 2020, no período da manhã, em um dia com temperatura amena e ausência de precipitação. A cidade de Lavras está localizada no sul do estado de Minas Gerais, Brasil, latitude 21°14'S, longitude 45°00'O Gr. e altitude de 918 m. As sementes de *M. fragrans* e os frutos de *I. verum* foram obtidos no comércio de Lavras – MG/Brasil. Após a obtenção, os materiais vegetais referentes a cada espécie foram selecionados quanto ao grau de imperfeições, sujeira, corpos estranhos, e cortados em partes menores para posterior extração do óleo essencial.

### 2.2 Extração e rendimento dos óleos essenciais

A extração dos óleos essenciais (OEs) de cada espécie foi realizada no Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais do Departamento de Química (DQI) da UFLA, por meio do processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado. Para tal, 630 g de *I. verum*, 143 g de *M. fragrans* e 901 g de *S. molle*, divididas em triplicatas, foram adicionadas em um balão de fundo redondo com capacidade de 5 L, adicionando-se água até a metade do recipiente. Conectou-se o condensador e levou-se à fervura, mantendo ebulição branda durante 2 horas. Decorrido esse tempo, deixou-se o sistema em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos, abriu-se a torneira do aparelho e retirou-se o excesso de água lentamente até que a superfície da camada de óleo se aproximasse da abertura da torneira. O hidrolato foi coletado e submetido à centrifugação a 965 g por 15 minutos. Posteriormente, o óleo essencial foi pipetado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e acondicionado em recipiente adequado com proteção da luz e sob refrigeração (BRASIL, 2010). As extrações foram realizadas em triplicata. O rendimento das extrações foi calculado por diferença em Base Livre de Umidade (%p/p BLU). Para tal, o teor de umidade foi determinado utilizando a metodologia proposta por Pimentel *et al.* (2006). Em um balão de fundo redondo com

capacidade de 250 mL, foram adicionados aproximadamente 5 g do material vegetal e 80 mL de ciclohexano. Pelo topo do coletor Dean-Stark, adicionou-se mais ciclohexano para permitir o retorno do solvente ao balão. O sistema foi submetido a aquecimento e, após 2 horas, realizou-se a leitura da quantidade de água extraída na escala volumétrica do coletor Dean-Stark.

### 2.3 Caracterização química dos óleos essenciais

A caracterização química dos OEs foi realizada na Central de Análises e Prospecção Química - CAPQ do DQI/UFLA. A identificação dos constituintes químicos foi realizada por Cromatografia em fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), utilizando-se um equipamento modelo QP 2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e sob as seguintes condições experimentais: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$ ) com fase ligada composta por filme de DB5 (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano); fase móvel He 5.0 (White Martins, Rio de Janeiro, Brasil) como gás de arraste; fluxo de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ ; temperatura do injetor: 220 °C; temperatura do detector: 240 °C; volume de injeção da amostra de 0,5  $\mu\text{L}$ , diluído em hexano (1%) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA); taxa de partição do volume injetado (*split*) de 1:100; rampa de temperatura iniciada a 60 °C, com um aumento para 240°C a uma taxa de 3 °C  $\text{min}^{-1}$ , seguida de aumento a 10 °C  $\text{min}^{-1}$  até atingir 300 °C, sendo a temperatura final mantida por 7 minutos. A pressão na coluna foi em torno de 71,0 kPa. Os parâmetros operacionais do espectrômetro de massas foram os seguintes: potencial de ionização de 70 eV; temperatura de fonte de íons de 200 °C; a análise de massas foi realizada em modo de varredura total, variando de 45 a 500 Da, com velocidade de varredura de 1000 Da  $\text{s}^{-1}$  e intervalo de varredura de 0,5 fragmentos  $\text{s}^{-1}$ . Os dados foram processados e obtidos utilizando-se o *software* Lab Solutions LC/GC Workstation 2.72. O índice de retenção dos compostos foi calculado em relação a uma série homóloga de n-alcanos (nC<sub>9</sub>-nC<sub>18</sub>), empregando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963). A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos índices de retenção calculados com aqueles descritos na literatura (ADAMS, 2017). Também foram realizadas comparações dos espectros de massa obtidos com aqueles existentes nas bibliotecas FFNSC 1.2, NIST107 e NIST21.

A análise quantitativa foi realizada por Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chama (CG-DIC), utilizando-se um equipamento modelo GC-2010 (Shimadzu

Corporation, Kyoto, Japão), com condições experimentais idênticas às utilizadas na análise qualitativa, com exceção da temperatura do detector, que foi de 300 °C. As porcentagens relativas de cada constituinte foram obtidas pelo método de normalização de áreas.

## 2.4 Inibição da enzima acetilcolinesterase

O método utilizado consiste no monitoramento da taxa de formação do composto cromóforo 5-tio-2-nitrobenzoato adaptado de Ellman *et al.* (1961). Esse composto é produzido a partir da reação do Reagente de Ellman (ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico ou sua forma ionizada) com a tiocolina. A tiocolina é obtida pela hidrólise da acetiltiocolina (substrato) catalisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (0,04 U mL<sup>-1</sup>; tipo VI-S) de *Electrophorus electricus*.

Em um tubo de ensaio, foram adicionados 2970 µL de tampão Tris-HCl pH 8,0 (50 mmol L<sup>-1</sup>), contendo NaCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>) e MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,02 mol L<sup>-1</sup>) e 254 µL da solução de AChE e essa mistura foi incubada a 37 °C por 15 minutos. Decorrido esse tempo, foram adicionados 25 µL do óleo essencial diluído em etanol em diferentes concentrações (100,00; 50,00; 10,00; 5,00; 1,00; 0,50; 0,25 µg mL<sup>-1</sup>); 100 µL da solução de reagente de Ellman e 80 µL da solução de substrato. A mistura foi novamente incubada a 37 °C por 15 minutos. Após incubação, a absorbância foi medida em espectrofotômetro UV a 412 nm.

Para o branco, foi utilizado 3,2 mL de tampão Tris-HCl. Para fins de comparação, o carvacrol foi utilizado como controle positivo nas mesmas concentrações utilizadas para os óleos essenciais. Para considerar a hidrólise espontânea da acetiltiocolina, foram realizados controles não enzimáticos para cada concentração de óleo testada, substituindo-se a enzima por tampão Tris-HCl. O controle negativo conteve todos os reagentes, exceto o óleo essencial, que foi substituído pelo solvente etanol. Os testes foram realizados em três repetições e a porcentagem de atividade enzimática foi calculada de acordo com a equação a seguir:

$$A(\%) = \left( \frac{A_T - A_C}{A_O} \right) \cdot 100$$

Em que: A(%) = a absorbância percentual; AT= absorbância do tratamento contendo o óleo essencial/controle positivo; AC= absorbância do controle não enzimático; e AO= absorbância do controle negativo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise *probit* utilizando-se o *software* SAS®. Os valores obtidos para CI<sub>50</sub> dos óleos essenciais e o padrão de carvacrol foram comparados entre si por análise de variância pelo teste *Scott-Knott* ao nível de 5% de probabilidade, usando-se o *software* Sisvar.

## 2.5 Insetos

Os insetos da espécie *D. suzukii* utilizados nos experimentos foram obtidos na criação mantida no Departamento de Entomologia (DEN) da UFLA. As moscas adultas foram acondicionadas em gaiolas plásticas e alimentadas com solução aquosa de mel. Como substrato para oviposição e alimento para as larvas, foi utilizada dieta artificial modificada por Andreazza *et al.* (2016). Em cada gaiola de adultos, foi adicionado um pote (50 mL) de dieta artificial para oviposição durante 48 horas; posteriormente, a dieta contendo ovos de *D. suzukii* foi recolhida e acondicionada em outra gaiola plástica até completar o desenvolvimento do inseto, obtendo-se indivíduos de idade conhecida para utilização nos experimentos.

## 2.6 Avaliação toxicológica dos óleos essenciais

O procedimento de exposição aos óleos essenciais foi baseado no protocolo IRAC (*Insecticide Resistance Action Committee*) nº 026 (IRAC, 2011), recomendado para bioensaios com adultos de *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), com pequenas modificações para uso com *D. suzukii*. Em um frasco de vidro de 200 mL foi colocado um rolete de algodão com dois cm de comprimento impregnado com 1,9 mL da solução de óleo essencial na concentração desejada; foram feitas quatro repetições para cada concentração. O topo de cada frasco foi selado com um tampão de espuma. Um total de 25 moscas adultas de três a quatro dias de idade foram coletadas aleatoriamente da gaiola de criação com o auxílio de um aspirador de mão, sendo liberadas imediatamente dentro do frasco de vidro. O experimento foi mantido em câmara BOD com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12:12 horas. Após 24 horas, a mortalidade foi avaliada visualmente. As moscas que não mostraram movimento mesmo após a estimulação com um pincel fino foram consideradas mortas.

