

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELE TROMBIN DE SOUZA

POTENCIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Drosophila suzukii* (DIPTERA:
DROSOPHILIDAE) E SUA TOXICIDADE AO PARASITÓIDE *Trichopria*
anastrephae (HYMENOPTERA: DIAPRIIDAE)

CURITIBA

2020

MICHELE TROMBIN DE SOUZA

POTENCIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Drosophila suzukii* (DIPTERA:
DROSOPHILIDAE) E SUA TOXICIDADE AO PARASITÓIDE *Trichopria*
anastrephae (HYMENOPTERA: DIAPRIIDAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Profª. Dra. Maria Aparecida Cassilha Zawadneak

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Bernardi

CURITIBA

2020

Souza, Michele Trombin de
Potencial de óleos essenciais sobre *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae)
e sua toxicidade ao parasitóide *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera:
Diapriidae) / Michele Trombin de Souza. - Curitiba, 2020.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - (Produção Vegetal).
Orientadora: Maria Aparecida Cassilha Zawadneak
Coorientador: Daniel Bernardi

1. Drosófila-da-Asa-Manchada. 2. Controle Biológico. 3. Endoparasitoide
Pupal. 4. Mata Atlântica. 5. Inseticida Botânico. I. Zawadneak, Maria
Aparecida Cassilha. II. Bernardi, Daniel. III. Título. IV. Universidade Federal
do Paraná.



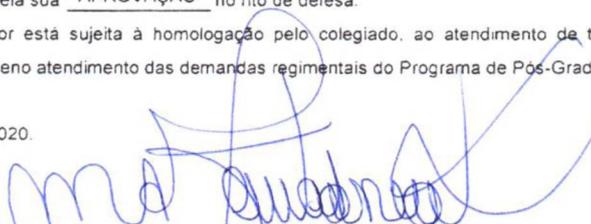
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MICHELE TROMBIN DE SOUZA** intitulada: **POTENCIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Drosophila suzukii* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE) E SUA TOXICIDADE AO PARASITÓIDE *Trichopria anastrephae* (HYMENOPTERA: DIAPRIIDAE)**, sob orientação da Profa. Dra. MARIA APARECIDA CASSILHA ZAWADNEAK, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 02 de Março de 2020.



MARIA APARECIDA CASSILHA ZAWADNEAK

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



FERNANDO TERUHIKO HATA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)



DORI EDSON NAVA

Avaliador Externo (EMBRAPA)



DANIEL BERNARDI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS)

A toda minha família, em especial aos meus pais, José de Fátima de Souza e Maria da Conceição Trombin de Souza, minha irmã Mireli Trombin de Souza, por me fazerem acreditar na educação como o maior dos bens.

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **José de Fátima de Souza** e **Maria da Conceição Trombin de Souza**, que nas suas simplicidades sempre me apoiaram e motivaram aos estudos, mostrando o quão importante é estudar, mesmo não tendo eles a mesma oportunidade no passado. Muito obrigada pela educação e por demonstrar orgulho da minha trajetória.

A minha irmã, **Mireli Trombin de Souza**, que me fez persistir, ser mais forte e acreditar em meu potencial para a realização deste trabalho. Obrigada por sua ajuda, apoio, compreensão, conselhos, incentivos, paciência e compartilhamentos de ideias e opiniões ao longo desse trabalho. Muito obrigada pela forma fraternal e carinhosa com que sempre me ajudou!

À minha professora, **Maria Aparecida Cassilha Zawadneak**, pela orientação e confiança transmitida na elaboração deste trabalho. Porém, simplesmente resumi-lá a categoria de orientadora é muito pouco, espero que ela tenha a certeza da importância que tem e teve para mim não apenas na condução desta pesquisa, mas também pelos seus ensinamentos, conselhos, humor cativante e inestimável confiança depositada em minhas capacidades. E às vezes quando tudo parecia tomar um sentido diferente do planejado lá vinha à frase “é no balançar da carroça que as aboboras se ajeitam”! É inegável também que nunca me esquecerei das viagens para coletas de artrópodes e moluscos, visitas técnicas, nossas participações em Congressos, confraternizações, e das muitas risadas durante nossa agradável convivência.

Ao meu coorientador, **Daniel Bernardi**, por aceitar a fazer parte deste trabalho e acreditar no potencial de nossas pesquisas. Compartilhar deste trabalho com você é um imenso orgulho, afinal é o professor e pesquisador que me inspiro diariamente. Muita obrigada, pelo delineamento da tese, pelas análises dos dados, pela redação dos artigos, contribuição nos experimentos com parasitoides e, sobretudo pelas palavras positivas que me serviram de estímulo e motivação para conduzir este trabalho, mesmo distante você se fez e faz presente em todos os momentos deste trabalho.

Ao professor **Cícero Deschamps**, que me fez despertar a paixão por trabalhar com óleos essenciais desde o Mestrado. Meus sinceros agradecimentos, se hoje estou concluindo mais uma etapa acadêmica você também teve um papel singular, como pessoa, professor, pesquisador e orientador.

Aos professores do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR), especialmente **Beatriz H.L.N. Sales** e **Paulo H.G. Zarbin** pelas análises químicas

dos óleos essenciais. Estendo também meus agradecimentos aos seus orientados, **Antonioni Moliterno, Aurea Portes Ferriani, Carlos Maduro, Douglas Melo e Inaiara Casapula** que sempre foram prestativos quando necessitei de auxílio para conduzir os experimentos desta pesquisa.

Aos **professores da Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal da UFPR (PGAPV/UFPR)**, pelos ensinamentos compartilhados em sala de aula e laboratórios que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos servidores técnicos da PGAPV e UFPR, em especial **Lucimara Antunes, Maria Emília Kudla e Tatiana Miranda Borges**, pelo auxílio durante o período de estudos. Vocês são pessoas tão queridas, competentes e pacientes com tantos estudantes.

Aos professores que são integrantes ou foram do Projeto de Extensão Colhendo Bons Frutos, especialmente **Atila Mógor, Bráulio Santos, Emily Silva Araujo, Francine Cuquel, Ida Chapaval Pimentel, Joatan Machado da Rosa, Patricia do Rocio Dalzoto e Volnei Pauletti**.

A Embrapa Clima Temperado, especialmente o pesquisador **Dori Edson Nava**, que me permitiu realizar o treinamento em seu Laboratório para desenvolver a técnica de criação da *Drosophila suzukii*. Estendo também, aos seus orientados que me auxiliaram durante este período, **Alexandra Krüger, Tiago Scheunemann e Julia Aleixo**, vocês foram muitos especiais todos os dias que estive na presença de vocês, e ao acolhimento em Pelotas, RS. Também não posso deixar de agradecer pela hospedagem na casa da vizinha da Julia, **Maria do Carmo**, que me forneceu acolhida em Pelotas durante esse período.

Ao **Hugo Vidal**, que tornou possível o trabalho da minha qualificação, com relatos de *Drosophila suzukii* em novos hospedeiros.

Ao **Diones Krinski**, que gentilmente cedeu às amostras de óleos de *Piper* spp. usadas nesse trabalho.

Ao **Douglas José de Melo**, pelo auxílio na injeção das amostras, pela identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais e pelas trocas de experiências nesse período.

A **Daiana de Oliveira e Maíra Chagas Morais**, pela criação da *Trichopria anastrephae*, instalação e avaliação dos experimentos de toxicidade ao parasitoide. Muito obrigada por vocês aceitarem fazer parte desta pesquisa.

A **Karin Hoch Fehlauer Ale** que nos auxiliou na tradução dos manuscritos. Muito obrigada pelo seu olhar crítico em cada detalhe que passava despercebido por nós.

Aos meus preciosos amigos que a UFPR me trouxe nesses 12 anos de trajetória: **Pamela Siqueira Hennipman, Fernando Albertini, Jaqueline Dranka, Jessica Kaiser,**

Caroline Frizzo, Thalita Mocellin, e Teomar Duarte. Obrigada por vocês existirem e fazerem que a minha vida seja levada de forma mais leve.

Aos amigos e colegas que são ou foram da PGAPV/UFPR: **Felipe Francisco, Lais Adamuchio, Jeidi Galeano, Cristian Galeano, Wanderlei do Amaral, Caroline Frizzo, Valdeci Constantino, Marcelle Bettonni, Carlos Medina, Leandro Marcolino, Roger Raupp, Marlon Hahn e Diones Krinski.** Muito feliz em encontrá-los em meu caminho e compartilhar de momentos agradáveis com vocês.

Aos amigos e colegas que são ou foram do Laboratório de Entomologia Agrícola “Prof. Angelo Moreira da Costa Lima”: **Adelia M. Bischoff, Alessandra Benatto, Aline Mexico, Jason Lee Furuie, Bruna C. Durau, Bruno Araújo, Caio Aragão, Carolina Poitevin, Catherine Machulek, Daniel Alano, Estela Brenner, Franciele Baja, Gustavo Frandina, Isabela Pauluk, Jéssica Suelen, Launa Dybas, Leticia Maleski, Luana Jaras, Lucas K. Aguiar, Maitê Landal, Maria Gabriela Rocha, Mariana Porsani, Marina Mickosz, Mireli Trombin de Souza, Pedro Araujo, Pedro Nanni, Priscila Chek, Renata Bach, Renata Bandeira, Renata Rodrigues, Rodrimar Gonçalves, Stephanie Drobovolki, Suelen Oleke e Taciana M. Kuhn.** Cada um, a sua maneira, me ensinou algo de bom.

Aos representantes discentes do colegiado da PGAPV/UFPR **Andreza Cerioni Belniaki, Caroline Frizzo, Marlon Hahn e Mireli Trombin de Souza** que se dedicam na tarefa de nos representar com carinho.

Aos membros da banca de pré-defesa (**Beatriz H.L.N. Sales, Diones Krinski e Fernando Bisso**) que contribuíram para a finalização deste trabalho. Aos membros da banca de defesa (**Daniel Bernardi, Dori Edson Nava e Fernando Teruhiko Hata**). A escolha de vocês não foi ao acaso, mas sim pela competência e por vocês serem referência para mim. Muito obrigada pela presença de vocês, pela leitura minuciosa que fizeram ao longo do texto, pelas sugestões de melhoria do trabalho.

Á **UFPR** e a **PGAPV** pelo aprendizado adquirido e por todas as oportunidades de aprimoramentos de conhecimentos que me foram concedidas.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro desde o Mestrado, suporte imprescindível na realização desta pesquisa.

MUITO OBRIGADA!

‘Pest control constitutes an ancient war, waged by man for 4000 years or more against a great variety of often small and remarkably persistent enemies. Surprisingly, although the war is old, its dynamics and the nature of the principal protagonists seem poorly understood. Even the objectives, at least of man, are ill-defined. It is as though man, in the heat of battle, has not had the time to analyse in any sophisticated fashion the conflict in which he finds himself. Battles have been won and lost but lessons have been learned slowly and painfully. It is only in recent years that people have begun to ask the fundamental questions of principle and to raise doubts about implicit beliefs and objectives.’

(CONWAY, 1976)

RESUMO

A drosófila-da-asa-manchada, *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae) é uma praga polífaga que ataca frutas de casca mole e fina. Suas fêmeas ovipositam em frutos maduros e as larvas causam destruição direta dos tecidos. Sendo uma espécie recentemente introduzida no Brasil, as buscas por estratégias de controle referem-se às alternativas com baixo impacto ambiental e residual. Assim, objetivou-se avaliar o potencial dos óleos essenciais (OEs) da flora nativa e cultivada no Brasil, com atividade inseticida e ovicida para *D. suzukii*, bem como testar sua toxicidade para o parasitóide *Trichopria anastrephae* Lima (Hymenoptera: Diapriidae). Foram testados OEs das espécies do gênero *Baccharis* (*B. anomala* DC; *B. calvescens* DC; *B. mesoneura* DC; *B. milleflora* DC; *B. oblongifolia* Pers; *B. trimeria* (Less) DC; *B. uncinella* DC.), *Piper* (*P. aduncum* L.; *P. crassinervium* Kunth; *P. gaudichadianum* Kunth; *P. malacophyllum* Pries; *P. marginatum* L.) e três ecótipos (ECOs) de *Rosmarinus officinalis* L. com seus principais constituintes isolados. Os óleos foram extraídos por destilação a vapor e as diluições foram realizadas com acetona nas concentrações de 0,2 a 8,0%. Os tratamentos foram acompanhados por controles positivos (Delegate® [75 de i.a. por L de água], Azamax® ou Openeem Plus® [250 mL de i.a. por 100 L de água]) e controles negativos (acetona ou água). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito tratamentos e cinco repetições, sendo a unidade experimental constituída por um recipiente (300 mL) contendo 20 adultos de *D. suzukii* ou *T. anastrephae*. Quando houve diferenças significativas entre os tratamentos, foram realizadas comparações múltiplas (teste de Tukey, $P < 0,05$) usando a função glht do pacote Multcomp, com ajuste dos valores de P . Em bioensaios de ingestão e aplicação tópica, OEs de *B. calvescens*, *B. mesoneura*, *B. oblongifolia*, *P. aduncum*, *P. gaudichadianum*, *P. marginatum*, ECO 1,8-cineol de *R. officinalis*, ECO cânfora de *R. officinalis*, e os constituintes isolados de cânfora e 1,8-cineol causaram mortalidade em aproximadamente 100% dos adultos de *D. suzukii*, semelhante ao inseticida Delegate® (96,2% de mortalidade). Além disso, os resíduos secos desses OEs proporcionaram um efeito repelente na oviposição ($\cong 7$ ovos / frutos) e efeitos negativos na viabilidade do ovo ($\cong 2$ larvas / frutos) de *D. suzukii* em frutos artificiais quando comparados aos frutos não tratados. Com base na estimativa da concentração letal necessária para matar 90% das moscas expostas, OE de *B. calvescens*, *B. mesoneura*, *B. oblongifolia*, *P. aduncum*, *P. gaudichadianum*, *P. marginatum*, ECO 1,8-cineol de *R. officinalis*, ECO cânfora de *R. officinalis* e os constituintes isolados 1,8-cineol e cânfora proporcionaram baixa toxicidade para *T. anastrephae* em um bioensaio de ingestão e aplicação tópica (mortalidade $< 20\%$), similar ao tratamento da água ($\cong 5\%$ de mortalidade). A maioria dos OEs das espécies de *Baccharis*, *Piper* e ECOs de *R. officinalis* estudados são inseticidas botânicos promissores para o manejo de *D. suzukii*, particularmente em sistemas de agricultura orgânica, devido à baixa toxicidade para *T. anastrephae*.

Palavras-chave: Drosófila-da-Asa-Manchada. Controle Biológico. Endoparasitoide Pupal. Mata Atlântica. Inseticida Botânico.

ABSTRACT

Spotted wing drosophila *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae) is a polyphagous pest that attacks soft- and thin-skinned fruits. Its females oviposit into ripe fruit and larvae cause direct destruction of tissues. Being a species recently introduced in Brazil, the search for control strategies refer to alternatives with low environmental and residual impact. Thus, we aimed to evaluate the potential of essential oils (EOs) from native and cultivated flora in Brazil, with insecticidal and ovicidal activity to *D. suzukii*, as well as to test its toxicity to the parasitoid *Trichopria anastrephae* Lima (Hymenoptera: Diapriidae). Here we test EOs from species of the genus *Baccharis* (*B. anomala* DC.; *B. calvescens* DC.; *B. mesoneura* DC.; *B. milleflora* DC.; *B. oblongifolia* Pers; *B. trimeria* (Less) DC.; *B. uncinella* DC.), *Piper* (*P. aduncum* L.; *P. crassinervium* Kunth.; *P. gaudichadianum* Kunth.; *P. malacophyllum* Priesl.; *P. marginatum* L.) and three ecotypes (ECOs) of *Rosmarinus officinalis* L. with their isolated major constituents. Oils were extracted using steam distillation, and dilutions were made with acetone at concentrations range 0.2 – 8.0%. The treatments were accompanied by positive controls (Delegate® [75 of a.i. per L of water], Azamax® or Openeem Plus® [250 mL of a.i. per 100 L of water]) and negative controls (acetone or water). The design was completely randomized with eight treatments and five replications, with the experimental unit consisting of a cup containing 20 *D. suzukii* or *T. anastrephae* insects. When there were significant differences among treatments, multiple comparisons (Tukey's test, $P < 0.05$) were performed using the glht function of the Multcomp package, with adjustment of p-values. In bioassays of ingestion and topical application, EOs from *B. calvescens*, *B. mesoneura*, *B. oblongifolia*, *P. aduncum*, *P. gaudichadianum*, *P. marginatum*, ECO 1,8-cineole of *R. officinalis*, ECO camphor of *R. officinalis*, and the isolated constituents camphor and 1,8-cineole caused mortality approximately 100% of adults of *D. suzukii*, similar to the insecticide Delegate® (96.2% of mortality). Besides, the dry residues from these EOs provided a repellent effect on oviposition ($\cong 7$ eggs/ fruits) and negative effects on egg viability ($\cong 2$ larvae/ fruits) of *D. suzukii* on artificial fruits when compared to untreated fruits. Based on the estimate of the lethal concentration required to kill 90% of exposed flies, EOs from *B. calvescens*, *B. mesoneura*, *B. oblongifolia*, *P. aduncum*, *P. gaudichadianum*, *P. marginatum*, ECO 1,8-cineole of *R. officinalis*, ECO camphor of *R. officinalis*, and the isolated constituents 1,8-cineole and camphor provided low toxicity to *T. anastrephae* in a bioassay of ingestion and topical application (mortality $< 20\%$), similarly to the water treatment ($\cong 5\%$ of mortality). EOs from most species of *Baccharis*, *Piper*, and ECOs de *R. officinalis* studied showed to be promising botanical insecticides for the management of *D. suzukii*, particularly in organic farming systems, due to the low toxicity to *T. anastrephae*.

Keywords: Spotted-Wing-Drosophila. Biological Control. Endoparasitoid pupal. Atlantic Florest. Botanical Insecticides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1- Distribuição geográfica de <i>Drosophila suzukii</i> em todo o mundo. As áreas círculos são regiões onde <i>D. suzukii</i> foram registradas pela primeira vez.....	32
Figura 2-2- Macho e fêmea de <i>Drosophila suzukii</i> . O macho possui mancha escura na margem distal das asas (A). A fêmea possui aparelho ovipositor serrelhado esclerotinado (B). Detalhe das manchas dos machos na asa distal (C) e Detalhe do ovipositor das fêmeas (D).....	35
Figura 2-3- Ovos de <i>Drosophila suzukii</i> em frutos de morangos e seta indicando os espiráculos respiratórios (A). Detalhes mostrando os dois tubos respiratórios subapicais nos ovos (B).....	36
Figura 2-4- Ovo de <i>Drosophila suzukii</i> , ínstares e ganchos de boca.....	36
Figura 2-5- Pupas de <i>Drosophila suzukii</i> em frutos de morangos (A) e pupas com tonalidade castanhas (B).....	37
Figura 2-6- Ciclo de vida de <i>Drosophila suzukii</i> em condições de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm \text{U.R.}$, e fotoperíodo de 12: 12 (claro: escuro).....	38
Figura 2-7- <i>Trichopria anastrephae</i> parasitando pupas de <i>Drosophila suzukii</i>	42
Figura 3-1- Mortalidade de <i>Drosophila suzukii</i> quando submetida a bioensaios de aplicação tópica e ingestão em diferentes tratamentos, contituidos de óleos essenciais de diferentes espécies de <i>Baccharis</i> , limoneno, Azadiractina [®] e Delegate [®]	58
Figura 3-2- Toxicidade larval (mg.L^{-1}) de <i>Drosophlia suzukii</i> após exposição aos OEs usando acetona como transportador.....	62
Figura 3-4- Número de ovos (A) e viabilidade embrionária de <i>D. suzukii</i> (B) em frutos artificiais após a imersão nos tratamentos com diferentes tratamentos.....	63
Figura 3-3- Visão em um microscópio estereoscópico (aumento de $50 \times$) da deformidade em adultos de <i>Drosophila suzukii</i> após tratamento com limoneno. Notas: (a) machos e fêmeas normais; (b) deformidades no abdômen; (c) deformidade no abdmônen e asas; (d) emergência incompleta; (e) deformidade no abdômen e pronoto, (f) adulto deformado, (g) desenvolvimento incompleto.....	64
Figura 3-5- Repelência de adultos de <i>Drosophila suzukii</i> em bioensaios com olfatometro de dupla-escolha.....	65
Figura 4-1- Major constituents found in the essential oils of <i>Piper aduncum</i> (A), <i>Piper crassinervium</i> (B), <i>Piper gaudichaudiamum</i> (C), <i>Piper malacophyllum</i> (D), and <i>Piper marginatum</i> (E). 1) germacrene B; 2) β –selinene; 3) 7-epi- α –eudesmol; 4) myristicin; 5) 1-	

epi-cubenol; 6) eudesm-7(11)-en-4-ol; 7) α -terpinene; 8) α -terpinene; 9) p-cymene; 10) sarisam; 11) kakuol.....	87
Figura 4-2- Mortality (%) (average \pm standard error) of <i>Drosophila suzukii</i> adults at 120 h after exposure to treatments (HAET) in the ingestion and topical application bioassays.	88
Figura 4-3- Effects of the essential oils from of <i>Piper</i> spp., spinetoram (Delegate 250 WG TM) and limonene (Openeen Plus 1.2 EC TM) in the oviposition of <i>Drosophila suzukii</i> on artificial fruits.....	89
Figura 4-4- Mortality (%) (average \pm standard error) of <i>Trichopria anastrephae</i> adults at 120 h after exposure to treatments in ingestion and topical application bioassays.	90
Figura 5-1- Constituintes principais encontrados nos óleos essenciais dos ecótipos de <i>Rosmarinus officinalis</i> : 1) α -pineno, 2) 1,8-cineol, 3) cânfora, 4) acetato de bornila, 5) canfeno.....	111
Figura 5-2- Mortalidade de <i>Drosophila suzukii</i> quando submetida a bioensaios de aplicação tópica e ingestão em diferentes tratamentos, contituidos de óleos essenciais de ecótipos de <i>Rosmarinus officinalis</i> , limoneno, Azadiractina [®] e Delegate [®]	112
Figura 5-3- Número de ovos de <i>Drosophila suzukii</i> no bioensaio de imersão em “frutos artificiais” em condições de laboratório.	115

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Plantas hospedeiras comerciais confirmadas com a presença de <i>Drosophila suzukii</i> (Diptera: Drosophilidae).....	24
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1- Tratamentos avaliados para o manejo de <i>Drosophila suzukii</i>	48
Tabela 3-2- Composição do óleo essencial (%) das amostras de folhas frescas de sete espécies de <i>Baccharis</i> coletadas na Região Neotropical, Brasil.	50
Tabela 3-3- Estimativa da CL ₅₀ e CL ₉₀ (in mg L ⁻¹) bem como o intervalo de confiança de <i>Baccharis</i> spp., limoneno, inseticida sintético à base de espinosina (Delegate [®]) e azadiractina (Azamax [®]) sobre adultos de <i>Drosophila suzukii</i> adults em 120 HAE nos bioensaios de de aplicação tópica e ingestão.	59
Tabela 3-4- Mortalidade larval (LM), taxa de pupação (PR), mortalidade pupal (PM), e deformidade de adultos de <i>Drosophila suzukii</i> tratados com diferentes tratamentos.....	60
Tabela 3-5- Estimativa do tempo letal mediano (TL ₅₀ , em horas) e do intervalo de confiança de uma formulação <i>Baccharis</i> spp., limoneno, inseticida sintético à base de espinosina (Delegate [®]) e azadiractina (Azamax [®]) sobre adultos de <i>Drosophila suzukii</i> utilizando a máxima concentração testada.	61
Tabela 4-1- Insecticides evaluated for the management of <i>Drosophila suzukii</i> and the geographic coordinates of <i>Piper</i> species	82
Tabela 4-2- Essential oil composition (%) of the leaf samples leaves of <i>Piper</i> species.	86
Tabela 5-1- Tratamentos avaliados para o manejo de <i>Drosophila suzukii</i>	103
Tabela 5-2- Composição do óleo essencial (%) das folhas frescas de três ecótipos (ECO) de <i>Rosmarinus officinalis</i> coletados na região Neotropical, Brasil.....	110
Tabela 5-3- Estimativa do tempo letal mediano (TL ₅₀ , em horas) e o intervalo de confiança dos óleos essenciais de <i>Rosmarinus officinalis</i> e seus constituintes principais para adultos de <i>Drosophila suzukii</i> usando a concentração máxima testada.....	113
Tabela 5-4- Estimativa da CL ₅₀ e CL ₉₀ (em mg L ⁻¹) bem como o intervalo de confiança de <i>Rosmarinus</i> leaves (OEs) e seus constituintes majoritários, e inseticida sintético à base de espinosina (Delegate [®]) e azadiractina (Azamax [®]) sobre adultos de <i>Drosophila suzukii</i> em 120 HAE nos bioensaios de aplicação tópica e ingestão.....	114
Tabela 5-5- Mortalidade (%) e parasitismo (P, %) de <i>Trichopria anastrephae</i> após 120 horas de exposição dos tratamentos pelo bioensaio de ingestão.	116

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

a.i.	–	active ingredient
AChE	–	acetilcolinesterase
AD	–	deformidade de adultos
C:E	–	claro:escuro
CAPES	–	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAS	–	Chemical Abstracts Service
CB	–	controle biológico
CDB	–	Convenção sobre Diversidade Biológica
CEPF	–	Critical Ecosystem Partnership Fund
CG-EM	–	cromatografia gasosa-espectro de massa
CL	–	concentração letal
cm	–	centímetro
cm ²	–	centímetro quadrado
CNPq	–	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Da	–	Dalton
DAM	–	Drosófila-da-Asa-Manchada
df	–	degree of freedom
e.g.	–	por exemplo
EC	–	concentrado emulsionável
ECO	–	ecótipo
EMBRAPA	–	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPPO	–	Organização Europeia e Mediterrânea de Proteção Vegetal
et al.	–	e outros; e colaboradores
EUA	–	Estado Unidos da América
eV	–	electron Volts
F	–	distribuição de F
FAL	–	fenilalanina amônia-liase
FAO	–	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FID	–	detector de ionização por chama
g	–	grama
GLM	–	modelos lineares generalizados
h	–	horas
HAET	–	horas após a exposição aos tratamentos
HMBM	–	Herbário do Museu Botânico Municipal
HMG-CoA	–	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
i.a.	–	ingrediente ativo
i.e.	–	isto é
INPE	–	Instituto Nacional de Pesquisa Espacial
IPP	–	isopentenil-pirofosfato
ISO	–	International Organization for Standardization
kg	–	quilograma

L	–	litro
L3	–	terceiro instar larval
lb	–	libra
m	–	metro
MEP	–	metilertitrol fosfato
mg	–	miligrama
min	–	minutos
MIP	–	Manejo Integrado de Pragas
mL	–	mililitro
mm	–	milimetro
MT	–	mortalidade total
p: v	–	peso:volume
PA	–	estado do Pará
PM	–	mortalidade pupal
PR	–	estado do Paraná
PR	–	taxa de pupação
PR	–	porcentagem de repelência
OEs	–	óleos essenciais
S	–	sul
s	–	segundos
spp.	–	espécies
TANG	–	herbário Tangará
TL	–	tempo letal
UFPel	–	Universidade Federal de Pelotas
UFPR	–	Universidade Federal do Paraná
UnB	–	Universidade de Brasília
UNEMAT	–	Universidade do Estado de Mato Grosso
UR	–	umidade relativa
US\$	–	dólar americano
W	–	west
WG	–	granulado dispersível
µL	–	microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

α	–	alfa
β	–	beta
γ	–	gama
%	–	porcentagem
™	–	marca comercial
®	–	marca registrada
&	–	eitza
'	–	segundos
”	–	minutos
<	–	menor que
\geq	–	maior e igual
\pm	–	mais ou menos
°	–	grau
°C	–	grau Celsius
\cong	–	aproximadamente igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 JUSTIFICATIVA	26
1.2 OBJETIVOS	27
1.2.1 Objetivo geral	27
1.2.2 Objetivos específicos	27
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	28
2.1 PROSPECÇÃO DE PLANTAS AROMÁTICAS INSETICIDAS	28
2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	29
2.2.1 Terpenos: óleos essenciais.....	30
2.2.2 Importância econômica dos óleos essenciais.....	31
2.3 <i>Drosophila suzukii</i> (MATSUMURA) (DIPTERA: DROSOPHILIDAE).....	31
2.3.1 Descrição morfológica de <i>Drosophila suzukii</i>	34
2.3.2 Bioecologia de <i>Drosophila suzukii</i>	37
2.3.3 Efeitos das condições climáticas no desenvolvimento de <i>Drosophila suzukii</i>	38
2.3.4 Ecologia de <i>Drosophila suzukii</i>	40
2.4 CONTROLE BIOLÓGICO: PARASITOIDES DE <i>Drosophila suzukii</i>	41
2.4.1 <i>Trichopria anastrephae</i> (Hymenoptera: Diapriidae).....	42
3 ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Baccharis</i> PODEM SER EFICAZES NO CONTROLE DE <i>Drosophila suzukii</i>?	44
3.1 INTRODUÇÃO	45
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.2.1 Obtenção do material vegetal para extração dos óleos essenciais.....	47
3.2.2 Análise química dos óleos essenciais: identificação e quantificação.....	49
3.2.3 Colônia de <i>Drosophila suzukii</i>	51
3.2.4 Bioensaios.....	51
3.2.5 Testes discriminatórios (experimento inicial)	52
3.2.5.1 Curvas de concentração-resposta	53
3.2.6 Dissuasão da oviposição.....	54
3.2.7 Repelência	55
3.2.8 Efeito larvicida e parâmetros biológicos	55
3.2.9 Análise dos dados	56
3.3 RESULTADOS	57

3.4 DISCUSSÃO	65
3.5 REFERÊNCIAS	70
4 CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS OF SELECTED SPECIES OF PIPER AND THEIR INSECTICIDAL ACTIVITY AGAINST <i>Drosophila suzukii</i> AND <i>Trichopria anastrephae</i>	77
4.1 INTRODUCTION	78
4.2 MATERIAL AND METHODS	79
Plant material and isolation of the essential oils (EOs)	79
Chemical analysis	79
Treatments	81
Statistical analysis	84
4.3 RESULTS	85
4.4 DISCUSSION	90
Compliance with ethical standards	94
4.5 REFERENCES	94
5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE LAMIACEAE NEOTROPICAL: SCREENING E TOXICIDADE SOBRE <i>Drosophila suzukii</i> e <i>Trichopria anastrephae</i> ...	98
5.1 INTRODUÇÃO	99
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	101
5.2.1 Material vegetal, extração e obtenção dos principais compostos dos óleos essenciais.	101
5.2.2 Análise química dos óleos essenciais: identificação e quantificação	102
5.2.3 Estabelecimento das colônias de <i>Drosophila suzukii</i> e <i>Trichopria anastrephae</i>	104
5.2.4 Bioensaios	104
5.2.4.1 Bioensaios de ingestão e aplicação tópica	105
5.2.4.2 Curvas de concentração-resposta dos tratamentos ativos em <i>Drosophila suzukii</i> ...	106
5.2.4.3 Tempo letal (TL ₅₀) dos tratamentos ativos em <i>Drosophila suzukii</i>	107
5.2.5 Efeitos dos OEs de <i>Rosmarinus officinalis</i> e seus constituintes majoritários na oviposição e viabilidade larval de <i>Drosophila suzukii</i>	107
5.2.6 Toxicidade dos óleos essenciais sobre <i>Trichopria anastrephae</i>	108
5.2.7 Análise dos dados	109
5.3 RESULTADOS	109
5.4 DISCUSSÃO	116
5.5 REFERÊNCIAS	119
6 CONSIDERAÇÕES GERAIS	129

7 REFERÊNCIAS GERAIS	131
-----------------------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é conhecido por sua notável biodiversidade, principalmente por ser constituído por seis biomas terrestres (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal) que possuem agrupamento de flora e fauna distintas. Dentre estes biomas, a Mata Atlântica é o que apresenta maior número de espécies vegetais com mais de 19.000 espécies conhecidas, e mais de 7.600 espécies endêmicas (FORZZA et al., 2012). A Mata Atlântica ocorre ao longo de boa parte da costa brasileira, se estendendo desde o estado do Rio Grande do Norte até o norte do estado do Rio Grande do Sul (VELOSO et al., 1991). Entretanto, devido as intensas atividades de exploração madeireira, de caça, do comércio ilegal de animais, do desenvolvimento urbano e industrial, da expansão das áreas agrícolas e da implantação de pastagens (CEPF, 2011) ao qual este bioma tem sido submetido, resultou em uma perda de 93% da sua extensão original (SOS MATA ATLÂNTICA e INPE, 2019). Apesar disso, os recursos florestais não madeireiros consistem na principal fonte de renda e alimentação de milhares de famílias que vivem da extração florestal no Brasil, constituindo oportunidade real para o incremento da renda familiar dos extrativistas, seja por meio de sua exploração em manejo ou em cultivos domesticados (WUNDER, 1998). Frente a isso, o potencial de utilização da biodiversidade resulta da combinação adequada entre disponibilidade de matéria-prima, tecnologia e mercado (SOUZA, 2015).

As plantas aromáticas constituem uma fonte de matéria-prima para a obtenção de óleos essenciais (OEs) (BIASI e DESCHAMPS, 2009), cujo mercado internacional movimenta em torno de US\$ 15 bilhões/ano, com crescimento anual próximo de 11%. O Brasil destaca-se na produção de OE ao lado da Índia, China e Indonésia, sobretudo pela extração dos OEs de espécies cítricas, que são subprodutos da indústria de sucos (BIZZO et al., 2009). Contudo, sua produção ainda é insuficiente para atender a demanda interna, além disto, o mercado nacional e internacional vem demonstrando interesse por novas essências (AMARAL et al., 2019). Em torno de 90% do volume de OEs produzidos pelo Brasil é exportado, sendo o valor unitário médio destes produtos de US\$ 1,34/kg, e os OEs importados pelo país giram em média US\$ 33,04/kg (BIZZO et al., 2009). Além disso, estima-se que existam 3.000 espécies aromáticas no mundo, e destas somente 300 possuem importância comercial (NEDOROSTBOVA et al., 2009). Globalmente, cerca de 65% do mercado de essências provêm de espécies herbáceas cultivadas, 34% de espécies arbóreas e, 1% de espécies herbáceas nativas (BANDONI e CZEPAK, 2008). Desta forma, tanto espécies cultivadas quanto nativas possuem relevância para mais estudos, pois evidentemente, ainda há

uma grande lacuna de conhecimento da flora a ser preenchida em relação às diversas propriedades dos OEs. Estes produtos são empregados na fabricação de produtos de higiene e limpeza, alimentícios, bebidas, farmacêuticos, cosméticos e inseticidas. Entre os potenciais de uso dos OEs se destacam algumas atividades inseticidas, entre elas, toxicidade, regulação do crescimento, inibição da oviposição, detergentes e repelentes (ISMAN, 2000). Estes produtos também incluem as vantagens de serem obtidos em larga escala com preço baixo e suprimentos abundantes de vários óleos, possuem diferentes modo e locais de ação de ação fazendo com que o desenvolvimento de resistência seja menor que os inseticidas convencionais, apresentarem baixo período residual devido à sua alta volatilidade, e os OEs e seus constituintes são relativamente não tóxicos para mamíferos, com raras exceções (ISMAN et al., 2000). Além disso, os OEs apresentam cada vez mais importância principalmente pela globalização do comércio que resultou em um aumento das espécies de pragas invasoras. Um desses insetos é a drosófila-da-asa-manchada, *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae), uma espécie nativa da Ásia e que se tornou uma séria ameaça principalmente aos cultivos de pequenas frutas com epiderme delgada na América, Europa e norte da África (EPPO, 2020). *Drosophila suzukii* possui uma ampla variedade de hospedeiros nativos e exóticos, rápido crescimento populacional (TOCHEN et al., 2014) e alta capacidade de dispersão (WALSH et al., 2011; CINI et al., 2012). A espécie já foi registrada em vários hospedeiros, cultivados a nível comercial como demonstrado no Quadro 1.

O primeiro registro da drosófila-da-asa-manchada na América do Sul ocorreu no Brasil, em áreas de preservação ambiental da Mata Atlântica nos municípios brasileiros de Osório, Vila Maria e Erechim (Rio Grande do Sul) e em Nova Veneza e Botuverá (Santa Catarina) (DEPRÁ et al., 2014). Posteriormente, a espécie foi constatada em outros estados brasileiros, tais como Espírito Santo (ZANUNCIO-JUNIOR et al., 2018), Goiás (PAULA et al., 2014), Minas Gerais (ANDREAZZA et al. 2016a), Paraná (GEISLER et al., 2015), Rio de Janeiro (BITNER-MATHÉ et al 2014) e São Paulo (VILELA e MORI, 2014). Além do Brasil, *D. suzukii* também foi registrada até o momento na Argentina (CICHÓN et al., 2015, SANTADINO et al., 2015), no Chile (MEDINA-MUÑOZ et al., 2015) e no Uruguai (GONZÁLEZ et al., 2015). Esta dispersão confirmou que *D. suzukii* é capaz de se espalhar a uma distância cerca de 1,6 km / dia no Brasil (FERRONATO et al., 2019), e modelos matemáticos indicaram outras áreas com potenciais de estabelecimento da *D. suzukii* no Brasil (BENITO et al., 2016).

Quadro 1 – Plantas hospedeiras comerciais confirmadas com a presença de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae).

PLANTAS HOSPEDEIRAS DE <i>Drosophila suzukii</i>		
Família	Nome científico	Nome comum
Actinidaceae	<i>Actinidia chinensis</i> Planch.	kiwi ¹
Ebenaceae	<i>Diospyros kaki</i> L.	caqui ¹
Ericaceae	<i>Vaccinium</i> spp.	mirtilo ¹
Moraceae	<i>Ficus carica</i> L.	figo ¹
	<i>Morus</i> spp.	amora ¹
Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i> L.	pitanga ¹
	<i>Plinia cauliflora</i> (Mart.) Kausel	jabuticaba ¹
	<i>Psidium cattleianum</i> Sabine	araçá ¹
	<i>Psidium guajava</i> L.	goiaba ¹
Rosaceae	<i>Eriobotrya japonica</i> (Thumb.) Lindley	nêspera ¹
	<i>Fragaria × ananassa</i> Duchesne	morango ²
	<i>Malus domestica</i> L.	maça ¹
	<i>Prunus armeniaca</i> L.	damasco ¹
	<i>Prunus avium</i> L.	cereja ¹
	<i>Pyrus communis</i> L.	pera ¹
	<i>Prunus domestica</i> L.	ameixa-européia ¹
	<i>Prunus persica</i> L.	pêssego ³
Rutaceae	<i>Citrus</i> spp.	laranja ⁴
Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i> L.	uva ⁵

Fontes: ANDREAZZA et al. (2017a)¹, BERNARDI et al. (2017a)², ANDREAZZA et al. (2017b)³, WALSH et al. (2011)⁴, ANDREAZZA et al. (2016b)⁵.

Drosophila suzukii causa perdas elevadas de produção das frutas com epiderme delgada porque as fêmeas põem ovos em hospedeiros maduros e saudáveis antes da colheita (WALSH et al., 2011; CINI et al., 2012). Suas larvas destroem a polpa dos frutos, acelerando o amolecimento e queda. Adicionalmente, a punção na epiderme dos frutos ocasionada pela oviposição facilita infecções por patógenos, e as liberações de compostos orgânicos voláteis

pelos fermentos constituem a atração a outras espécies de drosofilídeos (BERNARDI et al., 2017). As perdas na produção de cerejeiras e morangos foram documentadas na América (DREVES e RHODALACK, 2011; GOODHUE et al., 2011; SANTOS, 2014; FARNSWORTH et al., 2017) e Europa (DE ROS et al., 2015). No Brasil, os produtores relataram perdas na produção de morango de até 30% (SANTOS et al., 2014). Enquanto que, nos Estados Unidos as perdas na produção de pequenas frutas corresponderam até US\$ 511 milhões anualmente (GOODHUE et al., 2011), sem contabilizar os custos adicionais gerados pelo monitoramento e pelo controle necessário para prevenir infestações primárias (DREVES, 2011; GOODHUE et al., 2011; LEE et al., 2011).

Pela recente história de *D. suzukii* como praga primária no Brasil inexistem inseticidas sintéticos registrados para seu manejo. Entretanto, em países onde a praga já está estabelecida, como Estados Unidos (BEERS et al., 2011) e Japão (KAWASE et al., 2008), são utilizados para seu controle os ingredientes ativos piretróides, organofosforados e espinosinas (BRUCK et al., 2011). Todavia, já existem relatos da resistência de *D. suzukii* à espinosina nos Estados Unidos (GRESS e ZALOM, 2018). Além disso, muitos cultivos de pequenas frutas no Brasil, como amora (*Rubus fruticosus* L.) framboesa (*Rubus idaeus* L.), mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.), morangos (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne), uva (*Vitis vinifera* L.), são caracterizados por serem produzidos em pequenas propriedades de cultivo orgânico ou de baixo resíduo, nas quais o uso de substâncias sintéticas é proibido ou restrito (ZANARDI et al., 2015). Por outro lado, esses sistemas de cultivo possuem uma grande biodiversidade de inimigos naturais, como exemplo, *Trichopria anastrephae* (Lima, 1940) (Hymenoptera: Diapriidae) que foi recentemente registrada parasitando pupas de *D. suzukii* em morangueiros no Brasil (WOLLMANN et al., 2016; ANDREAZZA et al., 2017).

A ocorrência dessa espécie em áreas de produção de pequenas frutas é um indicativo do seu estabelecimento em campo (WOLLMANN et al., 2016). Além disso, a criação massal de *T. anastrephae* usando pupários de *D. suzukii* como hospedeiro, em condições de laboratório mostrou ser promissora (VIEIRA et al., 2019). Neste sentido, a utilização de plantas consideradas fitoinseticidas também se mostram como uma alternativa potencial ao controle convencional, uma vez que, já foram identificadas mais de 2.000 espécies botânicas de interesse fitossanitário (SALAZAR, 1997), além de mais de 800 espécies de pragas controladas por produtos de origem vegetal (GRAINGER e AHMED, 1988). Sendo assim, o controle racional de insetos-praga por meio de inimigos naturais aliado à utilização de bioinseticidas se revelam capazes de regular as pragas em seu ambiente natural, reduzindo a densidade das populações e, conseqüentemente, os danos às plantas hospedeiras (FRITZ et

al., 2008). O uso de extratos de *Annona mucosa* Jacq. controlaram *D. suzukii*, e, sobretudo mostraram baixa toxicidade ao parasitóide pupal *T. anastrephae* em condições de laboratório (BERNARDI et al. 2017b). Contudo, a quantificação destes efeitos nos locais onde a *D. suzukii* foi recentemente registrada atacando pomares de frutas, como no estado do Paraná, ainda é desconhecida.

1.1 JUSTIFICATIVA

Com a redução da cobertura vegetal do bioma Mata Atlântica pelas ações antrópicas, muitas espécies nativas com possível potencial inseticida correm o risco de desaparecer sem nenhum tipo de registro. Ademais, verificar os OEs das espécies que já são cultivadas e comercializadas no Brasil, como *Rosmarinus officinalis* L., também podem auxiliar na escolha de estratégias de controle da *D. suzukii*, pois estas moléculas estão disponíveis no mercado e podem ser adquiridas facilmente pelos fruticultores. Por outro lado, não existem princípios ativos autorizados para o controle da *D. suzukii* no Brasil, remetendo assim, a necessidade de pesquisas com produtos alternativos e de baixo residual nos frutos, a exemplo dos OEs. Embora, os inseticidas sintéticos sejam as medidas mais eficazes onde a *D. suzukii* já se encontra estabelecida, como nos Estados Unidos, seu uso indiscriminado selecionou populações resistentes de moscas (GRESS e ZALOM, 2018). Considerando a importância da *T. anastrephae* no controle biológico de *D. suzukii*, também é necessária à busca por produtos seletivos ao seu parasitóide pupal. Assim, essa tese tem como proposta avaliar o potencial dos OEs no controle de *D. suzukii*, e verificar a toxicidade dessas moléculas ao seu endoparasitóide pupal *T. anastrephae*.

Para isso, os resultados desta tese serão divididos em três capítulos. No primeiro capítulo serão relatadas informações sobre sete espécies do gênero *Baccharis* (*B. anomala* DC.; *B. calvescens* DC.; *B. mesoneura* DC.; *B. milleflora* DC.; *B. oblongifolia* Pers.; *B. trimera* (Less) DC.; *B. uncinella* DC.) e seu potencial para uso no controle de adultos e imaturos da *D. suzukii*. No segundo, serão fornecidas informações sobre a composição química de cinco espécies do gênero *Piper* (*P. aduncum* L.; *P. crassinervium* Kunth; *P. malacophyllum* Pries; *P. gaudichadianum* Kunth; *P. marginatum* L.), e sobre sua toxicidade sobre adultos de *D. suzukii* e *T. anastrephae*. O terceiro capítulo será utilizado para demonstrar o efeito de três ecótipos de *R. officinalis* cultivados no Brasil, como uma estratégia para o Manejo Integrado de *D. suzukii*, bem como a seletividade desses OEs a *T. anastrephae*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial inseticida dos OEs de espécies vegetais aromáticas nativas e/ou cultivadas no Brasil para o controle de *D. suzukii*, bem como avaliar a seletividade ao seu parasitoide pupal *T. anastrephae*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Analisar a composição química das folhas de *Baccharis* (*B. anomala*, *B. calvescens*, *B. mesoneura*, *B. milleflora*, *B. oblongifolia*, *B. trimera* e *B. uncinella*), *Piper* (*P. aduncum*, *P. crassinervium*, *P. malacophyllum*, *P. gaudichadianum* e *P. marginatum*), e dos ecótipos de *Rosmarinus officinalis*; por meio da cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (CG-EM);
- Investigar a toxicidade letal dos produtos para *D. suzukii* por métodos de ingestão e aplicação tópica;
- Avaliar os efeitos dos constituintes majoritários individuais encontrados nas espécies de *Baccharis* spp. (e.g., limoneno) e de *R. officinalis* (e.g., α -pineno, cânfora e 1,8-cineol).
- Testar os efeitos dos resíduos secos no comportamento de oviposição de *D. suzukii* em “frutos artificiais”, avaliando o número e a viabilidade dos ovos;
- Verificar a toxicidade dos OEs supracitados ao inimigo natural de *D. suzukii*, *T. anastrephae*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROSPECÇÃO DE PLANTAS AROMÁTICAS INSETICIDAS

A prospecção é originalmente definida como a exploração da biodiversidade para a obtenção de recursos genéticos e bioquímicos para futura comercialização (REID et al., 1993). Essa coleta de material biológico e o acesso ao recurso genético visa a busca de novos produtos para os setores da agricultura, alimentação, bebidas, cosmética e fitomedicamentos (SANTILLI et al., 2004). Em sua versão mais moderna a prospecção é conceituada como a exploração de material biológico encontrado na natureza com fins de comercializar os recursos genéticos e propriedades bioquímicas (LAIRD e WYNBERG, 2008) ou através da busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos em geral, que possam ter um potencial econômico e, eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto (SACCARO-JUNIOR, 2011).

Os primeiros relatos para incentivo das atividades prospectivas da biodiversidade datam da industrialização e das guerras mundiais, quando foram divulgados dados alarmantes sobre o uso degradante e excessivo da biodiversidade. Neste cenário, também se configuravam as agências de créditos e multinacionais que abusavam das políticas neoliberais de privatização (VOGEL, 1994). Com isso agências ambientais e governamentais solicitaram uma resposta em nível internacional para que esses bens naturais fossem utilizados de maneira sustentável (PALMA e PALMA, 2012).

A oficialização mundial das maneiras e formas de realizar a prospecção alcançou maior clareza entres os diferentes países envolvidos através da Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) realizada na Cúpula da Terra no Rio de Janeiro em 1992 (PEREIRA e LIMA, 2008). Com a entrada em vigor da CDB, a liberdade de acesso aos recursos biológicos foi substituída por um reconhecimento dos direitos soberanos de cada país para controlar o acesso à biodiversidade existente dentro de suas fronteiras (ARTUSO, 2002). Assim, no Brasil, as atividades prospectivas foram documentadas no dia 23 de agosto de 2001, por meio do capítulo II, artigo 7º, inciso VII da Medida Provisória nº 2.186-16/2001, como a “atividade exploratória que visa identificar componente do patrimônio genético e informação sobre conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial” (BRASIL, 2001). Estas evidências observadas devem estimular o debate, sobretudo nos países em desenvolvimento e detentores de rica biodiversidade e de conhecimentos tradicionais, como é o caso do Brasil,

sobre as oportunidades econômicas que o uso ético da biodiversidade apresenta (CUNHA et al., 2008).

O constante interesse mundial por produtos derivados da biodiversidade (FUNARI e FERRO, 2005) abre oportunidades para o Brasil devido a vasta riqueza da flora brasileira que concedeu ao país o ranking com a maior diversidade genética vegetal do mundo com 45.976 espécies diferentes catalogadas (REFLORA, 2020). No bioma Mata Atlântica são encontradas o maior número de espécies vegetais entre os biomas brasileiros, com mais de 19.000 espécies descritas, das quais mais de 7.600 são endêmicas (FORZZA et al., 2012). Entre os princípios ativos dos vegetais a serem isolados da Mata Atlântica visando a aplicação econômica no controle de artrópodes-praga, destacam-se os OEs, que estão presentes nas chamadas plantas aromáticas (SOUZA, 2015).

Os OEs possuem naturalmente substâncias com um amplo espectro de atividade contra insetos, que variam de acordo com os seus componentes em ação inseticida, inibição da oviposição, regulação do crescimento, deterrentes ou repelentes (ISMAN, 2000). Muitos desses produtos interferem na atividade da acetilcolinesterase (AChE), uma enzima responsável pelas conexões neurais e neuromusculares dos artrópodes (SILVA et al., 2017). Essa inibição da ação da AChE resulta no acúmulo de acetilcolina na sinapse, causando hiperexcitabilidade dos nervos motores e conseqüentemente convulsão e paralisia nos insetos (ČOLOVIĆ et al., 2013; LIONETTO et al., 2013; RAJASHEKAR et al., 2014). Outros modos de ação dos OEs também incluem alteração no sistema nervoso octopaminérgico dos insetos, ligando-se a seus receptores e aumentando o estado de excitação dos insetos, algo que não ocorre com mamíferos ou outros animais, sendo mais seguro para humanos (JANKOWSKA et al., 2017). Como exemplo de toxicidade pode-se citar a atividade inseticida dos OEs contra adultos de *D. suzukii* (ERLAND et al., 2015; KIM et al., 2016; PARK et al., 2016; RENKEMA et al., 2016; PARK et al., 2016), esses trabalhos também descrevem a atuação dos constituintes majoritários no controle das moscas.