As curvas dose-resposta foram construídas realizando-se pré-testes com cada óleo essencial nas concentrações de 0,0; 0,1; 1,0; 10,0 e 100,0 µL mL<sup>-1</sup> em solução aquosa de

DMSO a 2% v/v contendo sacarose a 20% m/v, espaçadas de forma logarítmica para determinar a faixa de concentração em que cada composto causa mortalidades entre 0 e 100% das moscas expostas. Após o refino, as curvas foram construídas com as seguintes concentrações: 0,0; 0,1; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 9,0; 10,0 e 100,0  $\mu\text{L mL}^{-1}$  para *I. verum*, 0,0; 0,1; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0; 50,0 e 100,0  $\mu\text{L mL}^{-1}$  para *M. fragrans*, 0,0; 0,1; 1,0; 10,0; 20,0; 30,0; 60,0; 90,0; 100,0; 120,0 e 150,0  $\mu\text{L mL}^{-1}$  para *S. molle*. Os dados obtidos foram submetidos à análise *probit* com intervalos de confiança a 95%, no *software* SAS®.

## 2.7 Análise Histopatológica

Para análise histopatológica, pupas de *D. suzukii* foram expostas às soluções do óleo essencial de *I. verum* ( $CL_{20}$  e  $CL_{50}$ ), determinadas no experimento de toxicologia, e controles (água e solução aquosa de DMSO a 2% v/v) por submersão durante 30 segundos. Posteriormente, foram secas com papel absorvente e armazenadas em recipiente vedado com tecido *voil*. Após emergência dos adultos, foram coletadas oito fêmeas adultas a cada tratamento. Em seguida, os insetos foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% por 72 horas e transferidos para solução de etanol a 70%. Os insetos foram desidratados com uma série gradativa de álcool etílico (70, 80, 90 e 95%), com duração de 30 minutos cada etapa. Posteriormente, o material foi embebido em historesina *Leica* por 24 horas a 4 °C e transferido para moldes plásticos para inclusão.

Após esses procedimentos, as amostras foram seccionadas em micrótomo (Lupectec MRP09) na espessura de 4  $\mu\text{m}$  e coradas com Hematoxilina e Eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Após a coloração, as lâminas foram secas e cobertas com Entellan® e lamínula. Posteriormente, o intestino médio, tecido muscular torácico e corpo gorduroso dos insetos foram avaliados em microscopia de luz convencional para a verificação de possíveis alterações histopatológicas.

### 2.7.1 Histoquímica

Para avaliar alterações em fatores como presença, frequência e distribuição de proteínas e polissacarídeos nas fêmeas dos grupos controle e tratamento com óleo essencial de *I. verum*, foram preparados cortes histológicos para as seguintes técnicas histoquímicas:

### **2.7.1.1 Técnica de Ácido Periódico-Schiff para detecção de polissacarídeos**

Lâminas contendo seis cortes para cada tratamento foram imersas por 30 minutos em ácido periódico 0,5%, lavadas com água destilada por 20 minutos e coradas com reagente de Schiff por 30 minutos no escuro. O material foi submerso em água por 30 minutos. Em seguida, o material foi seco à temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas foram montadas em Entellan® (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

### **2.7.1.2 Coloração com Azul de Bromofenol para detecção de proteínas**

Lâminas contendo seis cortes para cada tratamento foram coradas com azul de bromofenol durante duas horas à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas com ácido acético 0,5% por cinco minutos e enxaguados em água corrente por 15 minutos. Em seguida, os cortes histológicos foram rapidamente imersos em álcool butílico terciário, deixados para secar em temperatura ambiente e montados em Entellan® (PEARSE, 1985).

## **2.7.2 Análises morfométricas**

Para a análise morfométrica, os cortes histológicos foram fotografados utilizando um sistema de captura de imagens trinocular (Olympus Optical Ltd. Brasil, São Paulo, SP, Brasil) e câmera (SCOS Color para microscopia de luz).

Medições na musculatura do tórax, espessura do intestino e área de corpos gordurosos foram realizadas empregando-se o *software* Image J (NIH). Para as medições referentes aos músculos do tórax, foram selecionados cortes histológicos longitudinais nos quais era possível visualizar a junção da cabeça do inseto com o tórax. Nesses cortes foram realizadas dez medições por inseto, cinco insetos a cada tratamento, da espessura das fibras musculares dispostas na horizontal e do espaço entre cada fibra. Foram realizadas, ainda, três medições em cada inseto do diâmetro torácico horizontal. Para avaliação da espessura do intestino, foram realizadas dez medições por inseto, cinco insetos a cada tratamento, da porção identificada como intestino médio. E para determinação da área média de células adiposas (trofócitos) do corpo gorduroso, foram realizadas 50 medições por inseto, cinco insetos a cada tratamento, em cortes histológicos da porção abdominal. Os dados foram submetidos ao teste



de normalidade de Shapiro-Wilk. Em seguida, foram comparados por Análise de Variância (ANOVA), seguido de teste *post-hoc* de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ) por meio do *software* Graph Pad Prism (versão 7.00).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Rendimento e composição química dos óleos essenciais

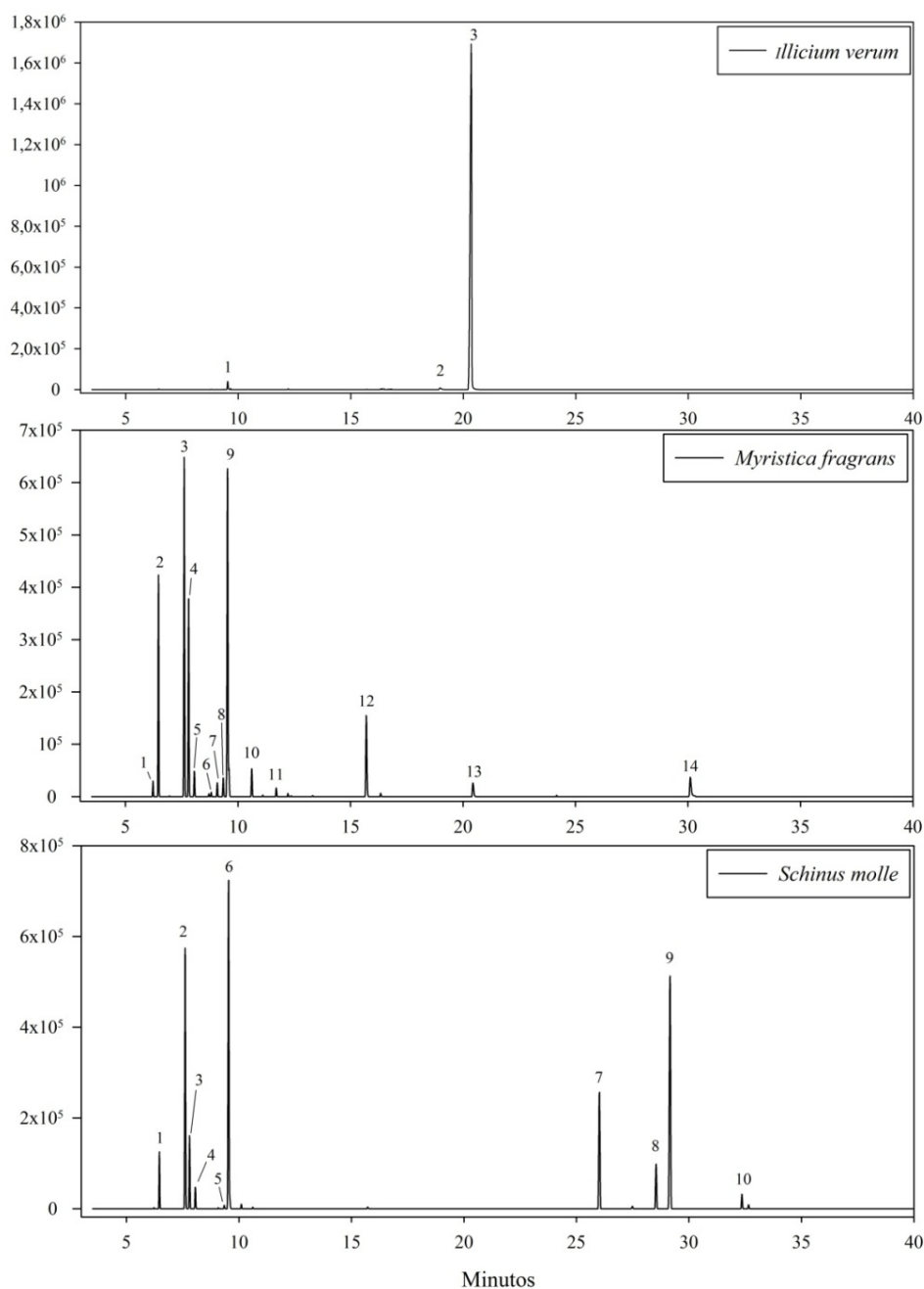
Os resultados obtidos para o teor de umidade do material vegetal e rendimento das extrações são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Teor de umidade e rendimento dos óleos essenciais de *Illicium verum*, *Myristica fragrans* e *Schinus molle*.