2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

No reino vegetal, as plantas possuem a capacidade de produzir suas próprias defesas contra artrópodes, microorganismos e outros predadores herbívoros, auxiliando sua sobrevivência e perpetuação. Isso leva as plantas a produzirem, metabolizarem e acumularem compostos orgânicos, por meio de uma rede integrada de reações químicas, chamada de metabólitos secundários ou produtos secundários. Esses metabólitos podem ser divididos em

três diferentes grupos devido a sua constituição química: terpenos, substâncias fenólicas e compostos nitrogenados. Os constituintes químicos dos óleos essenciais são derivados principalmente de três vias biossintéticas: via do mevalonato levando a sesquiterpenos (C_{15}) e triterpenos (C_{30}) que ocorre no citosol e cujos precursores são piruvato e acetil-coA; o precursor metileritritol fosfato (MEP) caminho para monoterpénos (C_{10}), diterpenos (C_{20}) e tetraterpenos (C_{40}), ocorre nos plastídeos e cujos precursores são piruvato e gliceraldeído-3-fosfato; rota do ácido chiquímico em que este origina o aminoácido aromático fenilalanina, que pela ação da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) origina o ácido cinâmico, que por meio de reduções enzimáticas dá origem aos alilbenzenos e propenilbenzenos, esqueletos carbônicos dos fenilpropanóides (BASER e BUCHBAUER, 2012).

2.2.1 Terpenos: óleos essenciais

Conforme a International Organization for Standardization (ISO 9325, 2013) os OEs que são “produtos obtidos a partir de uma matéria-prima natural, de origem vegetal, por meio de destilação a vapor, bem como os produtos obtidos por processamento mecânicos dos pericarpos de frutos cítricos, ou por destilação seca, após a separação da fase aquosa – se houver – por processos físicos”. São armazenados em estruturas secretoras internas (células parenquimáticas diferenciadas, idioblastos, bolsas esquizógenas ou lisígenas e canais oleíferos) e externas (tricomas glandulares) (BIASI e DESCHAMPS, 2009) que podem estar distribuídos por toda a planta ou em algum órgão específico, como raízes, rizomas, cascas, folhas, flores, frutos e sementes (BIZZO et al., 2009).

A maioria dos OEs possui a via biossintética do mevalonato. Geralmente sua síntese se inicia por meio da condensação de uma molécula de acetoacetil-CoA com o acetil-CoA, seguida de uma hidrólise que leva à formação do 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Tal composto, por meio da atividade enzimática da HMG-CoA redutase origina a molécula do mevalonato. Essas moléculas de mevalonato são rearranjadas por uma série de reações enzimáticas a um composto conhecido como isopentenil-pirofosfato (IPP) ou simplesmente isopreno. O IPP é uma molécula ramificada de cinco átomos de carbono ligada a dois grupos fosfato. Essas unidades de cinco carbonos são o ponto de partida para a formação dos terpenos. Assim, o IPP dará origem a todos os outros terpenos (TAIZ e ZEIGER, 2009). Eles podem ser classificados conforme o número de unidades de isoprenos (C_5H_8)_n dos quais são biogeneticamente derivados em: hemiterpenóides, monoterpénóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, tetraterpenóides e politerpenóides. Portanto, hemi-, mono-,

sesqui- e diterpenos contêm 1, 2, 3 e 4 unidades isoprenos, respectivamente (THORMAR, 2011).

2.2.2 Importância econômica dos óleos essenciais

O mercado mundial de OEs gira em torno de US\$ 15 bilhões/ano, com crescimento anual próximo de 11% (BIZZO et al., 2009), sendo produzidos 40.000 a 60.000 toneladas por ano (DJILANI e DICKO, 2012). Existem cerca de 300 óleos essenciais de importância comercial no mundo. Os maiores consumidores mundiais são os Estados Unidos (40%), União Européia (30%) e do Japão (7%) (BIZZO et al., 2009). O Brasil configura como sexto exportador em nível mundial de OE, especialmente de cítricos e os seus derivados terpênicos devido o favorecimento da citricultura no país, principalmente no estado de São Paulo (ITC/ TRADEMAP, 2011). Estas estatísticas também apontam o Brasil como importador de óleo essencial, num nível de 1,9% de um total mundial de US\$ 2.968 milhão (ITC/ TRADEMAP, 2011).

O consumo de óleo essencial no Brasil é destinado para a fabricação de produtos de higiene, limpeza, perfumaria e cosméticos, com um aumento de R\$ 4,9 bilhões em 1996 para R\$ 38 bilhões em 2013 (ABIHPEC, 2014). Para Bandoni e Czepak (2008) os setores que mais utilizam os OEs são: *i*) indústria alimentícia, para a elaboração de sabores, aditivos e bebidas; *ii*) indústria de cosméticos, para desodorantes, sabonetes e fragrâncias; *iii*) indústrias farmacêuticas; *iv*) produtos veterinários, como repelentes de insetos (citronela), piolhida (limoneno e menta) e como medicamentos para o controle de doenças (alecrim, tomilho e menta).

É crescente o número de pesquisas com o uso do OEs na agricultura e na veterinária (YUNES et al., 2012). Assim, ao considerar a biodiversidade brasileira de plantas nativas e cultivadas e os poucos estudos sobre a fitoquímica das plantas aromáticas projeta-se um enorme potencial do País para a prospecção de metabólicos secundários bioativos para insetos-praga (CARVALHO et al., 2017).

2.3 *Drosophila suzukii* (MATSUMURA) (DIPTERA: DROSOPHILIDAE)

Drosophila suzukii é um inseto-praga, comumente conhecido por Drosófila-da-Asa-Manchada (DAM). A família Drosophilidae, a qual pertence, possui mais de 4.000 espécies

distribuídas em todo o mundo e o gênero *Drosophila* é o mais abundante, com aproximadamente 1.700 espécies conhecidas (BÄCHLI, 2015).

Drosophila suzukii está inserida no subgênero Sophophora, grupo Melanogaster, com 170 espécies descritas, que estão incluídas em cinco subgrupos: *melanogaster*, *montium*, *takahashii*, *ananassae* e *suzukii*. Para o subgrupo *suzukii*, análises moleculares evidenciaram que suas espécies se misturam nas filogenias apresentadas com as dos subgrupos *elegans*, *eugracilis*, *melanogaster* e *takahashii* formando um grande clado denominado de “espécies orientais” (DA LAGE et al., 2007).

Em 1931, *D. suzukii* foi descrita por Matsumura no Japão, porém em 1916, antes de sua descrição, já havia um registro feito por Kansawa em plantios de cerejeiras. Provavelmente, o subgrupo *suzukii* se originou no sudoeste asiático, onde *D. suzukii* era endêmica, ocorrendo em muitos países asiáticos, como China, Taiwan, Coreia do Norte, Coreia do Sul, Paquistão, Mianmar, Tailândia, Rússia e Índia (CINI et al., 2012). Contudo, as origens precisas deste inseto ainda não foram elucidadas, já que os pesquisadores não puderam identificar se esta espécie é nativa do Japão ou se foi acidentalmente introduzida na virada do século passado (Figura 2.1) (HAUSER, 2011; CINI et al., 2012).

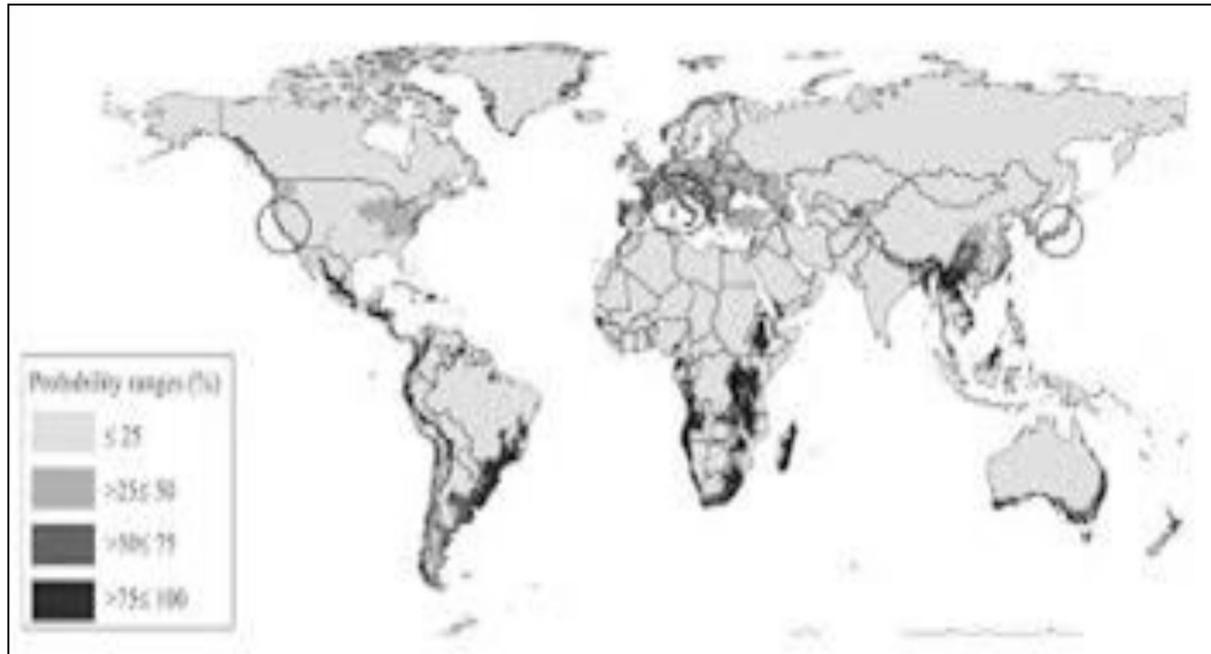


Figura 2-1- Distribuição geográfica de *Drosophila suzukii* em todo o mundo. As áreas círculos são regiões onde *D. suzukii* foram registradas pela primeira vez. EUA, de acordo com Walsh et al. (2011); Europa, Cini et al. (2012); e Japão, Mitsui et al. (2006).

Fonte: Benito et al. (2016)

O primeiro registro dessa espécie fora da Ásia ocorreu em 1980, em Oahu, no Haváí e, mais tarde, em outras ilhas havaianas (HAUSER, 2011). Em 1997, foi relatado na Costa Rica e, em 1998, sua presença foi constatada em coleções entomológicas no Equador. No entanto, em relação a essas entradas não existem informações sobre danos econômicos associados (HAUSER, 2011).

Em 2008, *D. suzukii* foi coletado pela primeira vez nos Estados Unidos no estado da Califórnia, enquanto no ano de 2009 teve um aumento no número de ocorrências de *D. suzukii* em diferentes culturas, espalhando para os estados de Oregon, Washington e Flórida (DREVES e RHODALACK, 2011). No mesmo período, ocorrências de *D. suzukii* foram registradas também na Columbia Britânica, Canadá (HAUSER, 2011; CINI et al., 2012).

Grandes infestações de *D. suzukii* foram verificadas no Vale de Santa Clara, e de Yolo para Stanislaus, as quais ocasionaram grandes perdas em pomares de pequenas frutas (WALSH et al., 2011). Em 2010, *D. suzukii* foi registrada em outros estados dos EUA, como Utah, Louisiana, Carolina do Norte, Carolina do Sul, Wisconsin, Michigan, Alberta e no Canadá foi relatada em Manitoba, Ontário e Quebec (HAUSER, 2011).

Simultaneamente ao aparecimento de *D. suzukii* no Estados Unidos houve os primeiros registros de ocorrência da praga na Europa, em Rasquera, província de Tarragona, Espanha (HAUSER, 2011; CINI et al., 2012) e San Giuliano Terme, Toscana, Itália (CALABRIA et al., 2011) com ataques registrados em frutas nativas de *Vaccinium*, *Fragaria* e *Rubus* spp., juntamente com os primeiros registros de danos econômicos severos a diferentes espécies de cerejas cultivadas (GOODHUE et al., 2011). Em 2009, adultos de *D. suzukii* foram capturados em armadilhas em outras regiões de Espanha (Ballaterra, perto de Barcelona), França (Montpellier e Alpes Maritimes) e Itália (Trentino). Nos anos de 2010 e 2011, essa praga dispersou-se para outros países como Alemanha, Áustria, Bélgica, Croácia, Eslovênia e Suíça (CINI et al., 2012).

Os primeiros registros na América do Sul foram feitos por meio de armadilhas com ingredientes ativos de bananas em área de vegetação arbórea pertencente a Mata Atlântica, entre fevereiro e maio de 2013, no Sul do Brasil. As coletas foram realizadas nos municípios de Botuverá e Nova Veneza, estado de Santa Catarina; e em Osório, Vila Maria e Erechim, municípios do Rio Grande do Sul (DEPRÁ et al., 2014). Posteriormente foi coletada em armadilhas em morangueiros no município de Vacaria, Rio Grande do Sul (SANTOS, 2014). Neste relato, também se deu o primeiro registro de danos causados por este inseto-praga no Brasil (SANTOS, 2014).

Em 2014, a presença dessa espécie foi relatada em São Paulo, através de análises de frutas oriundas de outras regiões (São Joaquim, Santa Catarina e Chile) (Vilela e Mori, 2014). Atualmente, *D. suzukii* já foi encontrada nos estados brasileiros do Espírito Santo (ZANUNCIO-JUNIOR et al., 2018), Goiás (PAULA et al., 2014), Minas Gerais (ANDREAZZA et al. 2016a), Paraná (GEISLER et al., 2015), Rio de Janeiro (BITNER-MATHÉ et al 2014) e São Paulo (VILELA e MORI, 2014). Além do Brasil, *D. suzukii* também foi registrada até o momento na Argentina (CICHÓN et al., 2015, SANTADINO et al., 2015), no Chile (MEDINA-MUÑOZ et al., 2015) e no Uruguai (GONZÁLEZ et al., 2015).

2.3.1 Descrição morfológica de *Drosophila suzukii*

Os adultos de *D. suzukii* caracterizam-se por apresentar tamanhos diferentes, sendo os machos menores que as fêmeas, medindo aproximadamente 3 e 4 mm de comprimento, respectivamente (NAVA et al., 2015). Eles possuem olhos vermelhos, três ocelos, antenas aristas ramificadas e tórax de cor castanho pálido ou amarelado, com faixas longitudinais pretas no abdômen (FUNES et al., 2018). Os machos desta espécie são facilmente distinguíveis, pois apresentam uma mancha preta no ápice das duas asas (REVADI et al., 2015) (Figura 2-2 A). No entanto, eles podem apresentar uma linha de cerdas no primeiro e segundo segmento tarsal, no primeiro par de pernas (SCHLESENER et al., 2017).

Os machos de *D. suzukii* e de *Drosophila subpulchrella* (Diptera: Drosophilidae) apresentam características morfológicas semelhantes com a presença de uma mancha escura na margem distal das asas (ATALLAH et al., 2014) (Figura 2-2 C). Ressalta-se, também, que as manchas nas asas dos machos começam a se desenvolver 10 h após a emergência do adulto, tornando-se completamente visível dentro de 48 h (WALSH et al., 2011).

As fêmeas adultas medem uma média de 2,5 a 4,0 mm em comprimento, não possuem manchas nas asas, e apresentam ovipositor duplamente serrilhado e estreito, com um conjunto de dentes robustos esclerotizados (Figura 2-2 B). Além disso, o tamanho do ovipositor é de seis a sete vezes maior do que a espermateca, enquanto na maioria das espécies esta proporção é de apenas duas a quatro vezes maior (Figura 2-2 D) (WALSH et al., 2011; ANFORA et al., 2012; DAFF, 2013).

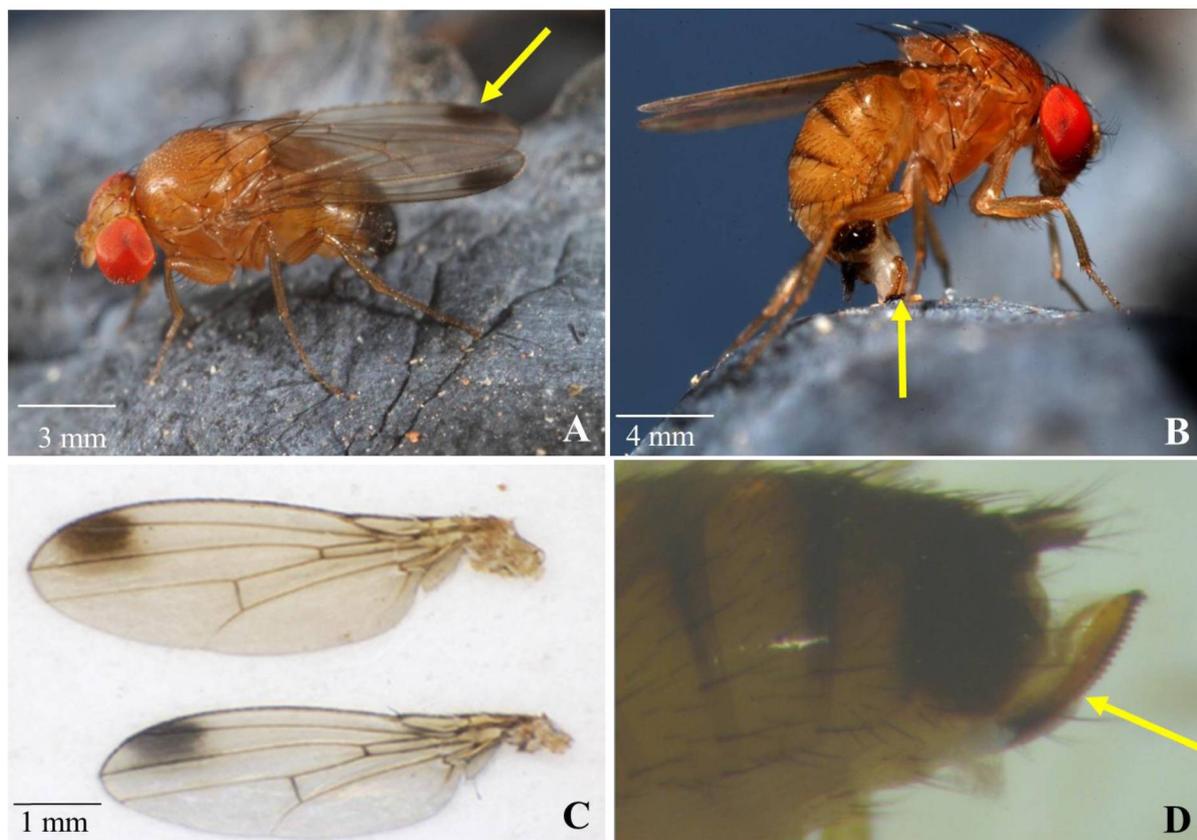


Figura 2-2- Macho e fêmea de *Drosophila suzukii*. O macho possui mancha escura na margem distal das asas (A). A fêmea possui aparelho ovipositor serrelhado esclerotinado (B). Detalhe das manchas dos machos na asa distal (C) e Detalhe do ovipositor das fêmeas (D).

Foto: Paulo Lanzetta

Os ovos medem em média $0,62 \times 0,18$ mm; com coloração semitransparente, branco brilhante (Figura 2-3 A). Apresentam dois filamentos na porção terminal em uma extremidade, medindo $0,65$ mm em média, e são as estruturas responsáveis pela respiração (KANSAWA, 1939) (Figura 2-3 B). Contudo, *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) também possui dois filamentos na porção terminal dos ovos, embora esta característica possa ajudar a identificação de *D. suzukii*, uma vez que a maioria das espécies apresenta quatro ou mais filamentos respiratórios (WALSH et al., 2011; DAFF, 2013).

Os drosofilídeos geralmente apresentam três estádios larvais. O tamanho médio (comprimento \times largura) das larvas é de $0,67 \times 0,17$ mm no primeiro instar, $2,13 \times 0,40$ mm no segundo instar, e $3,94 \times 0,88$ mm pelo terceiro instar (Figura 2-4) (WALSH et al., 2011). Logo após a eclosão, as larvas apresentam coloração branca, com órgãos internos visíveis e

partes bucais com coloração escura. Os ductos respiratórios evoluem de inconspícuas no primeiro ínstar larval, para ramificadas e abertas para o exterior no terceiro ínstar (Figura 2-4) (WALSH et al., 2011).

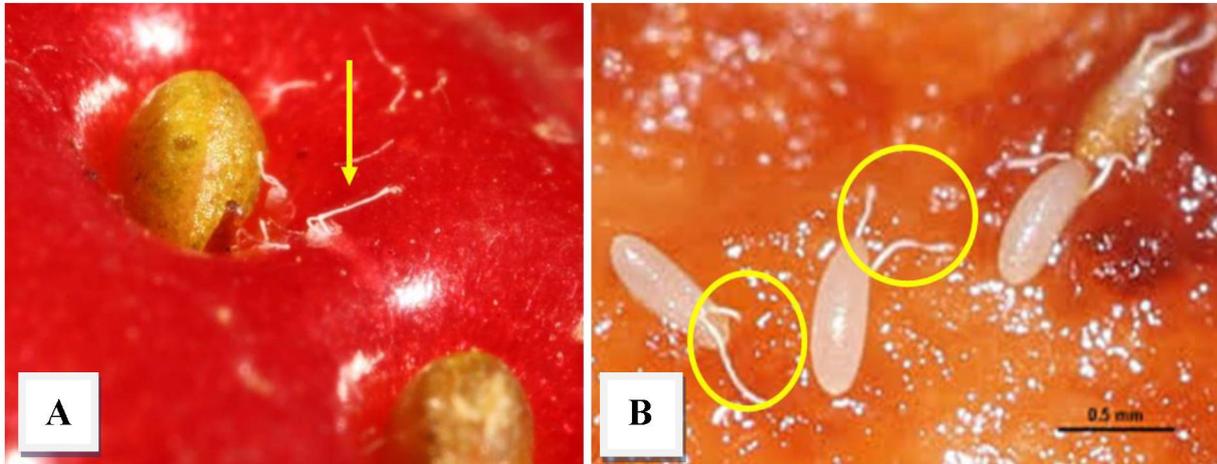


Figura 2-3- Ovos de *Drosophila suzukii* em frutos de morangos e seta indicando os espiráculos respiratórios (A). Detalhes mostrando os dois tubos respiratórios subapicais nos ovos (B).

Foto: Paulo Lanzetta

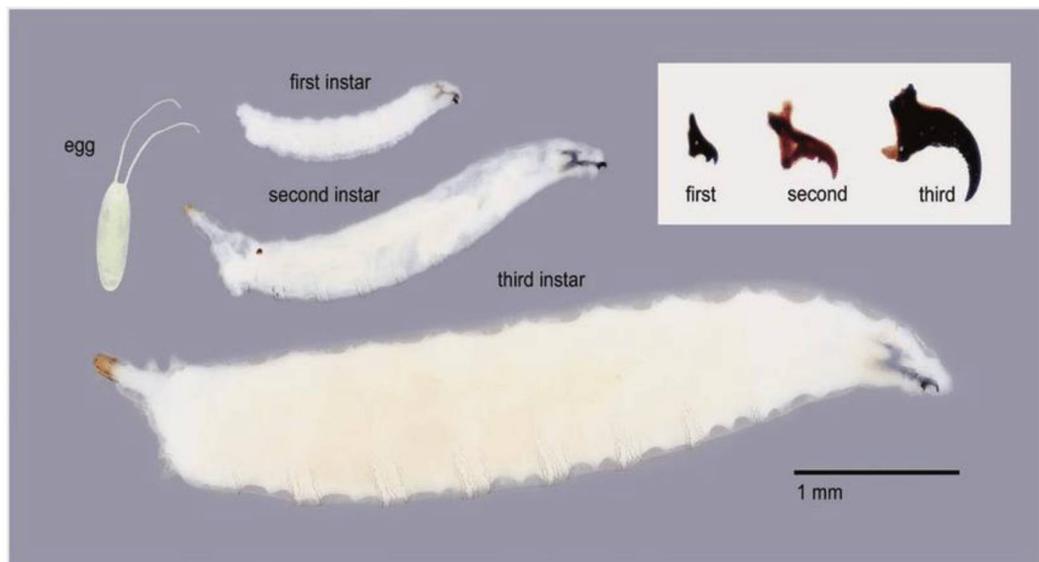


Figura 2-4- Ovo de *Drosophila suzukii*, ínstaes e ganchos de boca.

Fonte: Timmeren et al. (2017)

Pupas masculinas são geralmente menores que as das fêmeas, em média $2,90 \times 0,99$ mm para machos e $3,18 \times 1,06$ mm para fêmeas (Figura 2-5 A). As pupas apresentam dois alongamentos em uma das porções terminais, resquícios dos filamentos respiratórios encontrados nas larvas. As pupas apresentam inicialmente uma coloração amarelada acinzentada, com consistência macia. Mais tarde, elas se endurecem e ficam com tonalidade castanha (Figura 2-5 B) (WALSH et al., 2011; DAFF, 2013).

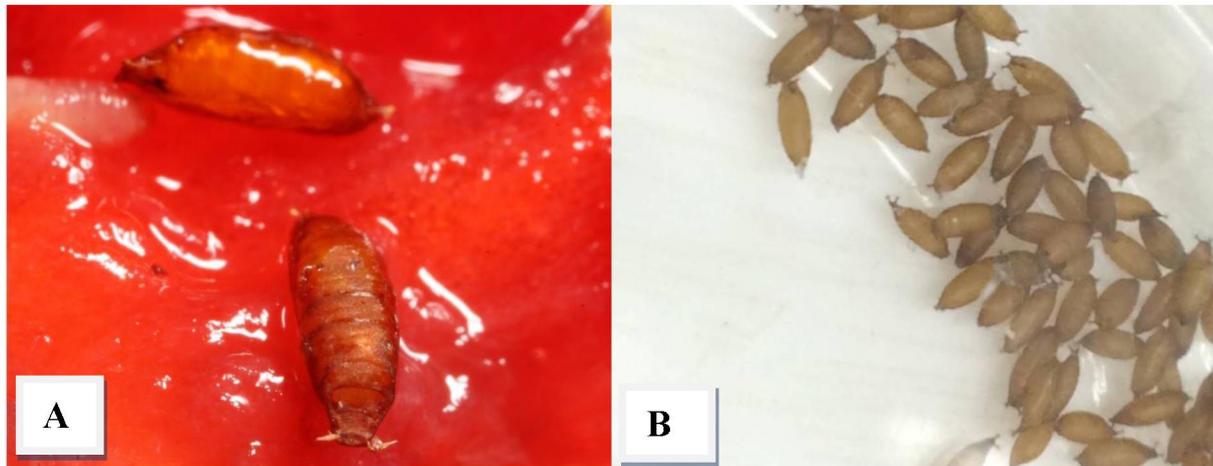


Figura 2-5- Pupas de *Drosophila suzukii* em frutos de morangos (A) e pupas com tonalidade castanhas (B) .

Foto: Paulo Lanzetta

2.3.2 Bioecologia de *Drosophila suzukii*

As fêmeas alcançam a maturidade sexual em um ou quatro dias em condições favoráveis de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) (REVADI et al., 2015). O período de pré-oviposição dura de 7 a 8 dias, após as mesmas podem ovipositar por 53 a 54 dias (SCHLESENER et al., 2018). Em condições controladas de $23 \pm 2^\circ\text{C}$; $70 \pm 10\%$ U.R, e fotoperíodo de 12:12 (claro:escuro) uma fêmea de *D. suzukii* pode colocar 570–630 ovos durante sua vida e longevidade média dos adultos 116–129 dias (SCHLESENER et al., 2018). Assim que emergem, os adultos tornam-se sexualmente ativos em um a quatro dias (REVADI et al., 2015) e a razão sexual é de 0,5 (SCHLESENER et al., 2018). O acasalamento dura de 2 minutos à 1:25 horas, sendo em média de 26 minutos (REVADI et al., 2015).

O desenvolvimento de ovo para adultos pode demorar 12 dias, com capacidade de gerar até 12 gerações anuais em $23 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm \text{U.R.}$, e fotoperíodo de 12: 12 (claro: escuro) (SCHLESENER et al., 2018) (Figura 2-6).

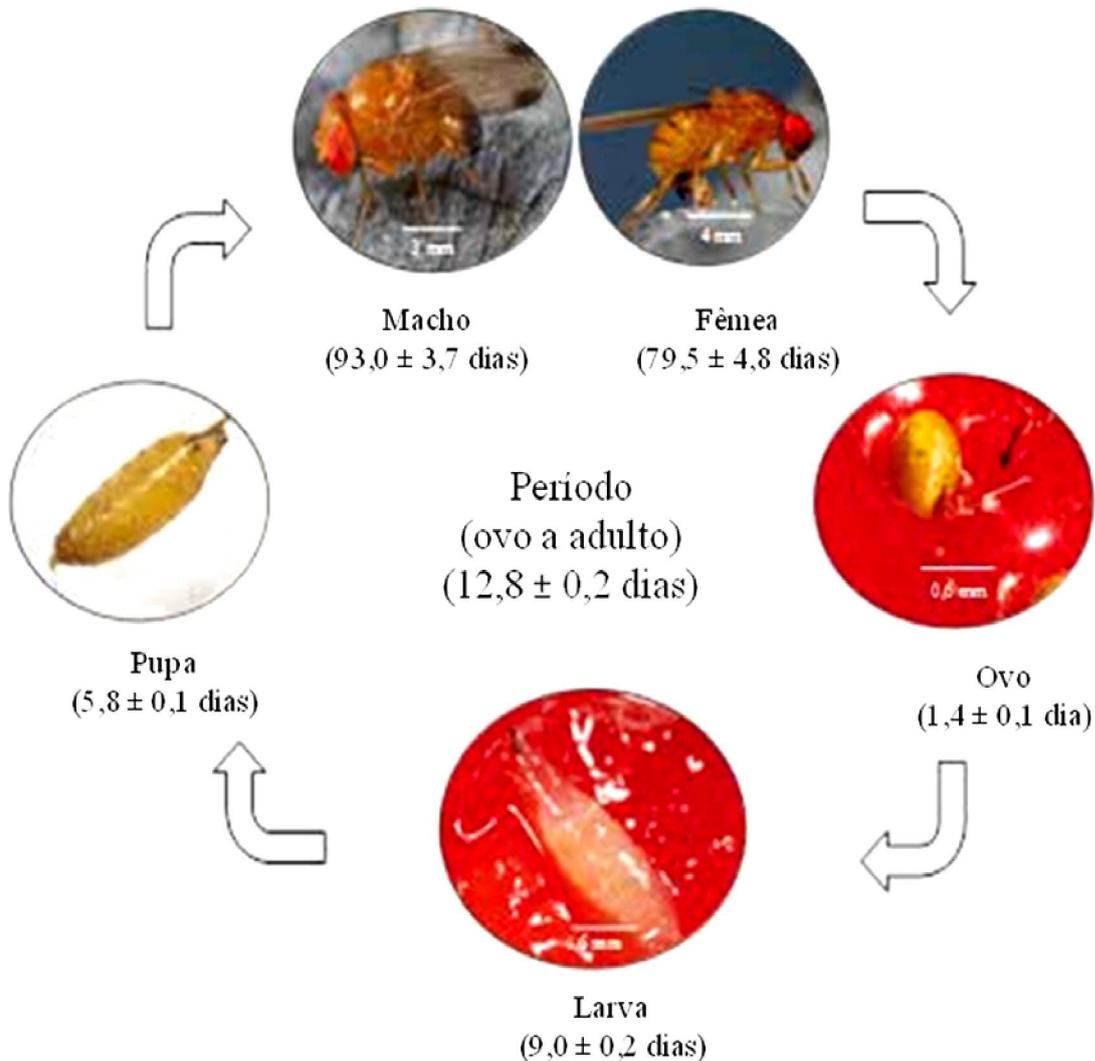


Figura 2-6- Ciclo de vida de *Drosophila suzukii* em condições de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm \text{U.R.}$, e fotoperíodo de 12: 12 (claro: escuro)

Foto: Paulo Lanzetta

2.3.3 Efeitos das condições climáticas no desenvolvimento de *Drosophila suzukii*

Embora *D. suzukii* apresente uma menor tolerância ao clima frio do que outros drosofilídeos, ela possui mecanismos de hibernação quando na fase adulta (KANSAWA, 1939; KIMURA, 2004). Sob temperaturas inferiores a 5°C , os indivíduos recém-emergidos

não amadurecem sexualmente e os adultos sexualmente maduros entram em diapausa. Quando as temperaturas se tornam favoráveis, eles retomam suas atividades. As fêmeas ovipositam centenas de ovos antes dos períodos frios e então entram em diapausa, podendo sobreviver nesse estado por até 200 dias (KANSAWA, 1939).

Em um trabalho desenvolvido no Japão, em cerejeiras, foi observado que os adultos entraram em diapausa durante o inverno e recuperaram suas atividades nos meses de abril e maio, assim que as condições climáticas se tornaram mais favoráveis (KANSAWA, 1939). Entretanto, este processo de diapausa em *D. suzukii* ainda não está totalmente elucidado. Não sabe se este processo é mediado por mudanças fisiológicas ou comportamentais; embora acredita-se que essa capacidade tende a se desenvolver através de processos de migração para áreas de altitude elevada, por meio de aclimação e/ ou através da busca por abrigo em locais de refúgios naturais ou proporcionados pelos humanos (ANFORA et al., 2012; DAFF, 2013).

A capacidade de suportar uma ampla faixa de temperatura é uma característica relevante e de extrema importância à sua adaptabilidade. As temperaturas mais favoráveis ao desenvolvimento de *D. suzukii* vão de 20 a 25 °C (EMILJANOWICZ et al., 2014), embora 28,1 °C tenha sido definida como a temperatura ideal para o desenvolvimento destas drosófilas (TOCHEN et al., 2014).

As temperaturas limites para a reprodução e oviposição são de 10 e 32 °C, e a partir de 30 °C a fertilidade dos machos já é afetada (LEE et al., 2011; ANFORA et al., 2012). Além disso, em temperaturas inferiores a 10 e superiores a 30 °C ocorre à ausência de oviposição (TOCHEN et al., 2014). Quando as temperaturas começam a aumentar, a *D. suzukii* tende a migrar para regiões de maior altitude, coincidindo, dessa maneira, com o decréscimo das populações nas regiões baixas e quentes, durante o solstício de verão (Mitsui et al., 2006). Por outro lado, Anfora et al. (2012) relataram que essa espécie pode ser considerada altamente tolerante às mudanças climáticas, pois é capaz de suportar verões intensos como os da Espanha e invernos extremos, como os das regiões montanhosas do Japão e dos Alpes (LEE et al., 2011).

A maioria dos estudos sobre os efeitos de condições climáticas adversas sobre os drosofilídeos e até mesmo em outros insetos, geralmente são focados em condições extremas de temperatura. Todavia, esses insetos podem ser sujeitos a uma combinação de fatores indesejáveis, como altas temperaturas e dessecação, e as respostas fisiológicas a esses fatores determinarão sua sobrevivência. Esse inseto deve apresentar preferência por altas umidades, uma vez que, existe ausência de relatórios de danos ocasionados em culturas no Mediterrâneo Europeu (HAUSER et al., 2011).

A exposição de espécies do gênero *Drosophila* a condições extremas de umidade e temperatura também podem transmitir uma maior tolerância às condições climáticas adversas. Quando indivíduos de *Drosophila simulans* (Diptera: Drosophilidae) foram expostos por um curto período de tempo a diferentes temperaturas (35, 31 e 18 °C) em combinação com altas e baixas umidades (90 e 20% RU), as moscas, que anteriormente estavam aclimatadas previamente às temperaturas e umidades extremas, foram mais resistentes ao calor e a dessecação quando comparada às demais combinações. O aumento da tolerância a ambos tipos de estresse favorece a aclimação a ambientes mais secos e quentes (BUBLIY et al., 2013). Da mesma forma, foi verificado que o aumento na tolerância a dessecação também confere maior resistência de *D. melanogaster* ao frio (AGGARWAL et al., 2013). Esses dados são preocupantes, pois isso pode propiciar a ocorrência desse inseto pragas em regiões com amplas diferenças de temperaturas no Brasil, como por exemplo, em outros biomas como o cerrado, onde durante o dia apresenta altas temperaturas, e a noite apresentam temperaturas mais baixas (BENITO et al., 2016).

2.3.4 Ecologia de *Drosophila suzukii*

A espécie *D. suzukii* foi descrita em associação com uma série de frutos de tegumento frágeis (DAFF, 2013). Os frutos se tornam suscetível ao ataque desse inseto assim que começam a maturação (LEE et al., 2011).

As fêmeas desta espécie ovipositam preferencialmente dentro de frutas maduras e, ocasionalmente, em frutos parcialmente maduros (LEE et al., 2011). Em um teste de escolha, 11% dos ovos foram colocados sobre cerejas não maduras, 34% ligeiramente maduras cerejas e 55% em cerejas totalmente maduras (KANSAWA, 1939). Quando analisada a porcentagem de emergência em cerejas, a eclosão de apenas 50% dos ovos foi verificada em frutas verdes, 90% em frutas maduras e 100% em frutas totalmente maduras. Apenas 10% dos ovos depositados em frutas em decomposição eclodiram. Vale a pena mencionar que o maior número de ovos foi colocado em frutas maduras (LEE et al., 2011). Da mesma forma, o desenvolvimento larval é maior em frutos maduros do que em outros estágios de amadurecimento (DAFF, 2013).

O desenvolvimento de larvas também é afetado pela acidez e teor de açúcar dos frutos. Este fato foi observado por Malguashca et al. (2010) em uvas, em que os frutos com menor açúcar foram menos atacados e as larvas oriundas de ovos colocados dentro desses frutos não chegaram ao terceiro instar ou morreram no estágio de pupa.

Quando testado em ameixas, pêssegos e cereja foram verificados 20%, 7% e 73% de oviposição, respectivamente, demonstrando a preferência deste inseto por frutos de pele macia (LEE et al., 2011, POYET et al., 2014). A baixa preferência de oviposição em pêssogo foi atribuída à alta pilosidade do fruto, que dificulta o pouso do inseto e a consequente inserção do ovipositor (STEWART et al., 2014).

Foi observado, também, que *D. suzukii* apresenta a oviposição aleatória e não forma um conjunto de ovos dentro das frutas. Porém, a formação de grupos de ovos ocorre eventualmente, quando as fêmeas ovipositam em frutas verdes. Tal evidência sugere que esse drosofilídeo não coexistem com outras espécies, além disso, em altas infestações, é usual que as fêmeas ovipositem apenas um ovo por frutas (MITSUI et al., 2006).

2.4 CONTROLE BIOLÓGICO: PARASITOIDES DE *Drosophila suzukii*

O controle biológico (CB) pode ser definido como um fenômeno natural que consiste na regulação do número de plantas e animais por inimigos naturais, os quais se constituem nos agentes de mortalidade biótica (PARRA, 2002). Desse modo, o CB engloba tanto a introdução quanto a manipulação dos inimigos naturais pelo homem para o controle de pragas (aplicado), bem como o controle sem a intervenção humana (natural) (NAVA, 2007). Em relação a *D. suzukii*, as primeiras experiências com CB testaram a eficácia dos parasitoides *Phaenopria* spp. (Hymenoptera: Diapriidae) em condições de laboratório, no entanto, os resultados foram insatisfatórios (KANZAWA, 1939). Outros estudos mais recentes, no Japão, exploraram a ocorrência de *Asobara japonica* (Hymenoptera: Braconidae) (MITSUI et al., 2007; IDEO et al., 2008), *Asobara tabida* (Hymenoptera: Braconidae) e *Ganaspis xanthopoda* (Hymenoptera: Eucoilidae) (MITSUI et al., 2007). Pesquisas com parasitoides que atacam naturalmente *D. suzukii* na América do Norte ou na Europa geralmente mostram baixos níveis de parasitismo dos parasitoides pupais, *Trichopria drosophilae* (Hymenoptera: Diapriidae) e *Pachycrepoideus vindemiae* (Hymenoptera: Pteromalidae) ou dos parasitoides larvais, *A. japonica*, *Ganaspis brasiliensis* (Hymenoptera: Eucoilidae) e *Leptopilina japonica* (Hymenoptera: Figitidae) (ROSSI STACCONI et al., 2013; GABARRA et al., 2015; MILLER et al., 2015; HAYE et al., 2016; MAZZETTO et al., 2016). No Brasil, espécie de *Leptopilina bouvardi* (Hymenoptera: Figitidae) e *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae) emergiram de frutos de amora e morango coletados em quatro localidades do interior de Pelotas, RS, Brasil, durante a safra 2015/2016 (WOLLMANN et al., 2016). Porém, estudos mais detalhados foram realizados com *T. anastrephae*, nestes trabalhos dados

referentes a biologia do hospedeiro (VIEIRA et al., 2019), competição extrínseca, intraespecífica e privação de hospedeiros na biologia foram avaliados (KRÜGER et al., 2019).

2.4.1 *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae)

Trichopria anastrephae (Lima, 1940) foi originalmente descrita por Costa Lima (1940), emergidas de pupas de *Anastrepha serpentina* e *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae). As fêmeas de *T. anastrephae* depositam seus ovos no hemocele das moscas e suas larvas consomem os tecidos internos das pupas, de onde o adulto emerge (KACSOH e SCHLENKE, 2012). Sua ocorrência foi relatada no Brasil, em São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Goiás (AGUIAR-MENEZES et al., 2001; MARCHIORI e PENTEADO-DIAS, 2001; SILVA et al., 2003; GARCIA e CORSEUIL, 2004; CRUZ et al., 2011) e em outros países da América Latina, como Argentina (TURICA e MALLO, 1961) e Venezuela (BOSCÁN e GODOY, 1996). Recentemente, vespas de *T. anastrephae* foram registradas parasitando pupas de *D. suzukii* (Figura 2-7) em frutos de morangos infestados (WOLLMANN et al., 2016; ANDREAZZA et al., 2017c).



Figura 2-7- *Trichopria anastrephae* parasitando pupas de *Drosophila suzukii*.

Fonte: Paulo Lanzetta.

Como supracitado, no Brasil, a natureza dos trabalhos com *T. anastrephae* em sua maior parte consistem de registros de ocorrência da espécie em diferentes hospedeiros. No entanto, recente foi realizado um estudo onde estabeleceu uma técnica de criação de *T. anastrephae* usando pupas de *D. sukii* como hospedeiro (VIEIRA et al., 2019). Este estudo reportou que a exposição de 15 pupários de um dia de idade, por fêmea durante 24 horas resultou em maior taxa de parasitismo e maior número de parasitóides emergidos. Machos e fêmeas de *T. anastrephae* alimentados com mel puro (100%) ou mel diluído a 50% em água viveram mais tempo em comparação com aqueles alimentados com 10% de mel, sem comida ou apenas água (VIEIRA et al., 2019). Krüger et al. (2019) relataram a competição intraespecífica de *T. anastrephae*, encontrando nas condições avaliadas que o número de cicatrizes de oviposição encontradas em pupários de *D. sukii* aumentou exponencialmente à medida que a densidade de casais de parasitóides também aumentou. Enquanto que, as fêmeas de *T. anastrephae* privadas de hospedeiro por 3 ou 7 dias foram capazes de parasitar uma quantidade de pupas comparável a aqueles que foram fornecidos aos hospedeiros sem privação.

3 ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Baccharis* PODEM SER EFICAZES NO CONTROLE DE *Drosophila suzukii*?

Resumo: A diversificada flora da Mata Atlântica representa um excelente recurso de novas estruturas químicas com atividade inseticida. O objetivo do trabalho foi determinar o potencial de uso dos óleos essenciais (OEs) de sete espécies de *Baccharis* e seu constituinte majoritário limoneno para controlar *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae), uma praga polífaga que ataca frutos de epicarpo delgado. Na concentração discriminatória, ou seja 8% dos OEs, nossos resultados revelaram que *B. calvescens*, *B. mesounera* e *B. oblongifolia* causaram toxicidade a adultos de *D. suzukii* (\cong 95% de mortalidade), o que equivale à mortalidade causada pelo inseticida sintético spinetoram, utilizado como controle positivo. Nos testes realizados com larvas de *D. suzukii* foi observado que os OEs de *B. anomala*, *B. calvescens*, *B. mesounera*, *B. milliflora* e *B. oblongifolia* causaram maiores efeitos larvicidas (\cong 97% de mortalidade) e pupicidas (\cong 100% de mortalidade) e baixa taxa de pupação (1 a 6% de pupas formadas). Entretanto, *D. suzukii* depositou menos ovos em “frutos artificiais” tratados com *B. calvescens*, *B. mesounera* e *B. oblongifolia* (\cong 6 ovos/frutos); e uma menor viabilidade embrionária quando utilizado individual limoneno, *B. calvescens* e *B. oblongifolia* (\cong 2 larvas/frutos). Todas as espécies de *Baccharis* e o limoneno repeliram significativamente adultos de *D. suzukii*, quando comparados ao controle com acetona. Em geral, os OEs de *Baccharis*, especialmente *B. calvescens*, *B. mesounera* e *B. oblongifolia*, são eficazes no controle de *D. suzukii*, e promissores para serem utilizados no manejo da praga, principalmente em sistemas de produção de base orgânica, onde o uso de inseticidas sintéticos não são permitidos.

Palavras-chave: drosófila da asa manchada, bioinseticida, limoneno, *Baccharis calvescens*, *Baccharis mesounera*, *Baccharis oblongifolia*.

3.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Baccharis* compreende 435 espécies encontradas exclusivamente no continente Americano, com registros desde o sul do Canadá até o sul da América do Sul. No Brasil, 179 espécies foram descritas e a maioria delas com ocorrência na região Sul do país (Heiden e Schneider, 2015). *Baccharis* spp. estão distribuídas na Mata Atlântica, um “hotspots de biodiversidade” com o maior número de espécies de plantas em comparação com outros biomas brasileiros, com mais de 19.000 espécies, das quais 7.600 são endêmicas (Forzza et al., 2012). Apesar dos níveis notáveis de endemismo que tornam a Mata Atlântica uma das regiões mais distintas da Região Neotropical (Ribeiro et al., 2011), pouco se sabe sobre os potenciais recursos genéticos das plantas aromáticas presentes neste bioma. Atualmente, apenas 29 espécies de *Baccharis* têm seus estudos direcionados sobre o perfil químico e sua atividade biológica (Ramos Campos et al., 2016).

Uma característica importante desse gênero é a presença de metabolitos secundários – mais especificamente óleos essenciais (OEs) – que apresentam uma rica composição de terpenos formados por monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos (Ramos Campos et al., 2016). O OE de *Baccharis* spp. é utilizado há séculos como agente terapêutico na medicina tradicional devido às suas propriedades espasmolíticas, diuréticas, anti-inflamatórias, anti-bacterianas e fúngicas (Abad e Bermejo, 2007; Ramos Campos et al., 2016), e ganhou destaque nas indústrias de alimentos e fragrâncias. Em adição, esses OEs são reconhecidos por suas múltiplas propriedades contra artrópodes, como anti-alimentação (Sosa et al., 1994), fumigantes (Budel et al., 2018), larvicidas (Alves et al., 2018), tóxicas e repelentes a insetos (Garcia et al., 2005). Alguns constituintes individuais do óleo, como o limoneno, são registrados como seguros nos Estados Unidos pela “United States Food and Drug Administration”, e atuam dissolvendo os lipídios da cutícula da exoesqueleto, causando desidratação e morte do inseto, enquanto outro, como aldeído perilla, se mostra mais ativo na

atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) em *D. suzukii* (Park et al., 2016). Um exemplo clássico de produto comercial é o óleo de limoneno, um subproduto extraído principalmente das cascas de laranja, sendo registrados contra ectoparasitos de animais domésticos, tais como: ácaros, carrapatos, pulga e piolhos (Buss e Park Brown, 2002).

No setor agrícola, vários OEs mostraram-se promissores principalmente para ácaros e insetos de corpo mole (Isman et al., 2008), entre eles a drosófila-da-asa-manchada *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae) uma praga polífaga que ataca frutos de epicarpo delgado em todo o mundo (EPPO, 2020). Perdas econômicas são causadas pelas fêmeas de *D. suzukii* que possui um ovipositor serrilhado que lhes permite ovipositar em frutos sadios e maduros, enquanto que as larvas em desenvolvimento causam amolecimento dos frutos e podem promover rápida decomposição, inviabilizando os frutos para comercialização (Walsh et al., 2011). Portanto, o manejo de *D. suzukii* é desafiador devido à sua ampla gama de hospedeiros, curto ciclo biológico e ampla adaptação ambiental (Wollmann et al., 2019). Embora existam inseticidas sintéticos disponíveis no mercado para o controle de *D. suzukii*, estes produtos possuem período de carência de 5 a 14 dias (Renkema et al., 2016), e aplicações frequentes podem ser necessárias para manter o nível populacional baixo (Bruck et al., 2011). Além disso, o desenvolvimento de resistência de *D. suzukii* aos inseticidas sintéticos tem sido reportada (Gress e Zalom, 2018), provavelmente ao manuseio inadequado dos produtos, como uso excessivo do mesmo grupo químico sem alternância. Para dificultar ainda mais o cultivo de pequenas frutas nos principais países produtores, como no Brasil, é realizado em pequenas propriedades onde adotam o regime das políticas orgânicas ou de baixo resíduo, nas quais o uso das substâncias sintéticas é restrito ou proibido (Zanardi et al., 2015).

Assim, os OEs podem ser uma alternativa segura no manejo de *D. suzukii* frente ao uso de pesticidas sintéticos em pomares, além de ser uma estratégia biorracional (Köhler et al.,

2013; Bernardi et al., 2017). Uma vez que, estes também incluem os seguintes atributos: 1) podem ser obtidos em larga escala com preço baixo e suprimentos abundantes de vários óleos; 2) possuem diferentes modos e locais de ação de ação fazendo com que o desenvolvimento de resistência seja menor que os inseticidas convencionais; 3) apresentam baixo período residual devido à sua alta volatilidade; 4) OEs e seus constituintes são relativamente não tóxicos para mamíferos, com raras exceções (Isman et al., 2011).

Até o momento, nenhum estudo foi realizado para avaliar o efeito dos OEs de *Baccharis* spp. em *D. sukukii*. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade letal dos OEs obtidos de folhas de sete espécies de *Baccharis*, sobre adultos e larvas de *D. sukukii*. Além disso, foram realizados testes para avaliar o efeito dos óleos essenciais na oviposição e desenvolvimento embrionário de *D. sukukii*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção do material vegetal para extração dos óleos essenciais

Informações sobre as espécies de *Baccharis* que constituíram os tratamentos e o controle são detalhadas na Tabela 3-1. Os espécimes foram identificados pelo especialista Osmar dos Santos Ribas e depositados no Herbário do Museu Botânico Municipal (Museu Botânico Municipal - HMBM), Paraná, Brasil (25° 28'37, 90 ° N, 49 ° 59'34, 50 ° E e 960 m de altitude).