Plantas	Massa (g)	Umidade (%)	Rendimento (%)
<i>I. verum</i>	630	4,00	2,49 ± 0,15
<i>M. fragrans</i>	143	3,55	5,14 ± 0,11
<i>S. molle</i>	901	56,86	1,08 ± 0,13

Os cromatogramas obtidos para os óleos essenciais são apresentados na Figura 13. Para *I. verum*, foram observados poucos picos, sendo o último sinal próximo de 20 minutos de corrida o mais intenso. Para o óleo de *M. fragrans*, é observada uma grande concentração de picos ao redor de dez minutos, alguns de elevada intensidade, e alguns picos espaçados até 30 minutos, aproximadamente. Por fim, para o óleo de *S. molle*, são observadas duas regiões de concentração de sinais. A primeira ao redor de dez minutos apresenta alguns picos de elevada intensidade, já a outra região está concentrada ao redor de 30 minutos e apresenta um sinal intenso.

Figura 13 - Cromatogramas obtidos para os óleos essenciais.



Os dados obtidos pela caracterização química são apresentados na Tabela 2. Para o óleo de *I. verum*, foram encontrados três compostos, dos quais apenas um pode ser classificado como componente majoritário: o (*E*)-anetol, um fenilpropanoide, correspondendo a 99,61% da mistura. No óleo de *M. fragrans*, foram identificados 14 componentes, dos quais quatro são classificados como majoritários: sabineno (27,39%), limoneno (25,51%),  $\beta$ -pineno (17,95%) e  $\alpha$ -pineno (17,77%), todos esses terpenos são classificados como hidrocarbonetos monoterpênicos. Nesse óleo foram identificados ainda traços do composto miristicina (0,23%)

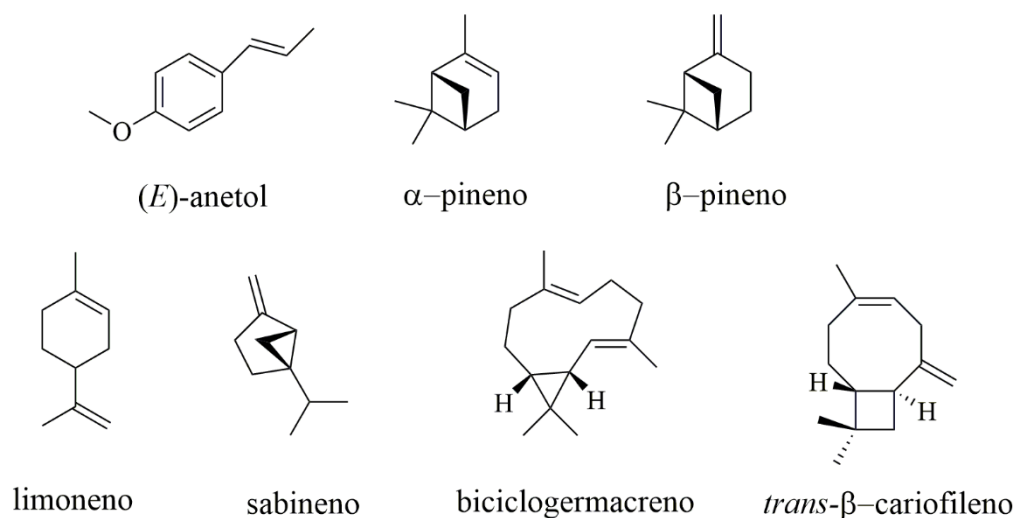
que influenciou a nomenclatura dessa espécie vegetal. Por fim, foram identificados dez constituintes no óleo essencial de *S. molle*, sendo os majoritários: limoneno (25,55%), biciclogermacreno (22,93%), sabineno (19,66%) e *trans*- $\beta$ -cariofileno (12,74%). Como dito anteriormente, limoneno e sabineno são hidrocarbonetos monoterpênicos, ao passo que biciclogermacreno e *trans*- $\beta$ -cariofileno são hidrocarbonetos sesquiterpênicos. As estruturas químicas dos componentes majoritários são apresentadas na Figura 14.

Tabela 2 - Composição dos óleos essenciais de *Illicium verum*, *Myristica fragrans* e *Schinus molle*.

Tempo de retenção (min.)	IR <sub>exp.</sub>	IR <sub>tab.</sub>	Constituintes	% dos constituintes		
				<i>I. verum</i>	<i>M. fragrans</i>	<i>S. molle</i>
6.223	925	924	$\alpha$ -tujeno	-	1,1643	-
6.466	933	932	<b><math>\alpha</math>-pineno</b>	-	<b>17,7680</b>	4,3952
7.610	972	969	<b>sabineno</b>	-	<b>27,3934</b>	<b>19,6582</b>
7.806	979	974	<b><math>\beta</math>-pineno</b>	-	<b>17,9465</b>	6,2356
8.061	987	988	mirceno	-	0,6125	0,5254
8.815	1010	1002	$\alpha$ -felandreno	-	0,5412	-
9.079	1017	1014	$\alpha$ -terpineno	-	1,1332	-
9.346	1024	1020	<i>p</i> -cimeno	-	0,6469	0,0874
9.533	1029	1024	<b>limoneno</b>	0,3584	<b>25,5075</b>	<b>25,5490</b>
10.612	1057	1054	$\gamma$ -terpineno	-	1,0276	-
11.702	1085	1086	terpinoleno	-	0,0923	-
15.702	1180	1174	terpinen-4-ol	-	5,8111	-
18.964	1255	1247	<i>p</i> -anisaldeído	0,0357	-	-
20.358	1287	1282	<b>(<i>E</i>)-anetol</b>	<b>99,6058</b>	-	-
20.444	1289	1285	safrol	-	0,1246	-
26.022	1419	1417	<b><i>trans</i>-<math>\beta</math>-cariofileno</b>	-	-	<b>12,7395</b>
28.539	1480	1484	germacreno D	-	-	5,0319
29.159	1495	1500	<b>biciclogermacreno</b>	-	-	<b>22,9330</b>
30.102	1519	1517	miristicina	-	0,2309	-
32.354	1576	1577	espatulenol	-	-	2,8448
Total identificado				99,9999	100	100
<b>Hidrocarbonetos moterpênicos</b>				0,3584	93,8334	56,4508
<b>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</b>				-	-	40,7044
<b>Monoterpenos oxigenados</b>				-	5,8111	-
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>				-	-	2,8448
<b>Fenilpropanoides</b>				99,6415	0,3555	-

Em que: IR<sub>exp.</sub> é o índice de retenção experimental; e IR<sub>tab.</sub> é o índice tabelado na literatura. Em negrito estão os componentes considerados majoritários.

Figura 14 - Estrutura química dos componentes majoritários dos óleos essenciais.



### 3.2 Inibição da enzima acetilcolinesterase

As curvas obtidas para o desempenho de inibição da enzima acetilcolinesterase pelos óleos essenciais e o padrão de carvacrol são apresentadas na Figura 15. É possível observar que o óleo essencial de *S. molle* promove considerável inibição enzimática em menores concentrações, quando comparado aos demais óleos em estudo. Com o aumento da concentração desse óleo a atividade inibitória se mantém constante, ao passo que para os óleos de *M. fragrans* e *I. verum*, ainda há aumento do índice de inibição, sendo o desempenho de *I. verum* menos pronunciado do que *M. fragrans*. Os valores para Concentração de Inibição de 50% da atividade enzimática ( $CI_{50}$ ) são reportados na Tabela 3. Não há diferença estatística entre os valores de  $CI_{50}$  para o carvacrol (controle) e os óleos de *M. fragrans* e *S. molle*, 0,029; 0,057 e 0,047 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. O óleo de *I. verum* apresentou valor superior, 0,117 mg mL<sup>-1</sup>, diferindo-se estatisticamente dos demais.

### 3.3 Toxicidade dos óleos essenciais sobre *Drosophila suzukii*

Os resultados obtidos para a avaliação da toxicidade do óleo essencial das três espécies vegetais sobre *D. suzukii* são apresentadas na Tabela 4. Os valores para  $CL_{50}$  foram de 1,9  $\mu$ L mL<sup>-1</sup> para o óleo essencial de *I. verum*, de 26,5  $\mu$ L mL<sup>-1</sup> para *M. fragrans* e de 58,7  $\mu$ L mL<sup>-1</sup> para *S. molle*. É possível observar que o desempenho do óleo essencial de *I. verum*

foi consideravelmente superior aos demais, apresentado  $CL_{50}$  13,95 vezes menor que a obtida para o óleo de *M. fragrans* e 30,89 vezes menor do que o de *S. molle*.

Figura 15 - Curvas de inibição da enzima acetilcolinesterase.

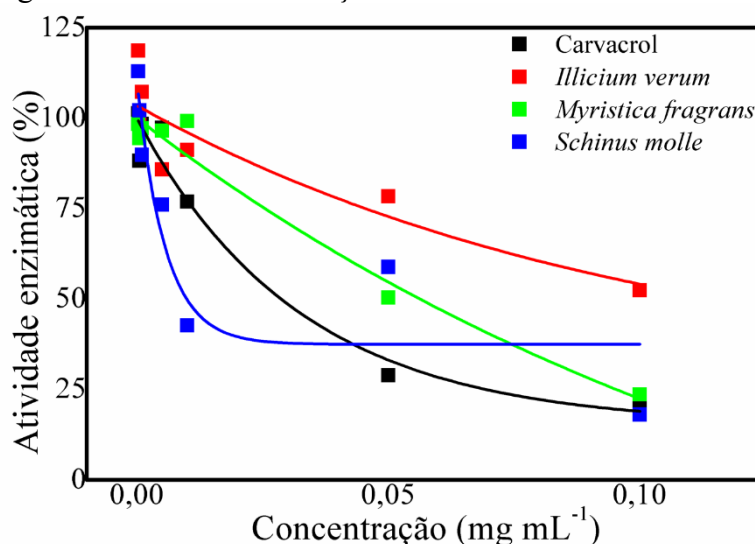


Tabela 3 - Valores estimados de  $CI_{50}$  para a inibição de acetilcolinesterase.

Amostras	$CI_{50}$ (mg mL <sup>-1</sup> )
Carvacrol	0,029 ± 0,004 <sup>a</sup>
<i>I. verum</i>	0,117 ± 0,002 <sup>b</sup>
<i>M. fragrans</i>	0,057 ± 0,004 <sup>a</sup>
<i>S. molle</i>	0,047 ± 0,002 <sup>a</sup>

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

### 3.4 Histopatologia

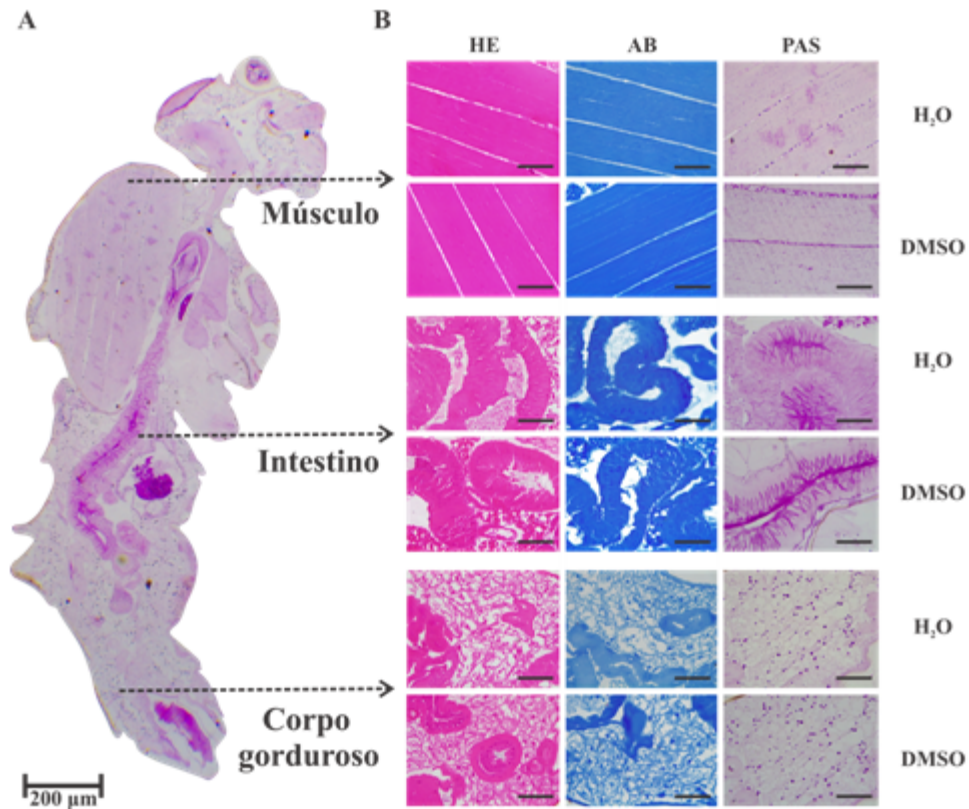
Na Figura 16a, é apresentado um corte longitudinal do corpo de *D. sukukii* exposto ao controle água corado pela técnica de PAS, ao passo que na Figura 16b são apresentadas imagens representativas dos músculos torácicos, intestino médio e corpo gorduroso de insetos expostos aos controles água e DMSO, nas colorações de hematoxilina e eosina, azul de bromofenol e PAS. Na Figura 17, são apresentadas imagens representativas dos músculos torácicos, intestino médio e corpo gorduroso de insetos expostos aos tratamentos  $CL_{20}$  e  $CL_{50}$  do óleo de *I. verum*, nas colorações de hematoxilina e eosina, azul de bromofenol e PAS.

Tabela 4 - Desempenho toxicológico dos óleos essenciais sobre *Drosophila sukuzii*.

Óleo essencial	Número de insetos	CL <sub>20</sub> (95% IF)	CL <sub>50</sub> (95% IF) ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )	CL <sub>95</sub> (95% IF)	$X^2$	<i>P</i>	RT CL <sub>50</sub> (95% LC) ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )
<i>I.verum</i>	600	0,8 (0,6-1,0)	1,9 (1,6-2,2)	9,2 (7,3-12,4)	0,3569	0,9859	*
<i>M.fragrans</i>	500	16,9 (15,1-18,6)	26,5 (24,6-28,6)	63,4 (54,5-78,1)	2,5922	0,4589	13,9 (12,9-15,0)
<i>S.molle</i>	500	19,3 (13,3-25,1)	58,7 (49,3-68,8)	518,5 (360,5-882,4)	0,8475	0,8381	30,9 (25,9-36,2)

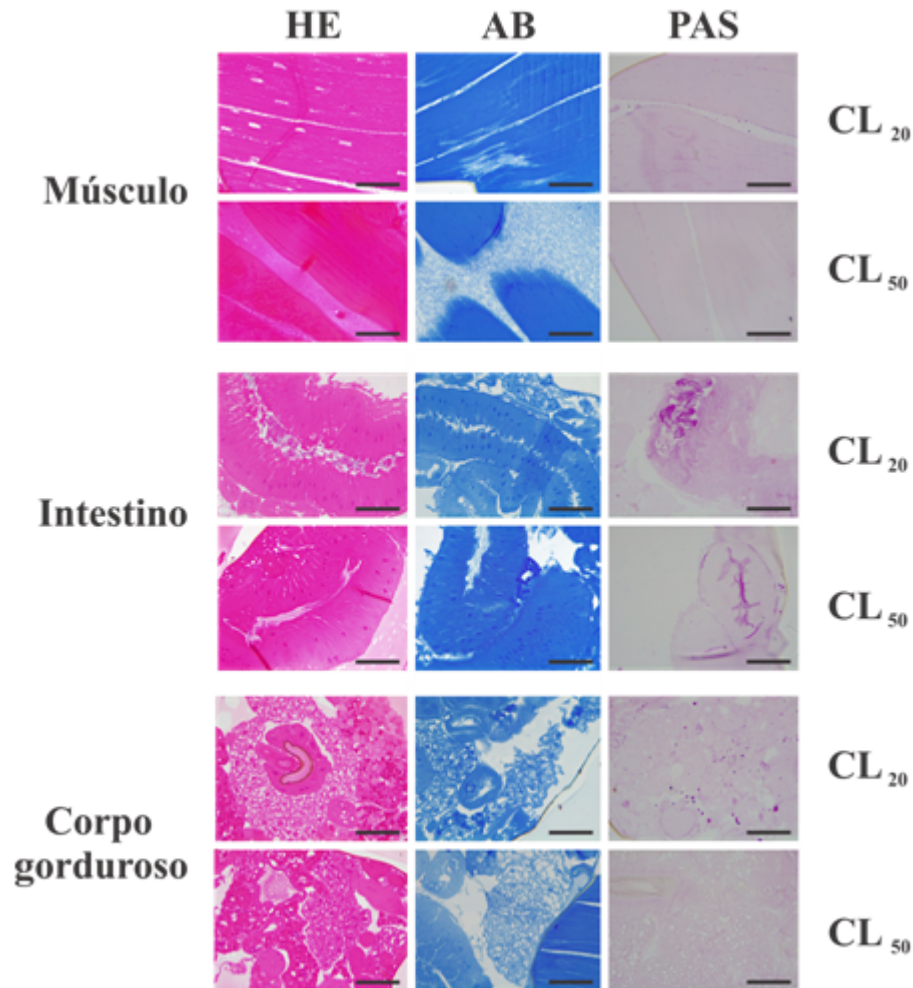
Em que: CL<sub>20</sub> é a concentração letal para 20% dos indivíduos, CL<sub>50</sub> é a concentração letal para 50% dos indivíduos e CL<sub>95</sub> é a concentração letal para 95% dos indivíduos; (95% IF) representa o intervalo fiducial a 95%;  $X^2$  é o *qui*-quadrado para falta de ajuste ao modelo *probit*; *P* é a probabilidade associada à estatística *qui*-quadrado; RT CL<sub>50</sub> (95% LC) é a razão de toxicidade baseada na CL<sub>50</sub>, determinada pela razão entre a CL<sub>50</sub> do óleo sobre a CL<sub>50</sub> de menor valor, com limite de confiança de 95%; \* óleo usado como referência para cálculo da RT CL<sub>50</sub>.