Tabela 3-1- Tratamentos avaliados para o manejo de *Drosophila suzukii*

Tratamentos	Descrição	Concentração testada ^a	Origem/Fabricante
<i>Limoneno</i>	Constituinte individual, (CAS: 5989-27-5) (commercial)	8%	Sigma-Aldrich Brazil (São Paulo, SP, Brasil)
<i>Baccharis anomala</i>	Óleo essencial extraído das folhas de <i>Baccharis anomala</i> DC. (pre-commercial)	8%	Extração e formulação de laboratório (Curitiba, Paraná, Brasil) ^b
<i>Baccharis calvescens</i>	Óleo essencial extraído das folhas de <i>Baccharis calvescens</i> DC. (pre-commercial)	8%	Extração e formulação de laboratório (Curitiba, Paraná, Brasil) ^b
<i>Baccharis calvescens</i>	Óleo essencial extraído das folhas de <i>Baccharis calvescens</i> DC. (pre-commercial)	8%	Extração e formulação de laboratório (Curitiba, Paraná, Brasil) ^b
<i>Baccharis milliflora</i>	Óleo essencial extraído das folhas de <i>Baccharis milliflora</i> DC. (pre-commercial)	8%	Extração e formulação de laboratório (Curitiba, Paraná, Brasil) ^b
<i>Baccharis oblongifolia</i>	Óleo essencial extraído das folhas de <i>Baccharis oblongifolia</i> DC. (pre-commercial)	8%	Extração e formulação de laboratório (Curitiba, Paraná, Brasil) ^b
<i>Baccharis trimera</i>	Óleo essencial extraído das folhas de <i>Baccharis trimera</i> DC. (pre-commercial)	8%	Extração e formulação de laboratório (Curitiba, Paraná, Brasil) ^b
<i>Baccharis uncinella</i>	Óleo essencial extraído das folhas de <i>Baccharis uncinella</i> DC. (pre-commercial)	8%	Extração e formulação de laboratório (Curitiba, Paraná, Brasil) ^b
Delegate 250 WG	Espinectoram ^a	75 g de i.a. 100 L ⁻¹	Dow AgroSciences Industrial Ltda. (São Paulo, SP, Brasil)
Azadiractina	Limoneno	250 mL de i.a. 100 L ⁻¹	UPL Brasil (Campinas, São Paulo, Brazil)

^aConcentração: 8% (0,16 mL) de óleo essencial por 1,84 mL de acetona; 250 mL de produtos comercial por L de água (Azamax[®]); 75 mg de produto comercial por L de água (Delegate[®]).^bLaboratório de Ecofisiologia, Universidade Federal do Paraná (Extração) e Laboratório de Semioquímicos, Universidade Federal do Paraná (Formulação), Paraná, Brasil.

Para a extração dos OEs, as folhas coletadas foram cortadas em segmentos de ± 2 cm e submetidos a hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger (Vidrolabor, São Paulo, Brasil) durante 4 horas e 30 minutos. Posteriormente, o hidrolato foi separado usando sulfato de sódio anidro. As amostras foram mantidas em freezer a -20 °C até análise química. O limoneno foi selecionado para os bioensaios realizados, devido ser o constituinte majoritário comum em todas as espécies estudadas. Padrões desse constituinte, D-limoneno (CAS: 5989-27-5), foram obtidos da Sigma-Aldrich Brazil (São Paulo, Brazil) e tem uma pureza de $\geq 99\%$.

3.2.2 Análise química dos óleos essenciais: identificação e quantificação

A CG / EM foi realizada em um cromatógrafo a gás Agilent 6890[®] acoplado a um detector de massa Agilent 5973 N[®]. O GC foi equipado com uma coluna capilar fundida HP-5MS (espessura do filme de $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$) revestida com fase estacionária de 5% de fenil–95% de dimetilpolisiloxano. O hélio foi usado como gás de arraste, a uma vazão de $1,0 \text{ mL} / \text{min}$. A programação da temperatura foi ajustada para $60\text{--}240$ °C na taxa de 3 °C / min, aquecida a 240 °C e mantida nessa temperatura por 10 minutos. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C. As amostras de OEs foram diluídas para uma solução a 1% em diclorometano e $1,0 \text{ }\mu\text{L}$ da solução foi injetado com uma proporção de partição de 1:20. O detector de massa foi operado no modo de ionização de elétrons (70 eV) a uma taxa de $3,15$ varredura / min e uma faixa de varredura de 40 a 450 Da. A linha de transferência foi mantida a 260 °C, a fonte de íons a 230 °C e o analisador (quadrupolo) a 150 °C. Para a quantificação, os OEs foram injetados e o CG Agilent 6890A[®], equipado com FID, foi operado a 280 °C. O hidrogênio foi usado como gás transportador, a uma taxa de fluxo de $1,5 \text{ mL} / \text{min}$, usando a mesma coluna e condições descritas acima.

A quantificação de cada constituinte foi estimada pelo detector de ionização por chama (FID) com a área de pico correspondente, que foi determinada com base na média de três injeções (Tabela 3-2).

Tabela 3-2- Composição do óleo essencial (%) das amostras de folhas frescas de sete espécies de *Baccharis* coletadas na Região Neotropical, Brasil.

Constituintes	IR ^{lit}	IR ^{cal}	% area do pico							
			1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	
1. α -thujeno	924	926	0,9					14,4		
2. α -pineno	932	935	4,4	6,7			4,8	15,5		
3. sabineno	969	965						6,3		
4. β -pineno	974	974	13,7	4,8	4,8			8,2	5,0	
5. limoneno	1024	1026	39,5	24,1	18,6	22,6	32,2	32,7	23,9	
6. acetato de carquejila	1298	1298			52,7					
7. germacreno D	1484	1485							6,3	19,7
8. palustrol	1567	1565			6,4					
9. espathulenol	1577	1576	2,0	17,2						
10. Óxido de cariofileno	1582	1584	2,4	6,3		2,4			2,1	
11. viridiflorol	1592	1592				24,1				
12. α -cadinol	1652	1651	3,3	1,9	1,0	1,4			1,5	1,6

Nota: IR^{lit} = Índice de Retenção da Literatura, IR^{cal} = Índice de Retenção Calculado. 1*

Baccharis calvescens; 2* *B. uncinella*; 3* *B. trimera*; 4* *B. milleflora*; 5* *B. mesoneura*; 6* *B. oblongifolia*; e 7* *B. anomala*.

A identificação dos componentes dos óleos foi realizada pela comparação dos espectros de massa com os das bibliotecas comerciais (McLafferty e Stauffer, 1994; Nist, 2014) e também por seus índices de retenção linear (Van Den Dool e Kratz, 1963), após o injeção de uma série homóloga de alcanos (C₈ – C₂₆), nas mesmas condições experimentais, em comparação com dados da literatura (Adams, 2007).

3.2.3 Colônia de *Drosophila suzukii*

Os exemplares de *Drosophila suzukii* utilizados nos bioensaios estavam na décima geração, sendo que a colônia foi estabelecida a partir de insetos coletados em morangueiro (*Fragaria × ananassa* Duchesne) em janeiro de 2018, na cidade de Curitiba (31° 38'20" S, 52° 30'43" W), Paraná, Brasil. Para a criação das moscas, os frutos infestados de morangos foram colocados individualmente em potes de plástico (150 mL) com tampa perfurada (2 cm de diâmetro) e cobertas com tecido de *voile* contendo uma fina camada de vermiculita (1 cm). Os frutos foram mantidos em uma sala com ar condicionado a 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo 12:12 (C:E) horas até a emergência do adulto. Posteriormente, machos e fêmeas foram transferidas para garrafas de vidro (300 mL) contendo dieta artificial (12 mL), consistindo de farinha de milho, açúcar e levedura (Schlesener et al., 2018). Antes de cada bioensaio, adultos de sete dias de idade, foram privados de alimentos por 8 horas, mas com o fornecimento de água em algodão hidrofílico.

3.2.4 Bioensaios

Todos os bioensaios foram realizados em condições controladas (25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo 12:12 (C:E) horas) usando um delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos e concentrações discriminatórias utilizadas estão detalhados na Tabela 3-1. Como soluções de 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0% dos OEs intactos de *Baccharis* spp. (*B. anomala*, *B. calvescens*, *B. mesoneura*, *B. milleflora*, *B. oblongifolia*, *B. trimera* e *B. uncinella*) e o constituinte individual limoneno, foram preparadas diluindo todos os tratamentos em solvente acetona (PanReac-UV-IR-HPLC-GPC PAI-ACS, 99,9% de pureza). A formulação baseada em espinoteram (7,5 mg i.a L⁻¹; Delegate[®] 250WG, Dow AgroSciences, Santo Amaro, São Paulo, Brasil) e o bioinseticida à base de limonóide (azadiractina + 3-tigloil-azadiractol, 1,2 mL i.a L⁻¹; Azamax[®] 1,2 EC, UPL Brasil, Campinas,

São Paulo, Brasil) foram utilizados como controle positivo (Tabela 3-1). Como controle negativo foram utilizados os solventes (água ou acetona) utilizados na solubilização dos respectivos tratamentos.

3.2.5 Testes discriminatórios (experimento inicial)

Para avaliar a toxicidade letal nos bioensaios de ingestão e aplicação tópica, dos OEs de *Baccharis* spp. e do constituinte limoneno, foram realizados testes iniciais utilizando a concentração discriminatória de 8% em adultos de *D. suzukii* (Tabela 3-1).

Para os bioensaios de ingestão, os insetos foram separados em grupos (unidades de amostra) de 10 casais (sete dias de idade) e colocados dentro de gaiolas feitas de copos plásticos transparentes (1 L) e virados de cabeça para baixo em uma placa de Petri® (25 cm de diâmetro) e selado na parte superior (fundo do copo) com uma malha de *voile* para ventilação. Após a preparação das soluções apropriadas, os produtos foram oferecidos aos insetos por capilaridade em rolos de algodão dentro de frascos de vidro de 10 mL por 24 horas. Após esse período, alimentos e água destilada substituíram os tubos de vidro com algodão tratado até o final do período de avaliação, conforme método descrito por Schlesener et al. (2018). A mortalidade foi avaliada por até 120 horas após o início do tratamento. Para cada tratamento, foram utilizadas quatro repetições, cada uma composta por 20 moscas (n = 80).

Para os bioensaios de aplicação tópica, adultos de *D. suzukii* (oito casais) com sete dias de vida oriundos da criação de manutenção foram separados e colocados em tubos de vidro transparente (2,5 cm de diâmetro × 8 cm de comprimento), selados na parte superior com um tampão de algodão hidrofílico. Posteriormente, os insetos foram sedados a 2 °C por 40 a 60 segundos. Em seguida, os insetos foram colocados em uma placa de Petri (9 cm de diâmetro) forrada com papel de filtro, e os tratamentos foram pulverizados sobre as moscas usando uma "Torre dos Potter" (Burkard Scientific Uxbridge, Reino Unido), aplicando 2 mL

de OE por unidade de amostra a uma pressão de trabalho de 7 lb em⁻², resultando em uma deposição média de resíduos de 1,0 mg cm². Após a pulverização, as moscas foram cuidadosamente colocadas dentro de gaiolas plásticas transparentes (500 mL) como descrito anteriormente e alimentadas com dieta artificial e água destilada durante todo o período de avaliação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos contendo cinco repetições (gaiolas) com 16 adultos de *D. sukii* por repetição (n= 80). A mortalidade em cada tratamento foi avaliada em intervalos de 1 hora para as primeiras 24 horas após a exposição aos tratamentos (HAET) e a cada 24 horas após 24 a 120 HAET. Nos dois experimentos, as moscas foram consideradas mortas quando nenhum movimento ocorreu após o toque com um pincel fino. A mortalidade corrigida foi calculada usando a equação de Abbott (1925).

3.2.5.1 Curvas de concentração-resposta

Com base no experimento inicial, os tratamentos foram selecionados e submetidos a um novo bioensaio para estimar a concentração necessária para matar 50% e 90% das moscas expostas (CL₅₀ e CL₉₀, respectivamente). Para tanto, foram definidas sete concentrações (intervalo: 0,25 – 8,0 % para os OEs de *Baccharis* spp. e do constituinte limoneno; intervalo: 5 – 75 mg L⁻¹ para espinoteram; intervalo: 25 – 250 mg L⁻¹ para o bioinseticida a base de limoneno commercial) para cada tratamento e o modo de exposição baseado no procedimento proposto por (Finney, 1971). Os procedimentos de exposição e avaliação, bem como os critérios de mortalidade, foram os mesmos utilizados nos testes iniciais. Nos bioensaios de ingestão, foram utilizadas quatro repetições, cada uma contendo 20 moscas (n = 80) para cada concentração de cada inseticida. Nos bioensaios de aplicação tópica, 5 réplicas cada uma contendo 16 moscas (n = 80) foram usadas para cada concentração de cada inseticida testado.

3.2.6 Dissuasão da oviposição

Para avaliar o efeito dos OEs das diferentes espécies de *Bacharis* sobre a oviposição foram realizados bioensaios de não-escolha. Para isso, “frutos artificiais” foram preparados com ágar (19 g), gelatina de framboesa (10 g), metilparabeno (Nipagin, Vetec, Química Finz, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) 8 mL (0,8 g dissolvido em 8 mL de álcool etílico absoluto a 99,9%) e água destilada (refluxada; 850 mL), de acordo com o método adaptado proposto por Schlesener et al. (2017).

Em cada “fruto artificial”, foram pulverizadas as soluções aplicando 1 mL de OE (*B. anomala*, *B. calvescens*, *B. mesoneura*, *B. milleflora*, *B. oblongifolia*, *B. trimera* e *B. uncinella*, e do constituinte individual limoneno) por unidade de amostra a uma pressão de trabalho de 7 lb in⁻², resultando em um resíduo médio deposição de 0,4 mg cm². Em seguida, os “frutos artificiais” foram condicionados por três horas em uma sala climatizada (25 ± 2 °C, 70% ± 10% UR e fotoperíodo de 12:12 (C:E) horas para evaporar o excesso de umidade e, conseqüentemente, a deposição residual. Depois, o “fruto artificial” (unidade de amostra); foi colocado individualmente em um recipiente de plástico (250 mL), com tecido de *voile* (4 cm de diâmetro) para troca gasosa do interior com o meio exterior. Posteriormente, cinco casais de *D. sukii* (≅ sete dias) foram adicionados para acasalar e ovipositar. Após 24 horas, os adultos foram removidos e os ovos e larvas no “fruto artificial” foram contados com auxílio de um microscópio estereoscópico (40 × de aumento; Série NO106; Global Optics, Monte Alto, São Paulo, Brasil). O delineamento foi realizado em delineamentos em blocos ao acaso, com 30 repetições por tratamento.

3.2.7 Repelência

As fêmeas de *D. sukii* foram individualizadas e testadas com no máximo 24 horas de idade, em olfatômetro tipo de vidro de dupla escolha, com diâmetro de 8,0 cm, arena inicial de 20 cm de cada lado, sob luz fluorescente (60 W, luminância de 290 lux). Na extremidade de um dos braços do olfatômetro foi colocado um papel filtro de 4 × 10 cm, dobrado em forma de gaita, contendo 5 µL dos OEs de *Baccharis* spp. e do constituinte individual limoneno na concentração discriminatória (8% do óleo), na outra extremidade, adicionado outro papel filtro (4 × 10 cm) com o mesmo volume do solvente acetona (controle). Um fluxo de ar, previamente filtrado com carvão ativo, era conduzido para dentro do sistema com o auxílio de uma bomba a vácuo conectada a um fluxímetro e um umidificador, a uma taxa de 0,8 L / min. A cada quatro repetições, o olfatômetro foi lavado com sabão neutro e hexano, sendo posteriormente seco em estufa de esterilização a 150 °C. Após este processo, as substâncias eram renovadas e continuadas às avaliações. Cada tratamento consistiu de 40 repetições. As respostas foram consideradas positivas (OE ou acetona) quando as moscas alcançavam a fonte de odor ou percorriam, pelo menos, 10 cm dentro dos braços do olfatômetro e permaneciam nesta área por, no mínimo, 1 minuto.

3.2.8 Efeito larvicida e parâmetros biológicos

Para avaliar o efeito larvicida dos OEs de *Baccharis* spp. (*B. anomala*, *B. calvescens*, *B. mesoneura*, *B. milleflora*, *B. oblongifolia*, *B. trimera* e *B. uncinella*) e do constituinte individual limoneno, grupos de 20 larvas de *D. sukii* no estágio L3 foram introduzidas em tubos de vidros transparente (2,5 cm de diâmetro × 8 cm de comprimento) contendo um papel de filtro (2 × 4 cm) impregnado com 0,2 mL de soluções de OE, solubilizadas em acetone (PanReac-UV-IR-HPLC-GPC PAI-ACS, 99,9% de pureza). Foram utilizados os tratamentos 0,25; 0,50; 0,25; 0,50; 0,75; 1.0; 2.0; 4.0; 8,0% de óleos. Acetona e água destilada foram

usadas como controles negativos. Após a aplicação dos OEs, os tubos de vidros foram selados com tecido *voile* para facilitar a aeração, e foram mantidos por 3 min. em exaustor, sendo posteriormente transferidos para condições controladas (25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo 12:12 (C:E) horas). No total foram utilizadas 100 larvas L3 para cada concentração, em cinco repetições de 20 larvas. A mortalidade das larvas L3 de *D. sukukii* foi avaliada 6, 24 e 48 horas após o contato com os tratamentos, sendo calculada a mortalidade total (MT) conforme Kumar et al. (2014). Outros parâmetros biológicos como taxa de pupação (PR), mortalidade pupal (PM), e deformidade de adultos (AD) também foram registrados e calculados como segue abaixo (Kumar et al., 2014; Singh e Kaur, 2016):

$$MT = (\text{total larvas mortas} \times 100) / \text{total de larva testadas}$$

$$PR = (\text{total de pupa} \times 100) / \text{total de larva testadas}$$

$$PM = (\text{número de pupas mortas} / \text{número de pupas introduzidas}) \times 100$$

$$AD = (\text{total adultos deformados} \times 100) / \text{total adultos emergidos}$$

3.2.9 Análise dos dados

Modelos lineares generalizados (GLM) da família de distribuições exponenciais (Nelder e Wedderburn, 1972) foram utilizados para a análise das variáveis estudadas. Quando houve diferenças significativas entre os tratamentos, foram realizadas comparações múltiplas (teste de Tukey, $P < 0,05$) utilizando a função `glht` por meio do pacote `Multcomp`, com ajuste dos valores de p . Todas as análises foram realizadas usando o software estatístico “R” versão 2.15.1 (R Development Core Team, 2012). Um modelo binomial com uma função complementar de log-log link (modelo `gompit`) foi usado para estimar as concentrações letais (LC50 e LC90), usando o `Probit Procedure` no software SAS versão 9.2 (SAS Institute, 2011). Finalmente, o tempo letal médio (TL₅₀) foi estimado pelo método proposto por Throne et al.

(1995) para análise Probit de dados correlacionados. Uma porcentagem de repelência (PR) foi calculada de acordo com Liu et al. (2008). Uma porcentagem de repelência de cada óleo / composto foi calculada usando a fórmula: $PR (\%) = [(Nc - Nt) / (Nc + Nt)] \times 100$ onde Nc foi o número de insetos presentes no controle negativo, Nt foi o número de insetos presentes no tratamento.

3.3 RESULTADOS

Após 120 horas de exposição, os OEs de *B. calvescens*, *B. mesounera* e *B. oblongifolia* (8% de óleo) e o Delegate® (75 mg L⁻¹) apresentaram alta toxicidade, com mortalidade da *D. sukuzii* superiores a 90% por ingestão e/ou aplicação tópica (Figura 3-1). Esses valores foram significativamente maiores (aplicação tópica [F= 212,32; df = 9; P < 0,0001]; ingestão [F= 194,3; df = 9; P < 0,0001]) que o constituinte isolado limoneno, *B. anomala*, *B. milliflora*, *B. trimera* e *B. uncinella* ou bioinseticida à base de limoneno, que causou mortalidades entre 65 e 81%, tanto no bioensaio de ingestão quanto com aplicação tópica (Figura 3-1).

Baseado nas curvas da concentração-resposta para o bioensaio de ingestão, a toxicidade dos OEs de *B. anomala*, *B. calvescens*, *B. mesounera*, *B. milliflora*, *B. oblongifolia*, *B. trimera* e *B. uncinella* foram maiores (CL₅₀ = 6,44 – 11,64 mg L⁻¹) do que o Delegate® (CL₅₀ = 25,40 mg L⁻¹) às 120 horas (Tabela 3-3). Da mesma forma, em relação aos valores de CL₉₀, a toxicidade das espécies de *Baccharis* foram maiores que o Delegate®; os valores de CL₉₀ variaram de 17, 02 – 21,04 mg L⁻¹ para os OEs, e 51, 89 mg L⁻¹ para o Delegate®, após 120 horas de exposição aos tratamentos (Tabela 3-3).

Nos bioensaios de aplicação tópica, a CL₅₀ estimada em 120 horas para o inseticida Delegate® foi significativamente menor (CL₅₀ = 10,55 mg L⁻¹) do que o observado com os OEs extraídos das espécies de *Baccharis* avaliadas (CL₅₀ = 3,12 – 7,76 mg L⁻¹) (Tabela 3-3).

Em relação aos valores de CL_{90} , a toxicidade do Delegate® ($CL_{90} = 54,13 \text{ mg L}^{-1}$) foi menor que *B. anomala*, *B. calvescens*, *B. mesounera*, *B. milliflora*, *B. oblongifolia*, *B. trimera* e *B. uncinella* ($CL_{90} = 16,11 - 22,15 \text{ mg L}^{-1}$) às 120 horas após da aplicação tópica dos produtos (Tabela 3-3).

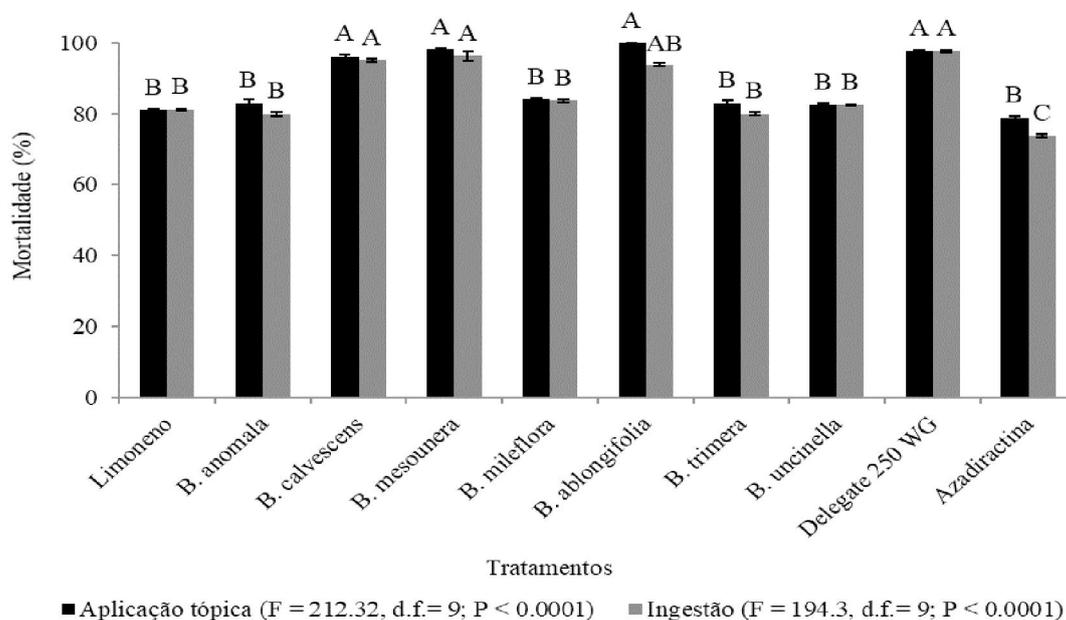


Figura 3-1- Mortalidade de *Drosophila sukii* quando submetida a bioensaios de aplicação tópica e ingestão em diferentes tratamentos, contituídos de óleos essenciais de diferentes espécies de *Baccharis*, limoneno, Azadiractina® e Delegate®.

As médias seguidas de letras diferentes nas colunas (dentro de cada bioensaio de exposição) indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase binomial seguida pelo teste de Tukey, $P < 0,05$);

Os resultados também mostraram que o TL_{50} depende da concentração em ambos os procedimentos de exposição. Nos bioensaios tópicos, o TL_{50} dos OEs foi de 11,78 HAET para limoneno; 7,76 para *B. anomala*; 8,71 para *B. calvescens*; 4,89 para *B. mesounera*; 4,76 para *B. milliflora*; 4,55 para *B. oblongifolia*; 4,96 para *B. trimera*; 7,10 para *B. uncinella*. Nos bioensaios de ingestão, TL_{50} foi de 66,41 HAET para limoneno 43,24 para *B. anomala*; 48,05 para *B. calvescens*; 43,16 para *B. mesounera*; 46,30 para *B. milliflora*; 55,42 para *B. oblongifolia*; 42,76 para *B. trimera*; 52,48 para *B. uncinella*. (Tabela 3-4).

Tabela 3-3- Estimativa da CL₅₀ e CL₉₀ (em mg L⁻¹) bem como o intervalo de confiança de *Baccharis* spp., limoneno, inseticida sintético à base de espinosina (Delegate®) e azadiractina (Azamax®) sobre adultos de *Drosophila suzukii* em 120 HAE nos bioensaios de de aplicação tópica e ingestão.