Figura 16 - Cortes histológicos de *Drosophila suzukii* pertencentes aos grupos controles água e DMSO.



Legenda: A – Corte longitudinal de fêmea de *Drosophila suzukii* corada com Ácido Periódico-Schiff (PAS) pertencente ao grupo controle água. Barra de escala: 200 µm. B – Cortes histológicos de músculo, intestino médio e corpo gorduroso de fêmeas de *D. suzukii* coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), Azul de bromofenol (AB) e PAS pertencentes aos grupos controle água e DMSO. Barra de escala: 50 µm.

Figura 17 - Cortes histológicos de *Drosophila suzukii* pertencentes aos tratamentos CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub>.



Legenda: Cortes histológicos de músculo, intestino médio e corpo gorduroso de fêmeas de *Drosophila suzukii* coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), Azul de bromofenol (AB) e Ácido Periódico-Schiff (PAS) pertencentes aos tratamentos CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub>. Barra de escala: 50 μm.

### 3.4.1 Grupos controle I e II

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos controle I (água) e grupo controle II (DMSO a 2% v/v em água). Nesse sentido, uma descrição das principais características morfológicas do corpo gorduroso, fibras musculares torácicas e intestino médio dos insetos de ambos os grupos serão descritas conjuntamente.



## Intestino médio

A porção abdominal do intestino médio é evidenciada como um tubo que se prolonga até aproximadamente a metade do abdômen. Esse tubo é visualizado tanto transversalmente quanto longitudinalmente, a depender da posição do corte histológico. Em seguida, é evidenciado o intestino posterior (*hindgut*), caracterizado por ser menos espesso que o intestino médio. O intestino médio apresenta células colunares com núcleos posicionados em alturas aproximadamente iguais. Todavia, todas as células parecem estar aderidas à membrana basal. O núcleo das células é pouco evidente, não sendo observado o nucleolo. A espessura do epitélio do intestino médio é praticamente constante. A parte apical do epitélio apresenta pequenos espaçamentos entre as células, que se prolongam até a metade do epitélio. Por meio da coloração com azul de bromofenol, é possível observar que as proteínas parecem estar uniformemente distribuídas no intestino, sendo evidenciadas por uma coloração azul de média intensidade. A técnica de PAS corou fortemente o conteúdo intestinal, bem como a parte apical das células epiteliais. Além disso, são observadas finas regiões retilíneas extracelulares reativas ao PAS. Essas regiões são uniformemente distribuídas no intestino médio e conectam a parte apical ao polo basal das células.

## Corpo gorduroso

O corpo gorduroso representa cerca de 20 a 30% da constituição do abdômen desses insetos. Esse tecido está presente principalmente nas extremidades do abdômen, particularmente na porção final desse compartimento. O corpo gorduroso é caracterizado pela presença de células adiposas evidenciadas por regiões não coradas por hemotaxilina e eosina (HE). As gotículas apresentam formato variando de circular a oval, com pequenas variações de área. As gotículas estão envoltas por matriz eosinofílica e que também se apresenta homogeneamente corada pelo azul de bromofenol. Para a técnica de PAS, são observados pontos fortemente reativos uniformemente distribuídos pelo corpo gorduroso. Os pontos corados por PAS são cerca de vinte vezes menores que as gotículas lipídicas e também estão presentes em menor quantidade em relação às gotículas não coradas.

## Fibras musculares torácicas

Nos cortes onde é possível visualizar a junção entre a cabeça e o tórax do inseto, as fibras musculares estão presentes na porção acima do esôfago. Em média, seis fibras musculares dispostas longitudinalmente são observadas nessa região. As fibras são conectadas de uma extremidade à outra do exoesqueleto. São verificadas variações na espessura entre as fibras, mas em uma mesma fibra, a espessura é constante. Além disso, são verificados pequenos espaçamentos entre as fibras caracterizados por regiões retilíneas não reativas à hematoxilina e eosina. Em cada fibra muscular, são observadas, em média, cinco a oito miofibrilas dispostas retilineamente. Para os cortes onde não se é possível verificar a junção entre a cabeça e o tórax, as fibras normalmente ocupam toda a região torácica e estão dispostas em direções variadas. Além disso, muitas fibras nessas regiões estão aderidas a uma extremidade do tórax e se estendem até o centro desse compartimento, onde é verificado um pequeno espaçamento que conecta uma fibra a outra. Para a coloração de azul de bromofenol, proteínas são evidenciadas por uma coloração azul intensa, disposta homoganeamente no tecido. Na técnica de PAS, o tecido é fracamente e homoganeamente corado. Além disso, são observados pontos fortemente reativos (glicogênio) distribuídos de forma espaçada na extremidade das fibras musculares.

### 3.4.2 Tratamento I

#### Intestino médio

O intestino médio desses indivíduos apresenta um maior espaçamento entre as células. O lúmen intestinal mostra-se fortemente corado com PAS. Todavia, as células epiteliais aparecem fracamente coradas em seus polos apicais, sendo não reativas em seu interior. Não são observadas alterações pela coloração de azul de bromofenol.

#### Corpo gorduroso

O corpo gorduroso de todos os insetos desse grupo apresentou trofócitos de tamanho aparentemente menor quando comparado aos controles. Além disso, esse tecido está presente em menor proporção no abdômen, ocupando cerca de 20% desse compartimento. Através da

coloração com azul de bromofenol, é possível observar que a matriz que envolve as gotículas lipídicas apresenta coloração não homogênea. Três dos cinco insetos apresentam cerca de 10% dessas regiões muito fracamente coradas em azul. Em relação à técnica de PAS, 60% dos insetos apresentam o corpo gorduroso não reativo. Os pontos corados em rosa são visíveis apenas em 40% dos animais, sendo presente em menor quantidade, representando cerca de 50% do total observado nos controles.

#### Fibras musculares torácicas

As fibras musculares dos indivíduos desse grupo apresentaram alterações morfológicas consideráveis. Houve variações na espessura em uma mesma fibra. Além disso, o espaçamento entre as fibras é aparentemente maior. As miofibrilas também apresentam espaçamento mais evidente em 40% dos animais. Cerca de 10% dessas miofibrilas apresentam aspecto rompido. Uma coloração não homogênea é observada com o azul de bromofenol. Os grânulos de glicogênio foram reduzidos drasticamente nos animais desse grupo.

### **3.4.3 Tratamento II**

#### Intestino médio

O intestino médio dos insetos desse grupo está severamente afetado. O epitélio apresenta-se aparentemente mais espesso. Além disso, é possível observar hiperplasia das células da parede do intestino. As células parecem estar mais alongadas e com maior espaçamento entre si. Pela técnica de PAS, é possível observar que o conteúdo intestinal se apresenta fortemente corado. Entretanto, a parte apical das células apresenta-se muito fracamente corada em roxo. As linhas retilíneas coradas em roxo são raramente observadas. Quando presentes, mostram-se menos espessas. Não são observadas alterações no conteúdo proteico intestinal pela coloração com azul de bromofenol.