Tratamentos	Slope ± SE	CL ₅₀ (IC 95%) ^a	CL ₉₀ (IC 95%) ^b	χ ^{2c}	GL ^d
BIOENSAIO DE INGESTÃO					
<i>Limoneno</i>	2,90 ± 0,34	19,81 (18,54 – 22,15)	25,11 (23,11 – 26,14)	9,08	9
<i>B. anomala</i>	2,81 ± 0,42	11,64 (8,74 – 13,45)	18,98 (17,10 – 20,05)	8,13	9
<i>B. calvescens</i>	3,12 ± 0,31	8,89 (6,83 – 10,45)	17,42 (16,08 – 20,15)	7,12	9
<i>B. mesounera</i>	2,98 ± 0,24	6,71 (5,12 – 9,11)	17,02 (16,04 – 19,78)	8,11	9
<i>B. milliflora</i>	2,64 ± 0,32	6,44 (5,74 – 9,15)	19,23 (18,78 – 20,07)	8,45	9
<i>B. oblongifolia</i>	3,10 ± 0,43	6,52 (5,02 – 9,74)	18,13 (16,17 – 20,19)	7,12	9
<i>B. trimera</i>	2,67 ± 0,30	10,42 (8,16 – 11,11)	21,04 (17,78 – 22,04)	9,75	9
<i>B. uncinella</i>	3,14 ± 0,27	7,82 (6,57 – 10,14)	17,20 (16,01 – 18,56)	8,19	9
Delegate®	2,79 ± 0,21	25,40 (21,50 – 27,17)	51,89 (48,6 – 53,17)	9,76	9
Azadiractina®	2,78 ± 0,23	160,14 (155,1 – 162,45)	310,45 (304,4 ± 318,03)	8,12	9
BIOENSAIO DE APLICAÇÃO TÓPICA					
<i>Limoneno</i>	2,14 ± 0,13	11,52 (9,10 – 13,12)	29,74 (27,11 – 30,05)	7,13	9
<i>B. anomala</i>	3,11 ± 0,42	5,94 (3,72 – 7,10)	18,74 (16,11 – 20,15)	9,12	9
<i>B. calvescens</i>	2,75 ± 0,53	3,40 (2,75 – 5,10)	19,45 (17,83 – 21,14)	6,04	9
<i>B. mesounera</i>	2,89 ± 0,42	4,14 (3,74 – 5,01)	18,11 (17,54 – 20,04)	8,13	9
<i>B. milliflora</i>	3,12 ± 0,32	5,69 (3,15 – 7,97)	19,75 (17,45 – 20,12)	8,02	9
<i>B. oblongifolia</i>	2,98 ± 0,54	3,12 (2,66 – 3,89)	22,15 (16,54 – 25,19)	7,74	9
<i>B. trimera</i>	3,10 ± 0,64	5,83 (3,78 – 5,19)	16,11 (13,07 – 22,78)	6,82	9
<i>B. uncinella</i>	2,96 ± 0,89	7,76 (4,40 – 8,75)	21,07 (16,01 – 23,98)	7,02	9
Delegate 250 WG	3,75 ± 0,11	10,55 (10,05 – 12,11)	54,13 (49,54 – 58,11)	8,10	9
Azadiractina	2,18 ± 0,10	204,13 (199,66 – 206,11)	416,84 (399,14 – 420,16)	8,25	9

^{a,b}CL₅₀ e CL₉₀: Concentrações de inseticida (mg L⁻¹) necessárias para matar 50 ou 90% dos adultos de *D. suzukii*, respectivamente (IC: intervalo de confiança com 95% de probabilidade de erro); ^cχ²: valor do qui-quadrado de Pearson; ^dGL: graus de liberdade.

Os resultados também mostraram que o TL₅₀ depende da concentração em ambos os procedimentos de exposição. Nos bioensaios tóxico, o TL₅₀ dos OEs foi de 11,78 HAET para limoneno; 7,76 para *B. anomala*; 8,71 para *B. calvescens*; 4,89 para *B. mesounera*; 4,76 para *B. milliflora*; 4,55 para *B. oblongifolia*; 4,96 para *B. trimera*; 7,10 para *B. uncinella*. Nos bioensaios de ingestão, TL₅₀ foi de 66,41 HAET para limoneno 43,24 para *B. anomala*; 48,05 para *B. calvescens*; 43,16 para *B. mesounera*; 46,30 para *B. milliflora*; 55,42 para *B. oblongifolia*; 42,76 para *B. trimera*; 52,48 para *B. uncinella*. (Tabela 3-4).

Em relação a mortalidade larval da *D. suzukii*, observamos que todos OEs de *Baccharis* spp. e o limoneno foram superiores aos controles com água ou acetona (F = 22.14; df = 9, 95; P <0,0001), destacando-se *B. anomala*, *B. calvescens*, *B. mesounera*, *B. milliflora* e *B. oblongifolia* (\cong 97% de mortalidade) (Figura 3-2 e Tabela 3-5). Estes tratamentos também foram superiores para os parâmetros biológicos de taxa de pupação (F = 36.11; df = 8, 95; P <0,0001) e mortalidade pupal (F = 17.10; df = 8,95; P <0,0001) comparados aos controles. Verificamos, que estes OEs inibiram a emergência dos adultos de *D. suzukii* e no caso do limoneno provocaram em torno de 5% de deformidades nos adultos (Figura 3-3).

Tabela 3-4- Mortalidade larval (LM), taxa de pupação (PR), mortalidade pupal (PM), e deformidade de adultos de *Drosophila suzukii* tratados com diferentes tratamentos.

Treatments	LM (%)	PR (%)	PM (%)
<i>Limoneno</i>	88,0 ± 4,06 ab	12,0 ± 4,06 b	95,0 ± 5,00 b
<i>B. anomala</i>	94,0 ± 1,87 a	6,0 ± 1,65 bc	100,0 ± 0,00 b
<i>B. calvescens</i>	97,0 ± 1,22 a	3,0 ± 1,22 c	100,0 ± 0,00 b
<i>B. mesounera</i>	99,0 ± 1,0 a	1,0 ± 1,00 c	100,0 ± 0,00 b
<i>B. milliflora</i>	95,0 ± 2,73 a	5,0 ± 2,7 c	100,0 ± 0,00 b
<i>B. oblongifolia</i>	100,0 ± 0,00 a	-	-
<i>B. trimera</i>	86,0 ± 3,67 b	14,0 ± 3,67 b	96,0 ± 4,00 b
<i>B. uncinella</i>	85,0 ± 4,74 b	15,0 ± 4,74 b	100,0 ± 0,00 b
Acetone	0,00 ± 0,00 c	100,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a
Água	0,00 ± 0,00 c	100,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a
F	22,14	36,11	17,10
GL	9, 95	8, 95	8, 95
Values P	< 0,001	< 0,001	< 0,001

As colunas seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes (GLM com uma distribuição quase binomial seguida pelo teste de Tukey: P >0,05).

Tabela 3-5- Estimativa do tempo letal mediano (TL₅₀, em horas) e do intervalo de confiança de uma formulação *Baccharis* spp., limoneno, inseticida sintético à base de espinosina (Delegate®) e azadiractina (Azamax®) sobre adultos de *Drosophila suzukii* utilizando a máxima concentração testada.

Tratamentos	Concentração (mg.L ⁻¹)	Slope ± SE	TL ₅₀ (IC 95%) ^a	χ ^{2b}	GL ^c
BIOENSAIO DE APLICAÇÃO TÓPICA					
<i>Limoneno</i>	20	2,98 ± 0,45	11,78 (10,12 – 13,20)	8,97	32
<i>B. anomala</i>	20	3,07 ± 0,31	7,76 (5,15 – 9,72)	7,11	32
<i>B. calvescens</i>	20	2,17 ± 0,24	8,71 (6,45 – 10,32)	5,23	32
<i>B. mesounera</i>	20	2,15 ± 0,32	4,89 (3,73 – 7,11)	6,10	32
<i>B. milliflora</i>	20	3,83 ± 0,43	4,76 (2,75 – 6,89)	7,14	32
<i>B. oblongifolia</i>	20	3,67 ± 0,30	4,55 (4,00 – 6,45)	8,12	32
<i>B. trimera</i>	20	3,94 ± 0,27	4,96 (3,42 – 5,12)	7,94	32
<i>B. uncinella</i>	20	2,97 ± 0,31	7,10 (5,12 – 9,25)	5,17	32
Delegate®	75	3,11 ± 0,23	6,04 (4,13 – 8,19)	9,32	32
Azamax®	250	3,80 ± 0,34	20,69 (19,13 – 22,74)	9,45	32
BIOENSAIO DE INGESTÃO					
<i>Limoneno</i>	20	2,95 ± 0,74	66,41 (60,10 – 70,32)	4,12	32
<i>B. anomala</i>	20	2,89 ± 0,16	43,24 (40,11 – 50,12)	7,11	32
<i>B. calvescens</i>	20	3,87 ± 0,15	48,05 (41,18 – 55,19)	8,15	32
<i>B. mesounera</i>	20	3,14 ± 0,21	43,16 (39,17 – 50,12)	9,20	32
<i>B. milliflora</i>	20	3,00 ± 0,17	46,30 (40,14 – 53,12)	7,14	32
<i>B. oblongifolia</i>	20	2,98 ± 0,23	55,42 (41,19 – 60,02)	8,11	32
<i>B. trimera</i>	20	2,87 ± 0,10	42,76 (37,13 – 50,12)	9,76	32
<i>B. uncinella</i>	20	2,99 ± 0,45	52,48 (42,19 – 59,13)	8,30	32
Delegate®	75	3,09 ± 0,41	17,95 (11,12 – 24,98)	9,75	32
Azamax®	250	2,72 ± 0,22	60,10 (52,19 – 69,43)	7,12	32

^aTL₅₀: tempo necessário para matar 50% dos adultos de *D. suzukii* após a exposição aos tratamentos (IC: intervalo de confiança com 95% de probabilidade de erro; ^bχ²: valor do qui-quadrado de Pearson; ^cGL: grau de liberdade.

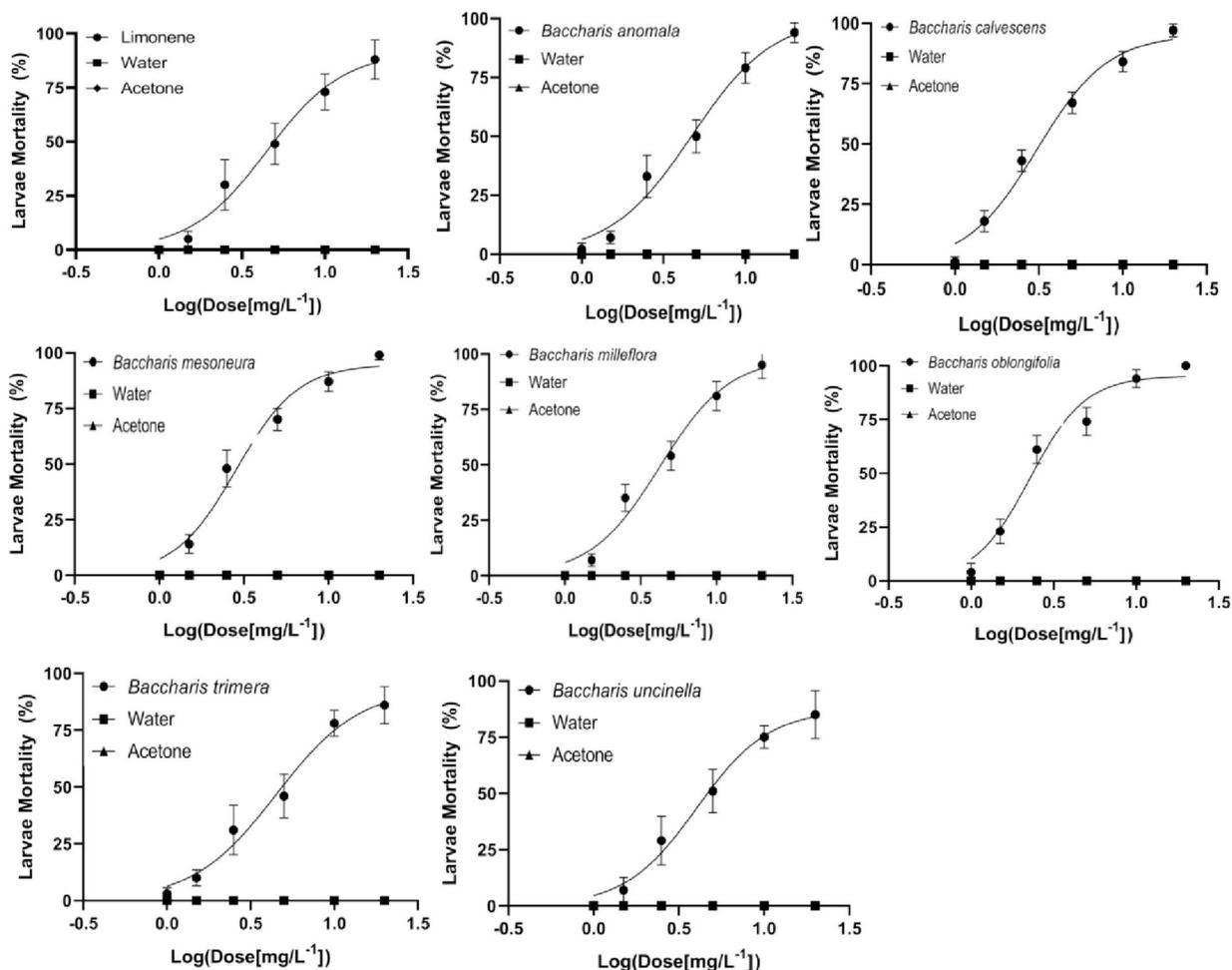


Figura 3-2- Toxicidade larval ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de *Drosophila sukii* após exposição aos OEs usando acetona como transportador.

Em adição, os resíduos secos dos OEs reduziram significativamente ($F = 33.11$, $gl: 11$, 28 ; $P < 0,0001$) a oviposição de *D. sukii* nos frutos artificiais tratados com *B. calvescens* (7,5 ovos/fruto), *B. mesounera* (7,9 ovos/fruto) e *B. oblongifolia* (7,2 ovos/fruto) quando comparados aos controles negativos com água (17,2 ovos/fruto) e acetona (17,6 ovos/fruto) (Figura 3-4 A). De maneira similar, foi verificada uma redução significativa no viabilidade embrionária quando os ovos foram colocados em frutos artificiais tratados com *B. calvescens* (18% de ovos viáveis) e *B. oblongifolia* (24% de ovos viáveis) (Figura 3-4 B). Esses

resultados mostraram uma redução de $\cong 47\%$ quando comparados ao controle negativo com acetona (45% de ovos viáveis) ou água (45% de ovos viáveis) (Figura 3-4 B).

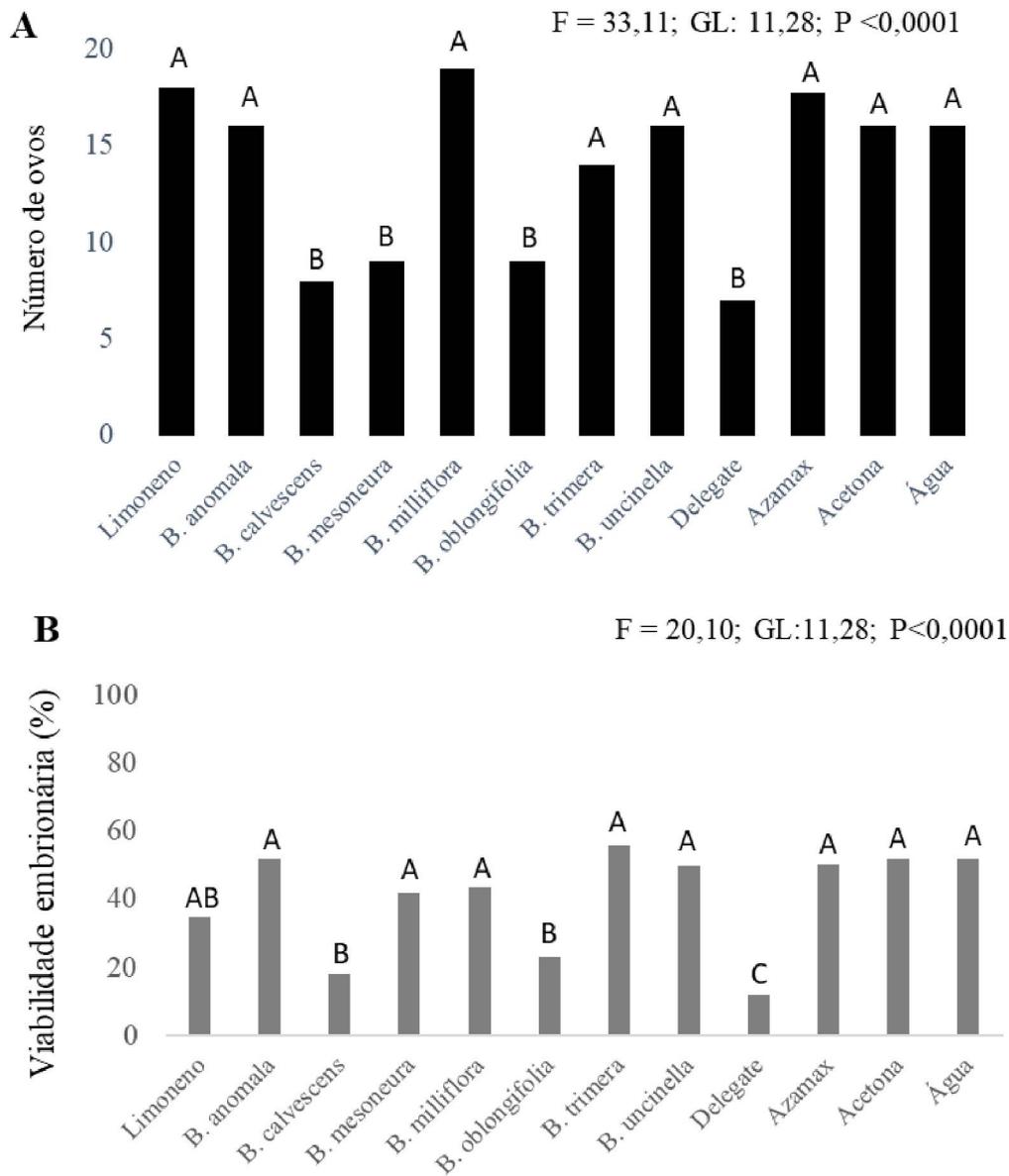


Figura 3-3- Número de ovos (A) e viabilidade embrionária de *D. sukuzii* (B) em frutos artificiais após a imersão nos tratamentos com diferentes tratamentos.

As barras com a mesma letra não são significativamente diferentes (MGL) com uma distribuição quase binomial seguida pelo teste de Tukey: $P > 0,05$).

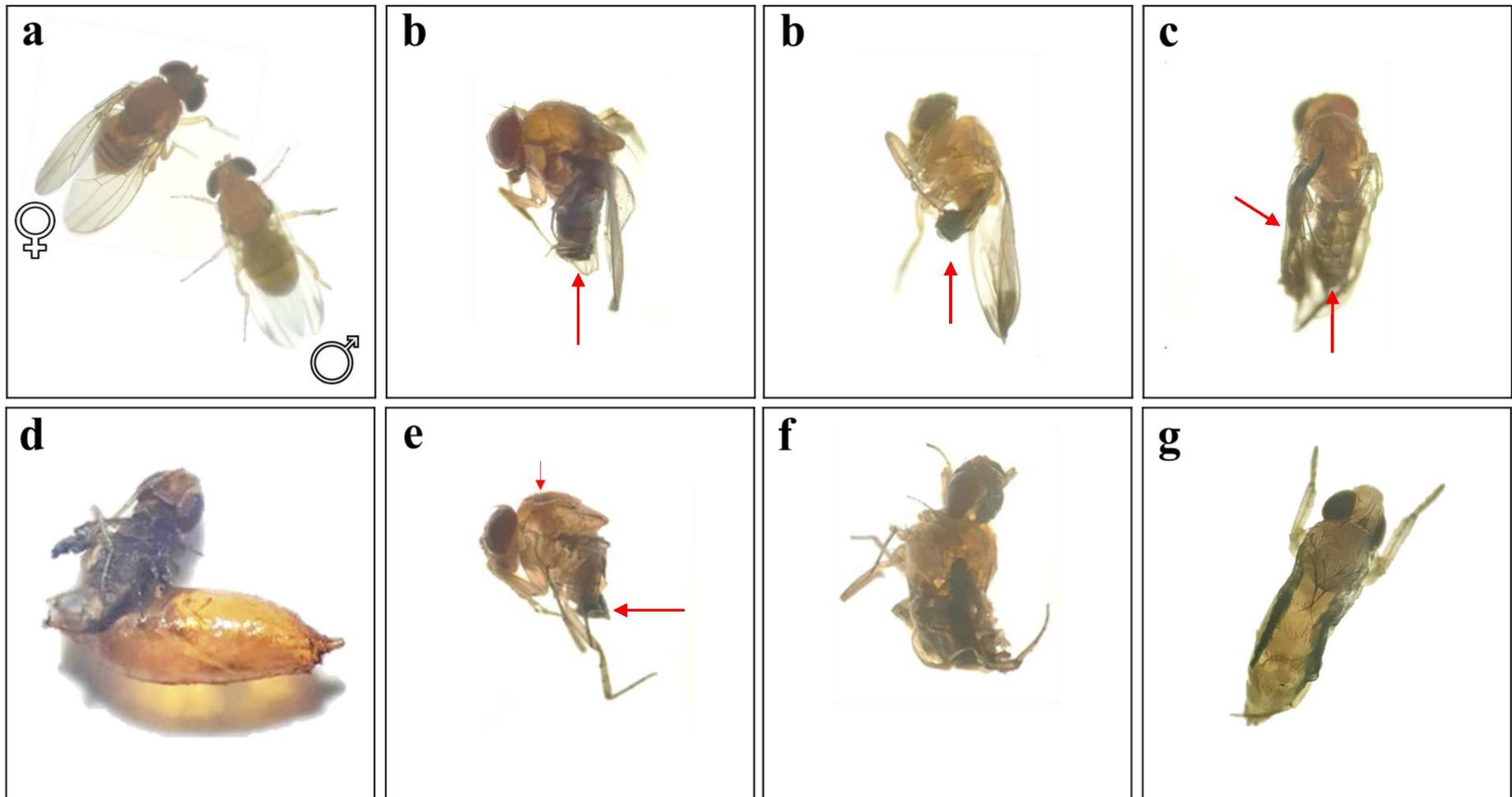


Figura 3-4- Visão em um microscópio estereoscópico (aumento de 50 ×) da deformidade em adultos de *Drosophila suzukii* após tratamento com limoneno. Notas: (a) machos e fêmeas normais; (b) deformidades no abdômen; (c) deformidade no abdômen e asas; (d) emergência incompleta; (e) deformidade no abdômen e pronoto, (f) adulto deformado, (g) desenvolvimento incompleto.

Quando foi avaliada a repelência de fêmeas de *D. sukii* pelos diferentes tratamentos contendo OEs usando olfatometria observou-se que 92% responderam ao solvente (ou seja, acetona), e em torno de 8% responderam aos OEs ou limoneno (Figura 3-5).

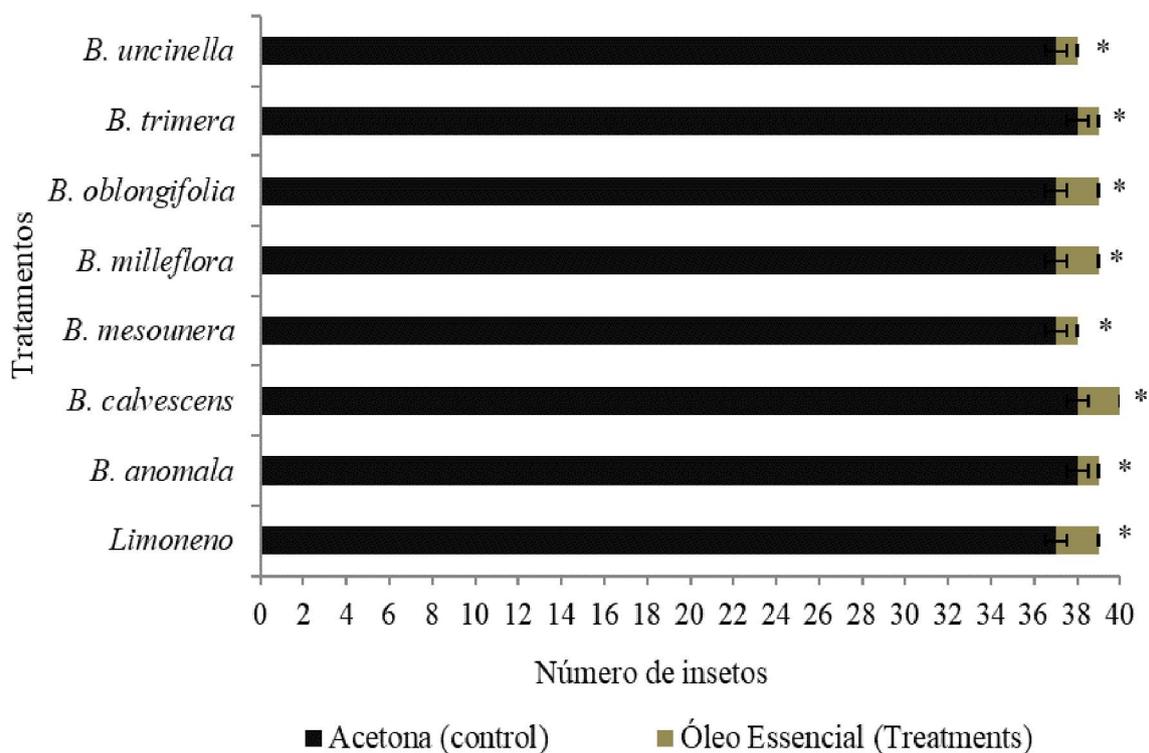


Figura 3-5- Repelência de adultos de *Drosophila sukii* em bioensaios com olfatometro de dupla-escolha.

3.4 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi verificado pela primeira vez que, os OEs extraídos por hidrodestilação das folhas de sete espécies de *Baccharis* e o constituinte individual limoneno apresentam toxicidade a adultos e larvas de *D. sukii*. Os OEs das espécies do gênero *Baccharis* são conhecidos pelo predomínio de monoterpenóides e sesquiterpenóides (Ramos Campos et al., 2016), que foram relatados como capazes de causar a mortalidade em

diferentes estágios (Chaaban et al., 2017), malformações em adultos (Chaaban et al., 2017) e repelência dos insetos (Garcia et al., 2005). Das espécies de *Baccharis* estudadas, apenas *B. trimera* possui registros na literatura de atividade inseticida dos óleos sobre pragas de produtos armazenados (Mossi et al., 2015; Charlie-Silva et al., 2019). Assim, o resultado obtido amplia o espectro da atividade bioinseticida do gênero *Baccharis* e indica o potencial de novas alternativas para o controle da *D. suzukii*, onde o uso de inseticidas sintéticos é limitado (Gargani et al., 2013).

No presente estudo, o limoneno variou sua composição química de 18,6 a 39,5% nas espécies estudadas, esclarecendo o uso potencial do óleo das folhas de *Baccharis* spp. no controle da *D. suzukii*, uma vez que esse monoterpene hidrocarboneto é utilizado para composições sinérgicas no controle de pragas (Enan, 2014). Da mesma forma, outros trabalhos conduzidos no bioma Mata Atlântica também identificaram alto teor de limoneno em *Baccharis* spp. (Lago et al., 2008; Trombin-Souza et al., 2017; Amaral et al., 2019), demonstrando a importância da padronização da composição química das amostras que podem vir a serem utilizados como ingredientes ativos em inseticidas vegetais.

O limoneno é um produto comercializado para uso no tratamento contra pulgas em animais domésticos, na forma de xampus, sprays e aerossóis (Buss e Park Brown, 2002). Testes *in vitro* evidenciaram que o limoneno suprimiu a alimentação de larvas da mariposa *Thaumetopoea pityocampa* Schiff (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) em *Pinus* spp. (Tiberi et al., 1999), reduziu a alimentação de mosca-branca, *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera) em *Solanum esculentum* L. (Schuster et al., 2009) e repeliu cupins, *Coptotermes formosanus* Shirak (Isoptera) em madeiras (Raina et al., 2010). O limoneno também é o ingrediente ativo responsável para mortalidade de vários artrópodes, incluindo o gorgulho-do-milho *Sitophilus zeamais* Motschulsky, (Coleoptera), o besouro-castanho, *Tribolium castaneum* (Coleoptera) Herbst (Fang et al., 2010), o besouro-da-batata, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera)

(Khorram et al., 2011), bem como ácaros, *Tyrophagus putrescentiae* Schrank (Acari) (Macchioni et al., 2002). Além disso, essa molécula é um potente inibidor da atividade da acetilcolinesterase (AChE) de *S. zeamais*, *T. castaneum* (Abdelgaleil et al., 2009) e do ácaro-rajado, *Tetranychus urticae* Koch (Acari) (Mohamed et al., 2010). Embora o limoneno tenha sido o principal constituinte comum encontrado em nosso estudo, observamos a presença de outros constituintes majoritários nos óleos de *Baccharis* spp., como α -tujeno, α -pineno, β -pineno, germacreno D, espatulenol. Tais constituintes podem ter contribuído com a mortalidade em *D. suzukii*, em ações sinérgicas, como demonstrado por Hummelbrunner e Isman (2001).

Como visto, os OEs afetam a fisiologia dos insetos de muitas maneiras e em diferentes receptores neurais como a acetilcolina, ácido gama-aminobutírico e octopamina. Para *D. suzukii* a maioria dos inseticidas utilizados no controle atua nos receptores da AChE ou nos canais de sódio (Shaw et al., 2019), assim produtos com um modo de ação diferente podem ser útil para evitar o desenvolvimento da resistência (Audsley e Down, 2015). População de *D. suzukii* resistente a espinosina já foi relatada na Califórnia (Gress e Zalom, 2018). Este fato é preocupante, devido a grande polifagia, curto tempo de desenvolvimento e rápida dispersão (Wollmann et al., 2019), além do risco do uso indiscriminado de inseticidas promover a resistência cruzada a outras moléculas inseticidas (Wilson, 2001; Haye et al., 2016; Gress e Zalom 2018).

Nos bioensaios de toxicidade à *D. suzukii* avaliados pelos métodos de ingestão e tópico, foi registrado que os OEs de *B. calvescens*, *B. mesounera* e *B. oblongifolia* foram as substâncias mais ativas com mortalidade à *D. suzukii* superiores a 90%, e semelhantes ao inseticida à base de espinosina, usado como controle positivo. Comparado com o inseticida botânico comercial, esses OEs tiveram \cong 16% de mortalidade superior. Os trabalhos sobre a eficácia dos inseticidas para a ordem Diptera indicam que a mortalidade deve estar entre 80 e

100%, de preferência superior a 90% (CVMP, 1993). Nesse sentido, ressalta-se que a eficácia dos EOs de *Baccharis* spp., especialmente *B. calvescens*, *B. mesounera* e *B. oblongifolia*, atendeu a esses critérios nos bioensaios de ingestão e tópico com *D. suzukii*. Tais achados podem estar relacionados a constituição lipofílica e ao baixo peso molecular dos constituintes químicos dos OEs (referencia), que favorece sua difusão de OE através da membrana celular, resultando em expansão da membrana, aumento da fluidez e permeabilidade, distúrbio da desordem da membrana ligada à proteína incorporada à membrana (Trombetta et al., 2005; Holley e Patel, 2005; Oussalah et al., 2006).

No bioensaio de aplicação tópica, foi observado que as moscas morreram em menor tempo (TL₅₀ variando 0,41 – 7,10 horas) quando comparado com os resultados obtidos no bioensaio de ingestão (TL₅₀ variando 0,55 – 48,11 horas). Essa diferença na eficácia dos óleos de *Baccharis* spp., avaliados pelos dois métodos supracitados pode ser atribuída ao fato de que os EOs aplicados topicamente penetram diretamente na hemolinfa dos insetos em uma dose única, quando comparados à mesma concentração administrada gradualmente e em pequenas quantidades ao longo do período de alimentação (24 horas). Isso também sugere que a maior toxicidade por aplicação tópica atua no sistema nervoso e /ou respiratório dos insetos, pois são as principais vias de intoxicação em substâncias absorvidas pelo tegumento. Essa informação indica que, durante o tratamento (24 horas), os alimentos permanecem mais tempo no intestino dos insetos e necessitam de um tempo para metabolização e/ou excreção do produto químico. Talvez o sistema digestivo do inseto possa metabolizar eficientemente baixas concentrações de monoterpenos e substâncias essenciais do óleo antes de atingir a hemolinfa, o sistema nervoso central ou outros órgãos-alvo do inseto (Kostyukovsky et al., 2002).

Além da toxicidade letal dos OEs de *Baccharis* spp. a adultos de *D. suzukii*, observamos atividade larvicida para a maioria das espécies de *Baccharis* estudadas, com destaque para *B.*

anomala, *B. calvescens*, *B. mesounera*, *B. milliflora* e *B. oblongifolia*, que proporcionaram mortalidade nas larvas do terceiro ínstar superiores aos controles negativos. Outros efeitos, como redução na taxa de pupação e mortalidade pupal também foram encontrados registradas para estas espécies supracitadas. Esses resultados obtidos podem estar relacionados a polaridade dos OEs (substâncias lipofílicas), pois a superfície externa das larvas é altamente lipofílica. Este fato permite que os óleos penetrem na cutícula dos insetos, interferindo em suas funções fisiológicas, conforme relatado para Chaaban et al. (2019). Corroborando com nosso trabalho, estudos mostraram que os OEs podem influenciar na biologia dos dípteros (Kumar et al, 2014; Singh e Kaur, 2016; Chaaban et al., 2018; Chaaban et al., 2019).

Em adição, os OEs de *B. calvescens*, *B. mesounera* e *B. oblongifolia* causaram efeitos subletais ao reduzir a capacidade de oviposição em até 43%. Corroborando com esses resultados, também foi demonstrado que as fêmeas de *D. suzukii* evitaram os frutos artificiais tratados quando comparados ao controle com acetona pelo teste com olfatosmetro de dupla escolha. Produtos que diminuem a oviposição e repelem fêmeas de *D. suzukii* reduz a incidência de ruptura da epiderme por oviposição, o que conseqüentemente reduz a infestação por patógenos que aumentam os processos de decomposição de frutas (Van Timmeren e Isaacs, 2013). Outro fator importante foi a redução da viabilidade dos ovos, onde os OEs de *B. calvescens* e *B. oblongifolia* ocasionaram uma redução na eclosão de $\cong 47\%$ quando comparados aos controles negativos. Essa redução do número de larvas de *D. suzukii* traz como vantagem a redução de danos causados pela alimentação dos adultos de *D. suzukii* em frutos (Bernardi et al., 2017).

Embora alguns inseticidas sintéticos, incluindo espinosinas, organofosforados e piretróides, sejam altamente tóxicos para *D. suzukii* (Andreazza et al., 2016; Shaw et al., 2019), o uso de tais produtos podem deixar resíduos químicos nas frutas e se torna mais grave pois esses produtos não são registrado para uso em o manejo de *D. suzukii* no Brasil. Existe

uma preocupação particular com esses resíduos quando os inseticidas são aplicados durante os períodos de pré-colheita das frutas, que é o período preferido para a infestação por *D. suzukii* (Bernardi et al., 2017). Além do efeito sobre *D. suzukii*, a facilidade de extração dos óleos, rápida degradação e baixo efeito residual (Isman, 2000), dos OEs presentes nas folhas de *B. calvescens*, *B. mesounera* e *B. oblongifolia* podem ser uma ferramenta adicional para uso no manejo de *D. suzukii*, como observado em outros estudos com OEs para *D. suzukii* (Erland et al., 2014). Este estudo destaca a importância de estudos futuros investigar o cultivo de *B. calvescens*, *B. mesounera* e *B. oblongifolia*, métodos de extração e processamento de bioinseticidas.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for financial support and scholarships conceived - Financing Code 001.

3.5 REFERÊNCIAS

Abad, M. J., Bermejo, P., 2007. *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc.* 7, 76–96.

Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18, 265–267.

Alves, K. F., Caetano, F. H., Pereira Garcia, I. J., Santos, H. L., Silva, D. B., Siqueira, J. M., Alves, S. N., 2018. *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) essential oil toxicity to *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). *Environ Sci Pollut Res Int.* 25, 31718-31726.

Amaral, W., Deschamps, C.; Bizzo, H.R., Pinto, M.A.S., Silva, L.E., Biasi, L.A., Freitas, T.S., Rocha, J.E., Campina, F.F., Costa, M.S., Bezerra, C.F., Coutinho, H.D.M. Essential oil of *Baccharis milleflora* in the Atlantic Rain Forest of the Paraná State in Brazil: chemical composition and biological evaluation. In: Akhtar, Mohd sayeed; Swamy, Mallappa Kumara; Sinniah, Uma Rani. (Org.). Natural Bio-active Compounds. 1ed.: 2019, v. 1, p. 599 – 608.

Andreazza, F., Bernardi, D., Baronio, C.A., Pasinato, J., Nava, D.E., Botton, M., 2016. Toxicities and effects of insecticidal toxic baits to control *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). Pest Manag Sci. 73, 146–152.

Bernardi, D., Ribeiro, L., Andreazza, F., Neitzke, C., Oliveira, E. E., Botton, M., Nava, D.E., Vendramim, J. D., 2017. Potential use of *Annona* by products to control *Drosophila suzukii* and toxicity to its parasitoid *Trichopria anastrephae*. Ind Crops Prod. 110, 30–35.

Bruck, D. J., Bolda, M., Tanigoshi, L., Klick, J., Kleiber, J., DeFrancesco, J., Gerdeman, B., Spitler, H., 2011. Laboratory and field comparisons of insecticides to reduce infestation of *Drosophila suzukii* in berry crops. Pest Manag. Sci. 67: 1375–1385

Budel, J., Wang, M., Raman, V., Zhao, J., Khan, S., Rehman, J., Techen, N., Tekwani, B., Monteiro, L.M., Heiden, G., Takeda, I.J.M., Farago, P.V., Khan, I., 2018. Essential oils of five *Baccharis* species: investigations on the chemical composition and biological activities. Molecules. 23, pii: E2620.

Buss, E.A., Park-Brown, S.G. Natural Products for Insect Pest Management. Gainesville: University of Florida/IFAS, 2002.

Charlie-Silva, I., Souza, L.M., Pereira, C.C., Mazzonetto, F., Belo, M.A.A., 2019. Insecticidal efficacy of aqueous extracts of *Ricinus communis*, *Baccharis trimera* and *Chenopodium ambrosioides* on adults of *Alphitobius diaperinus*. Ars Veterinaria. 35, 7-11.

CVMP, 1993. Demonstration of Efficacy of Ectoparasiticides. Working Party on the Efficacy of Veterinary Medicines III/3682/92-EN. Commission of the European communities, Brussels

Enan E. 2014. Synergistic pest-control compositions. U.S. Patent Application No. 12/532,604.

EPPO 2020. European and mediterranean plant protection organization (EPPO) global database. EPPO, Paris, France. <https://gd.eppo.int/taxon/DROSSU/distribution>. (Accessed 22 Fevereiro 2020).

McLafferty, F.W., Stauffer, D.B. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edn. Wiley Interscience, New York, NY, 1994.

Finney, D.J., 1971. Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press

Forzza, R.C., Baumgratz, J.F.A., Bicudo, C.E.M., Canhos, D.A.L., Junior Carvalho, A.A., Coelho, M.A.N., Costa, A.F., Costa D.P., Hopkins, P.M., Lohmann, L.G., Lughadha, E.N., Maia, L.C., Martinelli, G., Menezes, M., Morim, M.P., Peixoto, A.L., Pirani, J.R., Prado, J., Queiroz, L.P., Souza, S., Souza, V.C., Stehmann, J.R., Sylvestre, L.S., Walter, B.M.T., Zappi, D.C., 2012. New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. *BioScience*. 62, 39-45.

García, M., Donadle, O.J., Ardanaz, C.E., Tonn, C.E., Sosa, M.E., 2005. Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium cataneum*. *Pest Manag Sci*. 61, 612-618.

Gargani E., Tarchi F, Frosinini R, Mazza G, Simoni, S., 2013. Notes on *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae): field survey in tuscany and laboratory evaluation of organic products. *Redia*. 96:8xxxxx

Gress, B.E., Zalom, F.G., 2018. Identification and risk assessment of spinosad resistance in a California population of *Drosophila suzukii*. *Pest Manag Sci*. 75, 1270–1276.

Van Den Dool, H., Kratz, P.D.J.A., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A*, 11, 463–471.

Heiden, G., Schneider, A. 2015. *Baccharis* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5255>>. (Accessed 04 November 2019).

Hummelbrunner, L.A., Isman, M.B., 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera Litura* (Lep., Noctuidae). J Agr Food Chem, 49, 715–720.

Isman, M. B., Miresmailli, S., Machial, C., 2010. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. Phytochemistry Reviews, 10, 197–204.

Isman, M.B., Wilson, J.A., Bradbury, R., 2008. Insecticidal activities of commercial rosemary oils (*Rosmarinus officinalis*) against larvae of *Pseudaletia unipuncta* and *Trichoplusia ni*. in relation to their chemical compositions. Pharmaceutical Biology, 46, 82–87.

Köhler, H.R., Triebkorn, R., 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? Sci. 341, 759–765.

Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., Satya, S., 2014. Biocontrol potential of essential oil monoterpenes against housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). Ecotox Environm Saf 100, 1–6.

Lago, L.H.G.; Romoff P.; Fávero O.A., 2008. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de “Campos de Altitude” da Mata Atlântica Paulista. Química Nova. 31, 727-730.

Safaei Khorram, M., Taher Nasabi, N., Jafarnia, S., Khosroshahi, S., 2011. The toxicity of selected monoterpene hydrocarbons as single compounds and mixtures against different developmental stages of Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). Journal of Entomology. 8, 404-416.

Macchioni, F., Cioni, P.L., Flamini, G., Morelli, I., Perrucci, S., Franceschi, A., Macchioni, G., Ceccarini, L., 2002. Acaricidal activity of pine essential oils and their main components against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored food mite. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4586–4588.

Mossi, A.J., Scariot, M.A., Reichert Jr, F.W., Campos, A.C.T., Ecker, S.L., Radünz, A.L., Radünz, L.L., Cansian, R.L., Lauxen, F.R., Treichel, H., 2015. "Efeito repelente e inseticida de *Baccharis trimera* (Less) DC no controle de insetos (*Acanthoscelides obtectus*) em grãos de feijão armazenados", p. 7831-7836. In: *Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014* [= *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, v.1, n.2]. São Paulo: Blucher.

Nelder, J.A., Wedderburn, R.W.M., 1972. Generalized linear models. *J. R. Stat. Soc. Ser. A (Gen.)* 135, 370–384.

NIST Chemistry Webbook Edits., P.J. Linstrom and W.G. Mallard. <http://webbook.nist.gov> (December 2014).

Park, C.G., Jang, M., Yoon, K.A., Kim, J., 2016. Insecticidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of Lamiaceae plant essential oils and their major components against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Ind Crops Prod.* 89, 507–513.

R, D.C.T, 2012. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna (Online:). <https://http://www.r-project.org/>.

R.P. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th edn. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL (2007).

Raina, A., Bland, J., Doolittle, M., Lax, A., Boopathy, R., Folkins, M., 2010. Effects of orange oil extract on the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). **J. Econ. Entomol.**, 100, p.880-885.

Ramos Campos, F., Bressan, J., Jasinski, V. C. G., 2016. *Baccharis* (Asteraceae): chemical constituents and biological activities. *Chem. Biodivers.* 13, p. 1–17.

Renkema, J.M., Wright, D., Buitenhuis, R., Hallett, R.H., 2016. Plant essential oils and potassium metabisulfite as repellents for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). Sci Rep. 6, 21432.

Ribeiro, M.C., Martensen, A.C., Metzger, J.P., Tabarelli, M., Scarano, F., Fortin, M.J., 2011. The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot. In: Zachos FE, Habel JC, editores. Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas. Heidelberg: Springer.

SAS Institute, 2011. Statistical Analysis System: Getting Started with the SAS Learning, 9.2 ed. SAS Institute, Carry, NC.

Schlesener, D.C.H., Wollmann, J., Krüger, A.P., Nunes, A.M., Bernardi, D., Garcia, F.R.M., 2018. Biology and fertility life table of *Drosophila suzukii* on artificial diets. Entomol Exp Appl. 166, 932-936.

Schlesener, D.C.H., Wollann, J., Kruger, A.P., Martins, L.N., Geisler, F.C., Garcia, F.R.M., 2017. Rearing method for *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) on artificial culture media. Drosoph. Inf. Serv. 100, 185-189.

Schuster, D.J., Thompson, S., Ortega, L.D., Polston, J.E., 2009. Laboratory evaluation of products to reduce settling of sweetpotato whitefly adults. **J. Econ. Entomol.**, 102, 1482–1489.

Shaw, B., Hemer, S., Cannon, M.F.L., Rogai, F., Fountain, M.T., 2019. Insecticide control of *Drosophila suzukii* in commercial sweet cherry crops under cladding. Insects. 10, pii: E196.

Singh, A., Kaur, J., 2016. The bioefficacy of crude extracts of *Azadirachta indica* (Meliaceae) on the survival and development of myiasis-causing larvae of *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae). Trop Anim Health Pro, 48, 117–124.

Sosa, M.E., Tonn, C. E., Giordano, O.S., 1994. Insect antifeedant activity of clerodane diterpenoids. J. Nat. Prod., 57, 1262–1265.

Trombin-Souza, M., Trombin-Souza, M., Amaral, W., Pascoalino, J. A. L., Oliveira, R. A., Bizzo, H. R., Deschamps, C., 2017. Chemical composition of the essential oils of *Baccharis* species from southern Brazil: a comparative study using multivariate statistical analysis. *J. Essent. Oil Res.*, 29, 400–406.

Walsh, D. B. et al., 2011. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. *J. Integ. Pest Manage.* 2, 1–7.

Wollmann, J., Schlesener, D.C.H., Vieira, J.G.A., Bernardi, D., Garcia, M.S., Garcia, F.R.M., 2019. Evaluation of food baits to capture *Drosophila suzukii* in the southern of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 91, e20180375.

Zanardi, O.Z., Ribeiro, L.d.P., Ansante, T.F., Santos, M.S., Bordini, G.P., Yamamoto, P.T., Vendramim, J.D., 2015. Bioactivity of a matrine-based biopesticide against four pest species of agricultural importance. *Crop Prot.* 67, 160–167.

RESEARCH ARTICLE

4 Chemical composition of essential oils of selected species of *Piper* and their insecticidal activity against *Drosophila suzukii* and *Trichopria anastrephae**

Michele Trombin de Souza¹ & Mireli Trombin de Souza¹ & Daniel Bernardi² & Diones Krinski³ & Douglas José de Melo¹ & Daiana da Costa Oliveira² & Matheus Rakes² & Paulo Henrique Gorgatti Zarbin⁴ & Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia⁴ & Maria Aparecida Cassilha Zawadneak¹

Received: 11 November 2019 / Accepted: 27 January 2020
#Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

The present study aimed to analyze the chemical composition of five species of the genus *Piper* (*P. aduncum* L.; *P. crassinervium* Kunth.; *P. malacophyllum* Priesl.; *P. gaudichaudianum* Kunth.; *P. marginatum* L.), and assess their toxicity to the adults of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) and the pupal parasitoid *Trichopria anastrephae* Lima (Hymenoptera: Diapriidae). The major compounds were monoterpene hydrocarbons (5.3–60.9%); oxygenated monoterpenes (13.3%); sesquiterpenes hydrocarbons (8.3–45.3%), oxygenated sesquiterpenes (5.2–58.8%); and arylpropanoids (15.2–29.6%). In bioassays of ingestion and topical application, essential oils (EOs) from *P. aduncum*, *P. gaudichaudianum*, and *P. marginatum* killed approximately 100% of adults of *D. suzukii*, similarly to the insecticide based on spinetoram (75 mg L⁻¹) (96.2% of mortality). Besides, the dry residues from *P. aduncum*, *P. gaudichaudianum*, and *P. marginatum* provided a repellent effect on oviposition (\cong 7 eggs/fruits) and negative effects on egg viability (\cong 2 larvae/fruits) of *D. suzukii* on artificial fruits. Based on the estimate of the lethal concentration required to kill 90% of exposed flies, EOs from *P. aduncum*, *P. crassinervium*, *P. gaudichaudianum*, *P. malacophyllum*, and *P. marginatum* provided low toxicity to the parasitoid *T. anastrephae* in a bioassay of ingestion and topical application (mortality < 20%), similarly to the water treatment (\cong 5% of mortality). EOs of *Piper* species tested in this work showed to be promising plant insecticides for the management of *D. suzukii*.

Keywords: Spotted wing drosophila · *Piper* sp. · Sustainable pest management · Endoparasitoid pupal

*De Souza, M. T., de Souza, M. T., Bernardi, D., Krinski, D., de Melo, D. J., da Costa Oliveira, D., ... Zawadneak, M. A. C. (2020). Chemical composition of essential oils of selected species of *Piper* and their insecticidal activity against *Drosophila suzukii* and *Trichopria anastrephae*. **Environmental Science and Pollution Research**. doi:10.1007/s11356-020-07871-9

4.1 Introduction

The genus *Piper* belongs to the family Piperaceae and is comprised of more than 2000 species, occurring in tropical and subtropical regions of Africa, America, and Asia. Its largest centers of biodiversity are located in South America, specifically in Brazil, which contains 290 species cataloged (Dhifi et al. 2016). Most Piperaceae produces expressive amounts of secondary metabolites with insecticidal properties, such as alkaloids, flavonoids, and terpenes, which are identified as major active principles (Mgbeahuruike et al. 2017). Among the terpenes are essential oils (EOs), which are lipophilic and volatile substances extracted from different parts of plants (Dhifi et al. 2016).

In the agricultural sector, studies on compounds derived from plants have focused on obtaining molecules to synthesize new insecticides against molecular targets (Cantrell et al. 2012). Within this context, studies on EOs have shown to be promising for the management of different pest arthropods (Erland et al. 2015; Renkema et al. 2016). This fact can be very important for the management of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae), considered the primary pest of small fruits in Brazil (Deprá et al. 2014; Andreazza et al. 2017a).