### Corpo gorduroso

O corpo gorduroso dos indivíduos desse tratamento apresenta gotículas lipídicas aparentemente menores quando comparadas às do tratamento I. Além disso, o espaço ocupado por esse tecido é ainda menor, sendo presente em cerca de 10% do abdômen dos insetos desse grupo. Intensas variações no conteúdo proteico são evidenciadas nas regiões que recobrem as gotículas lipídicas. Todos os animais apresentam o corpo gorduroso não reativo à técnica de PAS. Por fim, grandes espaçamentos entre órgãos, tais como intestino e ovário, são observados em regiões que, nos grupos controle, são preenchidos pelo corpo gorduroso. Tais regiões não apresentam reatividade a nenhum dos corantes utilizados.

### Fibras musculares torácicas

Drásticas alterações morfológicas são observadas nas fibras musculares nesse tratamento. Intensas variações de espessura nas fibras, bem como um maior espaçamento entre elas, são observados. Cerca de metade das fibras parece não estar aderidas ao exoesqueleto, sendo observada uma matriz acelular eosinofílica nessa região. São também observadas rupturas nas fibras musculares, sendo evidenciadas regiões não coradas. A coloração de azul de bromofenol mostra-se menos intensa e não uniforme, quando comparada aos controles. Não são observadas reservas de glicogênio em nenhum animal desse tratamento.

#### **3.4.4 Análise morfométrica**

Os resultados da análise morfométrica são apresentados na Tabela 5. Na análise da espessura das fibras musculares torácicas, foi observado que não há diferença estatística significativa entre os controles; porém, há diferença significativa dos controles para os tratamentos. Entretanto, não há diferença significativa entre os tratamentos. Ou seja, ocorre uma diminuição significativa da espessura das fibras musculares dos controles para os tratamentos. A análise estatística da distância entre as fibras musculares mostra que não há diferença entre os controles, mas há diferença deles para os tratamentos. E neste experimento há diferença significativa entre os resultados obtidos para a CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub>. Ou seja, há um aumento significativo da distância entre as fibras musculares dos controles para a CL<sub>20</sub>, e

dessa para a CL<sub>50</sub>. Para a análise do diâmetro horizontal do tórax, não há diferença significativa entre controles e tratamentos. Na análise da espessura do intestino médio, é observado que não há diferença estatística entre os controles, mas há diferença destes para os tratamentos, e não há diferença entre os tratamentos. Isso quer dizer que há um espessamento do intestino médio nos tratamentos, quando comparados aos controles. Por fim, a análise estatística das medições de área de gotículas lipídicas do corpo gorduroso mostra que não há diferença significativa entre os controles e há diferença desses para os tratamentos e há, ainda, diferença entre os tratamentos. Isso mostra que há diminuição na área das gotículas lipídicas dos controles para a CL<sub>20</sub>, e dessa para a CL<sub>50</sub>.

Tabela 5 - Dados obtidos nas análises morfométricas.

Estruturas	Grupo controle I (água)	Grupo controle II (DMSO 2% v/v)	Tratamento I (CL <sub>20</sub> = 1 µL mL <sup>-1</sup> )	Tratamento II (CL <sub>50</sub> = 2 µL mL <sup>-1</sup> )
<b>Espessura de fibras musculares do tórax (µm)</b>	57,96 ± 8,00 <sup>a</sup>	57,70 ± 5,65 <sup>a</sup>	43,08 ± 2,16 <sup>b</sup>	42,14 ± 0,94 <sup>b</sup>
<b>Distância entre fibras musculares do tórax (µm)</b>	3,53 ± 0,38 <sup>a</sup>	3,54 ± 0,27 <sup>a</sup>	5,15 ± 0,13 <sup>b</sup>	6,51 ± 0,12 <sup>c</sup>
<b>Diâmetro torácico horizontal (µm)</b>	733,09 ± 86,09 <sup>a</sup>	760,80 ± 33,74 <sup>a</sup>	737,92 ± 47,54 <sup>a</sup>	718,18 ± 103,31 <sup>a</sup>
<b>Espessura do intestino médio (µm)</b>	37,03 ± 2,06 <sup>a</sup>	37,05 ± 2,44 <sup>a</sup>	43,34 ± 1,03 <sup>b</sup>	47,16 ± 0,88 <sup>b</sup>
<b>Área de gotículas lipídicas do corpo gorduroso (µm<sup>2</sup>)</b>	43,90 ± 6,83 <sup>a</sup>	42,54 ± 8,21 <sup>a</sup>	23,25 ± 3,61 <sup>b</sup>	16,15 ± 1,54 <sup>c</sup>

Os dados apresentados mostraram normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados seguidos de letras iguais não diferem entre si por Análise de Variância (ANOVA), seguido de teste *post-hoc* de Tukey ( $p > 0,05$ ).

## 4 DISCUSSÃO

A caracterização química dos óleos essenciais das três espécies de plantas estudadas no presente trabalho apresentou uma composição bastante diversificada. Tal diversidade química de constituintes pode promover atividade inseticida por variados mecanismos de ação (BLENAU *et al.*, 2012; IKBAL; PAVELA, 2019; ISMAN, 2019). De fato, observa-se que os óleos das três espécies de plantas apresentaram desempenho toxicológico satisfatório sobre *D. sukuzii*, em especial o de *I. verum*, e foram capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase, sendo o óleo de *S. molle* o mais eficaz. Por fim, o óleo de *I. verum* promoveu importantes alterações morfológicas em fêmeas de *D. sukuzii*, causando danos no intestino médio, musculatura torácica e corpo gorduroso.

Os óleos essenciais foram obtidos com bons rendimentos. Para *I. verum*, o rendimento da extração foi de 2,49%; na literatura são relatados valores de 3,1% (VORIS *et al.*, 2018) e 6,1% (LI *et al.*, 2020). Já para *M. fragrans*, o rendimento observado foi de 5,14% e os relatados na literatura são de 2,4% (DU *et al.*, 2014) e 6,6% (VORIS *et al.*, 2018). Por fim, o rendimento obtido para a extração do óleo das folhas de *S. molle* foi de 1,14%; na literatura são relatados valores de 1,2% (DO PRADO *et al.*, 2019) e 1,0-1,6% (GOMES *et al.*, 2013). Quanto aos constituintes majoritários, para *I. verum*, o fenilpropanoide (*E*)-anetol foi o componente nessa extração, correspondendo a 99,61% do óleo. Em outras publicações, esse composto também é o majoritário em diferentes proporções: 88,85% (MATOS *et al.*, 2020), 89,50% (HUANG *et al.*, 2010) e 91,32% (LI *et al.*, 2020). Para *M. fragrans*, os majoritários foram sabineno (27,39%), limoneno (25,51%),  $\beta$ -pineno (17,95%) e  $\alpha$ -pineno (17,77%). Kapoor *et al.* (2013) identificaram como majoritários sabineno (29,4%),  $\beta$ -pineno (10,6%),  $\alpha$ -pineno (10,2%) e terpinen-4-ol (9,6%). Du *et al.* (2014) identificaram eugenol (19,9%), metiliseugenol (16,8%), metileugenol (16,7%) e sabineno (11,8%). Para *S. molle*, os majoritários foram limoneno (25,55%), biciclogermacreno (22,93%), sabineno (19,66%) e *trans*- $\beta$ -cariofileno (12,74%). Do Prado *et al.* (2019) identificaram como majoritários  $\beta$ -pineno (25,33%), *epi*- $\alpha$ -cadinol (21,29%),  $\alpha$ -pineno (18,72%) e mirceno (11,54%). Gomes *et al.* (2013) identificaram  $\alpha$ -pineno (5,5-31,5%),  $\beta$ -pineno (4,6-20,0%) limoneno (0,3-31,0%) e biciclogermacreno (3,5-17,6%). As variações observadas tanto no rendimento, quanto na composição química dos óleos, quando comparados aos diferentes trabalhos publicado, podem ser justificados por diversos fatores, destacando-se as diferentes localizações geográficas, estações do ano, disponibilidade de nutrientes e água, ataque de patógenos e

herbívoros, poluição, radiação solar e fatores genéticos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; BLANK *et al.*, 2010).

O óleo essencial de *I. verum* apresentou o melhor desempenho toxicológico sobre *D. sukukii*, com  $CL_{50}$  de apenas  $1,9 \mu\text{L mL}^{-1}$ . Os óleos de *M. fragrans* e *S. molle* apresentaram desempenho inferior, quando comparados a *I. verum*. Os valores para  $CL_{50}$  foram, respectivamente, 26,5 e  $58,7 \mu\text{L mL}^{-1}$ . Todavia, os resultados toxicológicos são divergentes em relação aos de inibição da enzima acetilcolinesterase. Os valores de  $CI_{50}$  foram mais elevados para *I. verum*,  $0,117 \text{ mg mL}^{-1}$ , enquanto *M. fragrans* e *S. molle* apresentaram, respectivamente, os valores de 0,057 e  $0,047 \text{ mg mL}^{-1}$ . Voris *et al.*, (2018) relatam  $CI_{50}$  igual a 4,800 e  $4,510 \text{ mg mL}^{-1}$  para o óleos de *I. verum* e *M. fragrans*, respectivamente, valor consideravelmente mais elevado do que os observados neste trabalho. Quanto à inibição pelo óleo essencial das folhas de *S. molle*, Aboalhajja *et al.*, (2019) observaram  $CI_{50}$  igual a  $0,161 \text{ mg mL}^{-1}$ , valor ligeiramente superior ao observado neste trabalho. Apesar de a inibição da enzima acetilcolinesterase ser um dos mecanismos envolvidos na atividade inseticida de óleos essenciais (BLENAU *et al.*, 2012), os resultados deste experimento sugerem que este não é o principal mecanismo envolvido em *D. sukukii*. O óleo de anis-estrelado apresentou concentração de inibição enzimática ( $CI_{50}$ ) duas vezes maior que os demais óleos; porém, seu desempenho inseticida ( $CL_{50}$ ) foi de aproximadamente 14 e 31 vezes superior a *M. fragrans* e *S. molle*, respectivamente.

O óleo de *I. verum* é constituído basicamente por (*E*)-anetol (99,61%), permitindo inferir que a atividade inseticida do óleo dessa espécie vegetal ocorre pela ação desse fenilpropanoide, sendo pouco provável a ocorrência de sinergismo com os outros constituintes. O composto (*E*)-anetol é derivado do ácido *p*-cumárico, um composto fenólico, que sofre redução e tem um grupo metila substituindo o hidrogênio da hidroxila (DEWICK, 2009). A substituição da hidroxila por uma metoxila confere ao composto maior estabilidade diante da oxidação (SOLOMONS; FRYHLE, 2018). Vale ressaltar que os insetos foram expostos aos óleos essenciais pelas vias de contato direto, fumigação e, principalmente, ingestão, o que pode ter afetado significativamente o sistema digestório dos animais, além de ter provocado danos em outros tecidos.

Alterações na morfologia interna de insetos são normalmente avaliadas através de técnicas de microscopia de luz (CHAABAN *et al.*, 2019; ÁTICO BRAGA *et al.*, 2020; OFTADEH, 2020). De fato, o emprego da microscopia de luz possibilita a identificação de alterações cromossômicas, anormalidades nucleares, bem como alterações histopatológicas provenientes da exposição de indivíduos a compostos químicos (FONTANETTI *et al.*, 2010).



No presente estudo, por meio de técnicas histológicas e histoquímicas, verificaram-se alterações na espessura epitelial e na distribuição de carboidratos no intestino médio de *D. suzukii* expostos ao óleo essencial de *I. verum*. No corpo gorduroso, houve redução drástica da área de células adiposas, bem como de reservas de carboidratos, que foram completamente consumidas. No tórax, fibras musculares tornaram-se menos espessas e mais espaçadas entre si, além de ocorrer rupturas em alguns casos, e as reservas de glicogênio foram extintas. Recentemente, vários trabalhos têm relatado diversas alterações morfológicas em insetos causadas por óleos essenciais. Como exemplo, Hashem *et al.*, (2018) relataram que doses subletais do óleo essencial nanoemulsificado de *Pimpinella anisum*, teor de (*E*)-anetol igual a 81,2%, provocou alterações no tegumento e intestino médio de *Tribolium castaneum*. Através da análise dessas alterações provenientes da exposição a concentrações subletais do óleo de *I. verum*, pode-se inferir sobre o mecanismo de ação pelo qual o óleo atua.

Moscas do gênero *Drosophila* se alimentam de frutos fermentados por uma variedade de leveduras, principalmente por *Saccharomyces cerevisiae*, de onde as larvas irão obter as elevadas taxas de proteínas e carboidratos indispensáveis ao seu perfeito desenvolvimento biológico (BECHER *et al.*, 2012; BELLUTTI *et al.*, 2018). O metabolismo de carboidratos é fundamental para a manutenção do equilíbrio energético em animais, sendo que em insetos as principais fontes de energia são os açúcares trealose e o glicogênio (MATTILA; HIETAKANGAS, 2017; SHI *et al.*, 2017). A trealose é o carboidrato primário em insetos, desempenhando papel fundamental em diversos processos fisiológicos. Esse açúcar é sintetizado pela trealose-6-fosfato sintase (TPS) e trealose-6-fosfatase, sendo hidrolisado rapidamente pela trealase (TRE) em glicose para obtenção de energia (TANG *et al.*, 2018). Os resultados obtidos demonstram que o intestino dos insetos expostos ao óleo de anis foi severamente danificado, principalmente no tratamento com a CL<sub>50</sub>, conforme observado após realização da técnica de PAS. Como consequência, a absorção de carboidratos no intestino das moscas pode estar comprometida.

Alternativamente, os organismos utilizam lipídeos como fonte secundária de energia. Nesse sentido, o corpo gorduroso dos insetos se caracteriza pela principal estrutura de reserva energética, uma vez que armazena triglicerídeos, glicogênio e proteínas. Além de estocar biomoléculas que fornecem energia, o corpo gorduroso de insetos atua na biossíntese de diversas proteínas e outros metabólitos, e participa da desintoxicação do organismo (CANAVOSO *et al.*, 2001; PATEL *et al.*, 2005; ARRESE; SOULAGES, 2009; ROMA *et al.*, 2010). Diante disso, os resultados obtidos demonstram a presença de PAS positivo nos controles, confirmando a ocorrência de glicogênio no corpo gorduroso dos insetos. Todavia,

na CL<sub>20</sub>, o teor de carboidratos diminuiu e na CL<sub>50</sub> foi extinto. Simultaneamente, foi observado redução na área das gotas lipídicas na CL<sub>20</sub> quando comparada aos controles e na CL<sub>50</sub> quando comparada a CL<sub>20</sub>. Pode-se inferir, então, que ao ser submetido ao óleo essencial de *I. verum*, a provável dificuldade de absorção de carboidratos da dieta pode ter levado os animais a consumirem suas reservas de glicogênio e lipídeos.

Quando as reservas de carboidratos são consumidas, pode haver, também, degradação de proteínas para obtenção de energia (MCCUE *et al.*, 2015; WELCH JR *et al.*, 2016). Observa-se através da técnica de PAS que os indivíduos dos grupos controle apresentavam depósitos de glicogênio nas regiões musculares torácicas. Entretanto, nos indivíduos expostos à CL<sub>50</sub>, foi observada ausência de reservas de glicogênio e algumas fibras musculares fragmentadas. Foi observado, ainda, tanto na CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub>, redução significativa da espessura das fibras musculares e maior espaçamento entre elas. Tais danos podem impactar fortemente a capacidade de locomoção e a capacidade de voo dos insetos. Isso implica dificuldade para obter alimento, para acasalar e encontrar substrato para oviposição, reduzindo de forma efetiva a capacidade dessa praga de gerar danos.

A utilização de doses subletais do óleo essencial de *I. verum* afetou drasticamente a morfofisiologia de *D. sukii*. Provavelmente, esse óleo não atua pela inibição da enzima acetilcolinesterase, já que os resultados obtidos sugerem uma possível inibição de enzimas digestivas ou receptores de membranas celulares que acarretaram a não absorção de carboidratos do alimento pelo intestino do inseto. A coloração de azul de bromofenol indicou teor de proteínas constante no intestino médio entre controles e tratamentos, mas com a possível inibição das enzimas digestivas, os insetos não conseguem obter energia a partir do alimento ingerido. Tais alterações podem ser creditadas ao (*E*)-anetol, composto predominante no óleo essencial de anis-estrelado. Sendo assim, o óleo de *I. verum* surge como alternativa ao controle de *D. sukii* a longo prazo, uma vez que apresenta alta letalidade para esse inseto e causa danos severos àqueles que sobrevivem à exposição. Entretanto, estudos devem ser realizados para avaliar a sua toxicidade em outros animais e desenvolver produtos para aplicação em campo.

## 5 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de *I. verum*, *M. fragrans* e *S. molle* foram obtidos com bons rendimentos de extração e composição química coerente com a disponível na literatura.

Todos os óleos em estudo apresentaram atividade inseticida apreciável sobre *D. sukii*, sendo que o desempenho de *I. verum* deve ser ressaltado em razão da baixíssima  $CL_{50}$  observada.

Os três óleos essenciais em estudo inibiram a enzima acetilcolinesterase satisfatoriamente. Entretanto, o desempenho do óleo de *M. fragrans* e *S. molle* foi superior ao de *I. verum*.

As análises morfológicas e histoquímicas evidenciaram os danos causados por doses subletais do óleo essencial de *I. verum* sobre fêmeas de *D. sukii*. As alterações observadas no tecido muscular, corpo groduroso e intestino médio dos insetos podem impactar severamente a sobrevivência desses indivíduos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABOALHAIJA, A. *et al.* *Schinus molle* L. Collected from Jordan and Turkey: Essential Oil Composition and Anticholinesterase Activity. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 22, n. 3, p. 704-716, 2019.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allure, 2017; 804 p.
- ALVES, K. F. *et al.* *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) essential oil toxicity to *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 31, p. 31718-31726, 2018.
- ANDREAZZA, F. *et al.* **Técnica de Criação de *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) em Dieta Artificial**. 1.ed. Pelotas: Embrapa, 2016. p. 1-23.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 207-225, 2009.
- ÁTICO BRAGA, V. A. *et al.* Effect of essential oils of *Mentha spicata* L. and *Melaleuca alternifolia* Cheel on the midgut of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). **Acta Histochemica**, v. 122, n. 3, p. 151529, 2020.
- BECHER, P. G. *et al.* Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. **Functional Ecology**, v. 26, n. 4, p. 822-828, 2012.
- BELLUTTI, N. *et al.* Dietary yeast affects preference and performance in *Drosophila suzukii*. **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 2, p. 651-660, 2018.
- BLANK, A. F. *et al.* Comportamento fenotípico e genotípico de populações de manjeriço. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 28, n. 3, p. 305-310, 2010.
- BLENAU, W. *et al.* Plant essential oils and formamidines as insecticides/acaricides: what are the molecular targets? **Apidologie**, v. 43, n. 3, p. 334-347, 2012.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010. p. 198-199.
- CAMPOLO, O. *et al.* Essential Oils in Stored Product Insect Pest Control. **Journal of Food Quality**, p. 18, 2018.
- CANAVOSO, L. E. *et al.* Fat metabolism in insects. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 23-46, 2001.
- CHAABAN, A. *et al.* Insecticide activity of *Curcuma longa* (leaves) essential oil and its major compound alpha-phellandrene against *Lucilia cuprina* larvae (Diptera: Calliphoridae): Histological and ultrastructural biomarkers assessment. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 153, p. 17-27, 2019.

- CLOONAN, K. R. *et al.* Advances in the Chemical Ecology of the Spotted Wing *Drosophila (Drosophila suzukii)* and its Applications. **Journal of Chemical Ecology**, v. 44, n. 10, p. 922-939, 2018.
- DEPRA, M. *et al.* The first records of the invasive pest *Drosophila suzukii* in the South American continent. **Journal of Pest Science**, v. 87, n. 3, p. 379-383, 2014.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. Hoboken: J. Wiley, 2009. 327 p.
- DO PRADO, A. C. *et al.* *Schinus molle* essential oil as a potential source of bioactive compounds: antifungal and antibacterial properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 2, p. 516-522, 2019.
- DU, S. S. *et al.* Chemical Constituents and Activities of the Essential Oil from *Myristica fragrans* against Cigarette Beetle *Lasioderma serricorne*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, n. 9, p. 1449-1456, 2014.
- DUTRA, K. A. *et al.* Morphological and immunohistochemical study of the midgut and fat body of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: noctuidae) treated with essential oils of the genus *Piper*. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 94, n. 7, p. 498-513, 2019.
- ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.
- ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. v. 130, n.3, p.325-37, 2001.
- FONTANETTI, C. *et al.* Microscopy as a tool in toxicological evaluations. *In: MÉNDEZ-VILAS, A.; DÍAZ, J. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. v. 2. 2010. p. 1001-1007.
- FRANCA, L. P. *et al.* *Piper capitarianum* essential oil: a promising insecticidal agent for the management of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 8, p. 9760-9776, 2021.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GOMES, V. *et al.* Variation in the essential oils composition in Brazilian populations of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 222-227, 2013.
- GUPTA, A. D. *et al.* Chemistry, antioxidant and antimicrobial potential of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt). **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 25-31, 2013.
- HASHEM, A. S. *et al.* *Pimpinella anisum* essential oil nanoemulsions against *Tribolium castaneum*—insecticidal activity and mode of action. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 19, p. 18802-18812, 2018.

HUANG, Y. F. *et al.* Antifungal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* Fruit and Its Main Component trans-Anethole. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 7558-7569, 2010.

IKBAL, C.; PAVELA, R. Essential oils as active ingredients of botanical insecticides against aphids. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 3, p. 971-986, 2019.

INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. **IRAC susceptibility test methods series**. Method 026. 2011.

ISMAN, M. B. Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. **Phytochemistry Reviews**, p. 7, 2019.

JANKOWSKA, M. *et al.* Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System: A Review. **Molecules**, v23, n. 1, p. 20, 2018.

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. **Basic Techniques of Cytology and Histology**. LivrariaEditora Santos; Bookstore Santos, São Paulo. 1983.

KAPOOR, I. P. S. *et al.* Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil and Oleoresins of Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) Fruits. **International Journal of Food Properties**, v. 16, n. 5, p. 1059-1070, 2013.

KARAGEORGI, M. *et al.* Evolution of Multiple Sensory Systems Drives Novel Egg-Laying Behavior in the Fruit Pest *Drosophila suzukii*. **Current Biology**, v. 27, n. 6, p. 847-853, 2017.

LEE, J. C. *et al.* In Focus: Spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, across perspectives. **Pest Management Science**, v. 67, n. 11, p. 1349-1351, 2011.

LI, Y. J. *et al.* *Illicium verum* essential oil, a potential natural fumigant in preservation of lotus seeds from fungal contamination. **Food and Chemical Toxicology**, v. 141, p. 9, 2020.

LOPEZ, A. *et al.* Insecticidal activity of microencapsulated *Schinus molle* essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 209-216, 2014.

MARTINS, M. D. *et al.* Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 485-492, 2014.

MATOS, L. F. *et al.* Chemical composition and insecticidal effect of essential oils from *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllus* on *Callosobruchus maculatus* in cowpea. **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 7, 2020.

MATTILA, J.; HIETAKANGAS, V. Regulation of Carbohydrate Energy Metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 207, n. 4, p. 1231-1253, 2017.

MCCUE, M. D. *et al.* How and When Do Insects Rely on Endogenous Protein and Lipid Resources during Lethal Bouts of Starvation? A New Application for <sup>13</sup>C-Breath testing. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, 2015.

- OFTADEH, M. *et al.* Toxicity and deleterious effects of *Artemisia annua* essential oil extracts on mulberry pyralid (*Glyphodes pyloalis*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 170, 2020.
- PATEL, R. T. *et al.* Activation of the Lipid Droplet Controls the Rate of Lipolysis of Triglycerides in the Insect Fat Body\*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 24, p. 22624-22631, 2005.
- PEARSE, A. **Histochemistry Theoretical and Applied**. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1985.
- PIMENTEL, F.A. *et al.* A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, Jan. 2006.
- RAJENDRAN, S.; SRIRANJINI, V. Plant products as fumigants for stored-product insect control. **Journal of Stored Products Research**, v. 44, n. 2, p. 126-135, 2008.
- ROMA, G. C. *et al.* Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. **Micron**, v. 41, n. 5, p. 395-401, 2010.
- SHI, Z.-K. *et al.* Effects of starvation on the carbohydrate metabolism in *Harmonia axyridis* (Pallas). **Biology Open**, v. 6, n. 7, 2017.
- SOLOMONS, T. W. G., FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 12ª edição, LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., Rio de Janeiro, 2018.
- TANG, B. *et al.* Advances in trehalose metabolism and its regulation of insect chitin synthesis. **Scientia Agricultura Sinica**, v. 51, n. 4, p. 697-707, 2018.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J Chromatogr A**. v. 1, p.463-471.1963.
- VAN TIMMEREN, S.; ISAACS, R. Control of spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, by specific insecticides and by conventional and organic crop protection programs. **Crop Protection**, v. 54, p. 126-133, 2013.
- VORIS, D. G. D. *et al.* Evaluation of larvicidal, adulticidal, and anticholinesterase activities of essential oils of *Illicium verum* Hook. f., *Pimenta dioica* (L.) Merr., and *Myristica fragrans* Houtt. against Zika virus vectors. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 23, p. 22541-22551, 2018.
- WALSH, D. B. *et al.* *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): Invasive Pest of Ripening Soft Fruit Expanding its Geographic Range and Damage Potential. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 2, n.1, p.1-7, 2011.
- WELCH JR, K. C. *et al.* Carbon stable-isotope tracking in breath for comparative studies of fuel use. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1365, n. 1, p. 15-32, 2016.