However, for the management of *D. suzukii*, the use of synthetic insecticides is still the most adopted strategy (Haviland and Beers 2012; Van Timmeren and Isaacs 2013; Andreazza et al. 2017b). Thus, bioinsecticides can be an environmentally safe alternative to the use of synthetic pesticides in orchards and a rational biological strategy (Kumar 2015; Bernardi et al. 2017). Its use can be applied, mainly, in the sectors of organic production of fruits where there is the prevalence of *Trichopria anastrephae* Lima (Hymenoptera: Diapriidae), a pupal parasitoid of *D. suzukii* of higher occurrence in the small fruit orchards in Brazil (Wollmann et al. 2016).

Therefore, this study aimed to identify the chemical composition of the EOs of *Piper* spp. and to evaluate the lethal toxicity of the products on adults of *D. suzukii* via ingestion and topical application. Also, the effects of product residues in the oviposition behavior of *D. suzukii* and the selectivity on the pupal parasitoid *T. anastrephae* in comparison to a spinosyn insecticide were analyzed.

4.2 Material and Methods

Plant material and isolation of the essential oils (EOs)

Information on the collection site of the *Piper* species is summarized in Table 1. The species were identified by Dr. Micheline Carvalho-Silva, University of Brasília (UnB), Distrito Federal, Brazil, and deposited in the Tangará Herbarium (TANG), State University of Mato Grosso, Mato Grosso State, Brazil. To obtain the EOs, the collected leaves were oven dried at 50 °C for 96 h and then ground to obtain leaf powders using a knife mill. The leaves' powders (50 g), in triplicate, were submitted to hydrodistillation in an apparatus of the type Clevenger (Vidrolabor, São Paulo, Brazil), during 4 h. Subsequently, the EO was collected and dried with anhydrous sulfate. The samples were kept in a freezer at –20 °C until the chemical analyses were conducted.

Chemical analysis

The gas chromatography (GC) coupled to mass spectrometry (GC/MS) was carried out in a Shimadzu CG-2010 gas chromatograph coupled to a Shimadzu QP2010 Plus mass selective detector. The GC was fitted with an RTX-5 fused capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness, Restek Chromatography Products, USA). Helium was used as the carrier gas, at a flow rate of 1.0 mL/min. Temperature programming was set to 60–240 °C at

the rate of 3 °C/min, heated to 240 °C, and held at this temperature for 10 min. The injector temperature was kept at 250 °C. EOs samples were diluted to a 1% solution in dichloromethane, and 1.0 µL of the solution was injected with a split ratio of 1:20. The mass detector was operated in electron ionization mode (70 eV) at a rate of 3.15 scan/min and a scan range of 40–450 Da. The transfer line was maintained at 260 °C, the ion source at 230 °C, and the analyzer (quadrupole) at 150 °C. For the quantification, the EOs were injected in an Shimadzu CG-2010 gas chromatograph fitted with FID operated at 280 °C. Synthetic air was used as the carrier gas, at a flow rate of 1.0 mL/min, using the same column and conditions as described above. The quantification of each constituent was estimated by electronic integration of the FID signal with the corresponding peak area, which was determined based on the average of three injections (Table 1). The identification of the components of the EOs was carried out by comparison of the mass spectra with those from commercial libraries (McLafferty and Stauffer 1989) and also by their linear retention indexes (Van Den Dool and Kratz 1963), after the injection of a homologous series of *n*-alkanes (C₈ – C₂₆), under the same experimental conditions, and compared to literature data (Adams 2007).

Rearing and maintenance of *D. sukuzii* and *T. anastrephae*

Specimens of *D. sukuzii* (10th generation) and *T. anastrephae* (25th generation) used in the bioassays were obtained from maintenance rearing established in a climatized room at 25 °C ± 1 °C, 70% ± 5% RH, and photoperiod of 12:12 h (light: dark). Specimens of *D. sukuzii* were bred in test tubes (2.5 cm in diameter × 8.5 cm in length) containing artificial diet based on corn flour and buffered with hydrophilic cotton, following the methodology proposed by Schlesener et al. (2018).

Treatments

Solutions (0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1.0; 1.5; 2.0%) of the Eos *P. aduncum*, *P. crassinervium*, *P. malacophyllum*, *P. gaudichaudianum*, and *P. marginatum* were prepared by dissolving them in a Tween® 20 solution of adjuvants (20 ethoxylated sorbitan monolaurate, EO—C₅₈H₁₁₄O₂₆). As positive controls, a synthetic insecticide based on spinosyn (Spinetoram–Delegate 250 WG™, 7.5 g active ingredient (a.i.) L⁻¹) and the limonoid-based bioinsecticide (Openeen Plus® 1.2 EC azadirachtin + 3-tigloil-azadiractol, 1.2 mL of a.i. L⁻¹) were used. As negative controls, either water or Tween® 20 were used.

Toxicity of *Piper* spp. essential oils against *D. suzukii*

For the bioassays of topical application, adults of *D. suzukii* (ten couples) from the maintenance breeding were separated and placed into transparent glass tubes (1.3 cm in diameter × 10 cm in length), sealed on the top with hydrophilic cotton (Bernardi et al. 2017). Subsequently, the insects were sedated at 2 °C for 40–60 s. Then, the insects were placed in a Petri dish (9 cm in diameter) and sprayed using a “Potter’s Tower” (Burkard Scientific Uxbridge, UK), applying 2 mL of EO per sample unit to a working pressure of 7 lb. in⁻², resulting in an average residue deposition of 1.0 mg cm². After spraying, the flies were placed inside transparent plastic cages (500 mL) as described previously and fed with artificial diet and distilled water throughout the evaluation period. The experimental design was completely randomized, with nine treatments containing four replicates (cages) with 20 adults of *D. suzukii* (ten females and ten males) (n = 720). Mortality in each treatment was assessed at 1-h intervals for the first 24 h after exposure to treatments (HAET) and every 24 h after that from 24 to 120 HAET. Insects that did not react at the touch of a fine-tipped brush were considered dead. Corrected mortality was calculated using the equation of Henderson and Tilton (1955).

Tabela 4-1- Insecticides evaluated for the management of *Drosophila suzukii* and the geographic coordinates of *Piper* species

Treatments	Description ^a	Proceedings Geographic coordinates	Voucher (TANG) ^b	Discriminatory concentration tested ^c	Origin/manufacturer
Delegate® 250WG™	Spinetoram (250 g Kg ⁻¹)			75	Dow AgroSciences Industrial LLC, (São Paulo, SP, Brazil)
<i>Piper aduncum</i> EO	Essential oil extracted from the leaves of <i>Piper aduncum</i> L. (pre-commercial)	7°07'43.56"S 55°23'22.09"W	6858	2	Laboratory extraction and formulation (Curitiba, Paraná, Brazil) ^d
<i>Piper crassinervium</i> EO	Essential oil extracted from the leaves of <i>Piper crassinervium</i> Kunth (pre-commercial)	22°51'37.19"S 48°26'14.32"W	6841	20	Laboratory extraction and formulation (Curitiba, Paraná, Brazil)
<i>Piper gaudichaudianum</i> EO	Essential oil extracted from the leaves of <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth (pre-commercial)	25°29'41.6"S 49°00'50.6"W	6865	2	Laboratory extraction and formulation (Curitiba, Paraná, Brazil)
<i>Piper malacophyllum</i> EO	Essential oil extracted from the leaves of <i>Piper malacophyllum</i> Pels. (pre-commercial)	7°06'56.31"S 55°24'22.19"W	6836	2	Laboratory extraction and formulation (Curitiba, Paraná, Brazil)
<i>Piper marginatum</i> EO	Essential oil extracted from the leaves of <i>Piper marginatum</i> L. (pre-commercial)	7°07'43.56"S 55°23'22.09"W	4646	2	Laboratory extraction and formulation (Curitiba, Paraná, Brazil)
Openeen Plus® 1.2 EC	Limonene (250 mg L ⁻¹)			250 ^c	Bioscience, LLC (São Paulo, São Paulo, Brazil)

^a Laboratory of Ecophysiology, Federal University of Paraná (Extraction) and Laboratory of Semiochemistry, Federal University of Paraná (Formulation), Paraná State, Brazil; ^b Tangará Herbarium (TANG), State University of Mato Grosso, Campus Tangará, Mato Grosso State, Brazil; ^c Concentration: 75 mg of commercial product per L of water (Delegate®); 250 mL of commercial product per L of water (Openeen Plus®); 2% of essential oils per 2 mL of Tween® 20

Concentration-response curves against *D. suzukii*

Based on the results from this initial test, the most promising treatment (*P. aduncum*, *P. crassinervium*, *P. gaudichaudianum*, and *P. marginatum*) and the positive control (spinetoram and limonene) were evaluated further to estimate the concentration required to kill 50% and 90% of exposed flies (lethal concentration (LC); LC₅₀ and LC₉₀, respectively). For this purpose, seven concentration values were tested for each treatment (between 0.2% and 2.0% EOs; 5–75 mg L⁻¹ spinetoram; 25–250 mg L⁻¹ of limonene). The mode of exposure was based on Finney (1971). The procedures and criteria of exposure and assessment were identical to those of the initial tests (“Toxicity of *Piper* spp. essential oils against *D. suzukii*”). In the bioassays of ingestion, five replicates with 16 flies ($n = 80$) were used for each concentration of each product ($n = 560$), whereas in the bioassays of topical application four replicates of 20 flies ($n = 80$) were used for each concentration of each product ($n = 560$).

Effects of EOs of *Piper* spp. in oviposition and larval viability of *D. suzukii*

For this purpose, artificial fruits were prepared with agar (19 g), raspberry gelatin (10 g), methylparaben (Nipagin®; 8 mL; 0.8 g dissolved in 8 mL of 99.9% absolute ethyl alcohol), and distilled water (refluxed; 850 mL), in accordance with the adapted method proposed by Schlesener et al. (2018). On each artificial fruit, the flies were sprayed using a “Potter’s Tower,” applying 1 mL of EO (from *P. aduncum*, *P. crassinervium*, *P. malacophyllum*, *P. gaudichaudianum*, *P. marginatum*) per sample unit to a working pressure of 7 lb in⁻², resulting in an average residue deposition of 0.4 mg cm². Then, the artificial fruits were conditioned for 3 h in a climatized room (25 °C ± 2 °C, 70% ± 10% RH) and 12 h photophase to evaporate excess moisture and, consequently, the residual deposition. Subsequently, the artificial fruits were placed individually into a plastic container (250 mL), top-coated with voile

tissue (10 cm in diameter) for gas exchange of the inner and external environment. Subsequently, five couples of *D. sukuzii* (\cong 7 days old) were added for mating and oviposition. After 24 h, the adults were removed, and the eggs were counted on each artificial fruit using a stereoscopic microscope (\times 40). The experimental design was completely randomized, with 30 replicates per treatment.

Toxicity of *Piper* spp. essential oils against *T. anastrephae*

To evaluate the toxicity of the active treatments on the wasp *T. anastrephae*, parasitoid of *D. sukuzii*, the LC₅₀ and LC₉₀ values of the formulated *P. aduncum*, *P. crassinervium*, *P. gaudichaudianum*, *P. marginatum*, Openeen Plus[®] 1.2 EC, and Delegate[®] 250 WGTM were used in each exposure procedure, which were determined from the concentration-response curves at 120 h. Adult wasps were submitted to both exposure procedures described in the “Effects of EOs of *Piper* spp. in oviposition and larval viability of *D. sukuzii*.” Wasp mortality was evaluated at 120 h following the first exposure using the same criteria for assessing death in *D. sukuzii*, described in the “Toxicity of *Piper* spp. essential oils against *D. sukuzii*.” The experimental design was completely randomized with four replicates, each replicate being composed of 20 pairs of *T. anastrephae* ($n = 80$)

Statistical analysis

Generalized linear models of the exponential family of distributions (Nelder and Wedderburn 1972) were used for the analyses of studied variables. When there were significant differences among treatments, multiple comparisons (Tukey’s test, $p < 0.05$) were performed using the glht function of the Multicomp package, with adjustment of p

values. All analyses were performed using the “R” statistical software version 2.15.1 (R Development Core Team 2012). A binomial model with a complementary log-log link function (gompit model) was used to estimate the lethal concentrations (LC₅₀ and LC₉₀), utilizing the Probit Procedure in SAS version 9.2 (SAS Institute 2011).

4.3 Results

A total of 36 chemical constituents were identified in samples of *Piper* spp. EOs, with the number of peaks detected varying between six (*P. gaudichaudianum*) and 19 (*P. crassinervium*) (Table 2). These constituents were grouped into monoterpene hydrocarbons (5.3–60.9%); oxygenated monoterpenes (13.3%); sesquiterpenes hydrocarbons (8.3–45.3%); oxygenated sesquiterpenes (5.2–58.8%); and arylpropanoids (15.2–29.6%) (Fig. 1; Table 2).

In bioassay of ingestion at 120 HAET, *P. marginatum* (78.4% of mortality), *P. aduncum* (80.0% of mortality), *P. gaudichaudianum* (80.0% of mortality), and spinetoram (82.4% of mortality), provided the highest toxicities ($F = 24.18$; $df = 8, 18$; $p < 0.0001$) against *D. sukii* adults compared to *P. malacophyllum* (47.5% of mortality), *P. crassinervium* (50.7% of mortality), and limonene botanic insecticide (43.0% of mortality) (Fig. 2). This toxicity behavior was similar in bioassay of topical application, with *P. marginatum* (100.0% of mortality), *P. aduncum* (100.0% of mortality), *P. gaudichaudianum* (98.5% of mortality), and spinetoram (98.5% of mortality) ($F = 17.19$; $df = 8, 18$; $p < 0.0001$) when compared to *P. malacophyllum* (36.2% of mortality), *P. crassinervium* (63.27% of mortality), and limonene botanic insecticide (71.2.0% of mortality) (Fig. 2).

Tabela 4-2- Essential oil composition (%) of the leaf samples leaves of *Piper* species.

Constituents	RI ^{lit}	RI ^{cal}	<i>Piper</i> species (% peak area)				
			S1	S2	S3	S4	S5
1. α -pinene	926	924	---	2.58	---	---	---
2. β -pinene	932	938	---	1.79	---	---	---
3. α -phellandrene	1005	1003	---	0.93	---	---	---
4. α -terpinene	1014	1006	---	---	---	12.98	---
5. p-cymene	1025	1023	---	---	---	11.96	---
6. (<i>Z</i>)- α -ocimene	1044	1041	2.37	---	---	---	3.97
7. (<i>E</i>)- β -ocimene	1044	1046	5.98	---	---	---	5.95
8. γ -terpinene	1054	1052	---	---	---	28.32	---
9. terpinolene	1086	1086	---	---	---	7.60	---
Monoterpenes hydrocarbons			8.35	5.30	---	60.86	9.92
10. kakuol	1542	1543	---	---	---	---	13.26
Oxygenated monoterpenes			---	---	---	---	13.26
11. (<i>E</i>)-caryophyllene	1417	1420	---	8.45	3.71	---	---
12. β -caryophyllene	1424	1422	---	---	---	---	5.84
13. alloaromadendrene	1440	1440	5.43	1.60	---	---	---
14. α -humulene	1454	1454	5.85	3.20	---	---	---
15. γ -muurolene	1478	1475	---	3.00	---	---	---
16. β -selinene	1489	1489	---	10.40	---	---	9.50
17. viridiflorene	1496	1498	---	---	---	8.15	---
18. bicylegermacrene	1500	1503	5.05	2.36	4.63	---	---
19. germacrane B	1500	1500	19.08	5.20	---	---	---
20. valencene	1503	1502	---	---	---	9.32	6.70
21. γ -cadinene	1518	1518	---	1.58	---	---	---
22. α -amorphene	1525	1525	4.63	5.97	---	---	---
Sesquiterpene hydrocarbons			40.04	41.76	8.34	17.47	22.04
23. elemol	1547	1547	---	3.56	---	---	---
24. (<i>E</i>)-nerolidol	1562	1568	---	4.15	5.31	---	---
25. spathulenol	1577	1579	5.35	---	---	---	---
26. globulol	1590	1593	6.08	3.43	---	---	---
27. guaiol	1600	1600	---	6.12	---	---	---
28. 1-epi-cubenol	1624	1621	---	---	25.05	---	---
29. α -muurolol	1644	1641	---	2.16	---	---	---
30. α -cadinol	1552	1550	---	2.07	---	---	---
31. 7-epi- α -eudesmol	1658	1652	---	11.12	---	---	---
32. bulnesol	1666	1666	---	---	---	5.23	---
33. α -cadinol	1678	1672	---	1.84	---	---	---
34. Eudesm-7(11)-en-4-ol	1683	1681	---	---	28.40	---	---
35. myristicin	1517	1512	---	---	15.19	---	12.76
36. sarisan	1525	1521	---	---	---	---	12.35
37. elemicin	1554	1554	---	---	---	---	4.48
Arylpropanoids			---	---	15.19	---	29.59
Total			59.82	81.51	82.29	83.56	74.81

RI^{lit} Literature Retention Index, RI^{cal} Experimental Retention Index Species: S1 *P. aduncum*; S2 *P. crassinervium*; S3 *P. gaudichaudianum*; S4 *P. malacophyllum*; S5 *P. marginatum*.

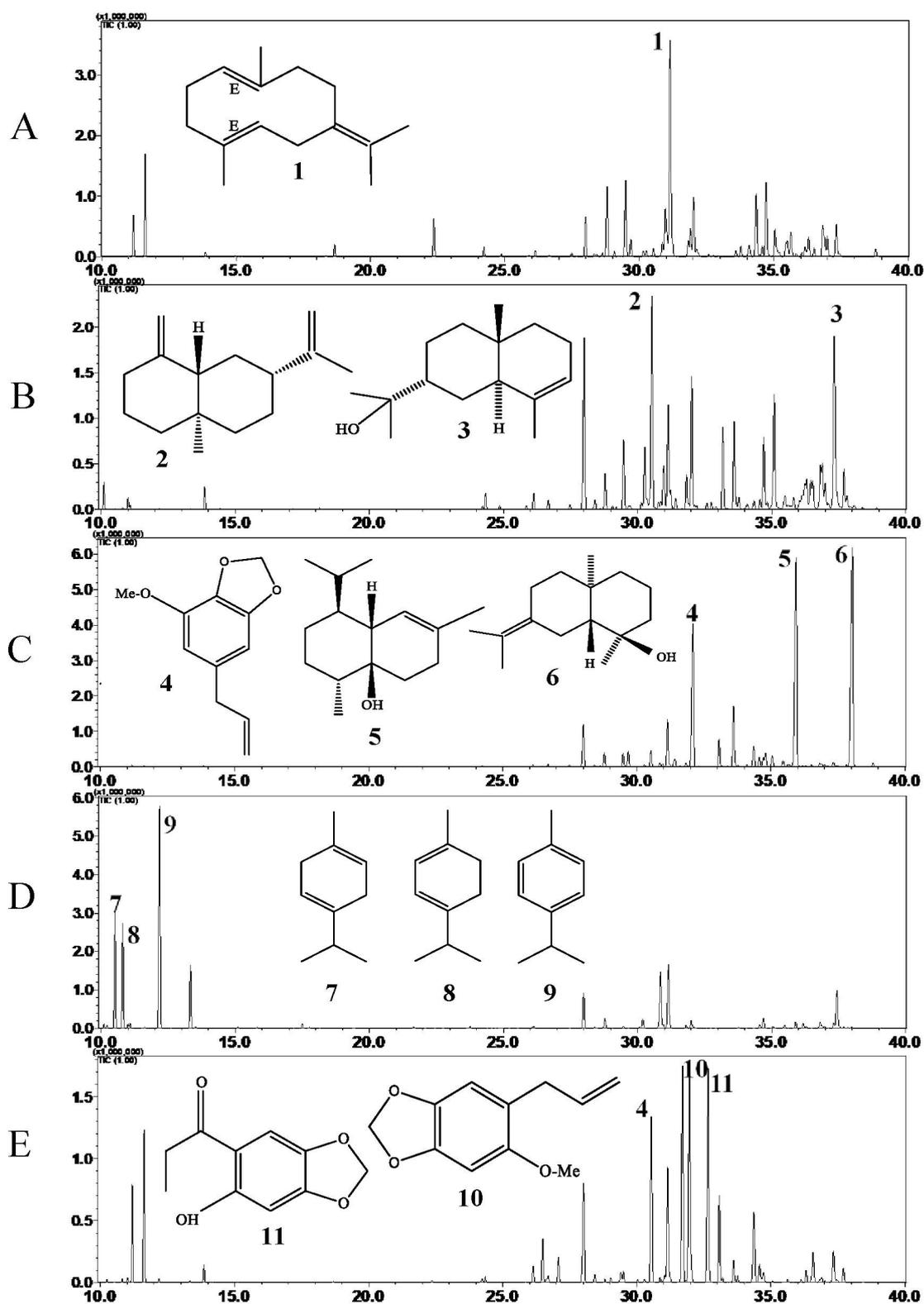


Figure 4-1- Major constituents found in the essential oils of *Piper aduncum* (A), *Piper crassinervium* (B), *Piper gaudichaudianum* (C), *Piper malacophyllum* (D), and *Piper marginatum* (E). 1) germacrene B; 2) β -selinene; 3) 7-epi- α -eudesmol; 4) myristicin; 5) 1-epi-cubenol; 6) eudesm-7(11)-en-4-ol; 7) α -terpinene; 8) α -terpinene; 9) p-cymene; 10) sarisam; 11) kakuol.

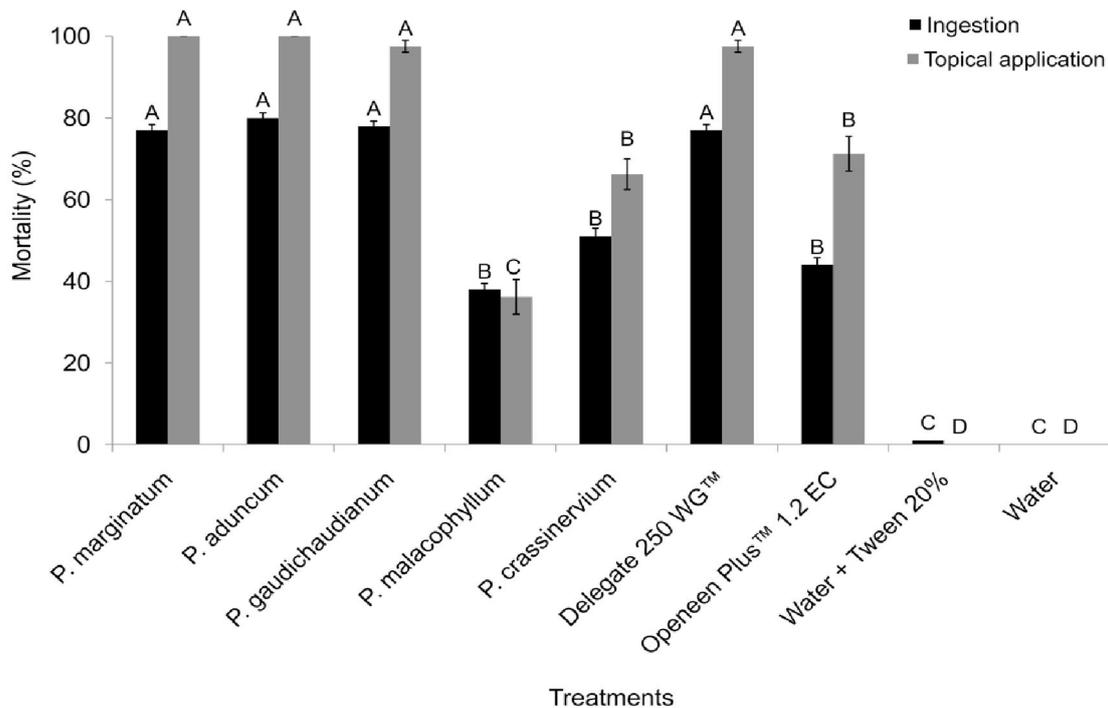


Figura 4-2- Mortality (%) (average \pm standard error) of *D. suzukii* adults at 120 h after exposure to treatments (HAET) in the ingestion and topical application bioassays.

Means followed by the same letter in the columns did not differ by the Tukey's test

Based on the estimates of the concentration-response curves and in the overlap of confidence intervals, there was no significant difference between EOs extracted from *Piper* spp., in the values of LC_{50} and LC_{90} , in ingestion and topical application bioassays against *D. suzukii* adults (Table 3). However, the EOs extracted from *Piper* spp. presented a higher toxicity (LC_{50} and LC_{90}) in relation to limonene botanic and spinetoram insecticide (Table 3).

Considering the effect on oviposition of *D. suzukii*, only the limonene botanic insecticide did not cause significant reduction in the number of eggs per female of *D. suzukii* in artificial fruits (Fig. 3). However, all other treatments *P. marginatum*

(7.32 eggs/fruit), *P. aduncum* and *P. gaudichaudianum* (7.4 eggs/fruit), *P. malacophyllum*, and *P. crassinervium* (13.6 eggs/fruit), and spinetoram (7.4 eggs/fruit) provided significant reduction ($F = 17.55$; $df = 8, 36$; $p < 0.0001$) in the mean number of eggs per female of *D. suzukii* in relation to the control treatment (20.46 eggs/fruit) (Fig. 3). In relation to toxicity against *T. anastrephae* adults, all the treatments with EOs of *Piper* spp. in ingestion ($F = 21.12$; $df = 7, 18$; $p < 0.0001$) and topical application bioassay ($F = 14.05$; $df = 7, 18$; $p < 0.0001$) provided mortality below 20% of insect, up to 120 HAET, similar ($p = 0.05$) to control treatment (Fig. 4). However, both treatments differed significantly ($F = 14.05$; $df = 7, 18$; $p < 0.0001$) from spinosyn-based insecticide (mortality greater than 30%) (Fig. 4).

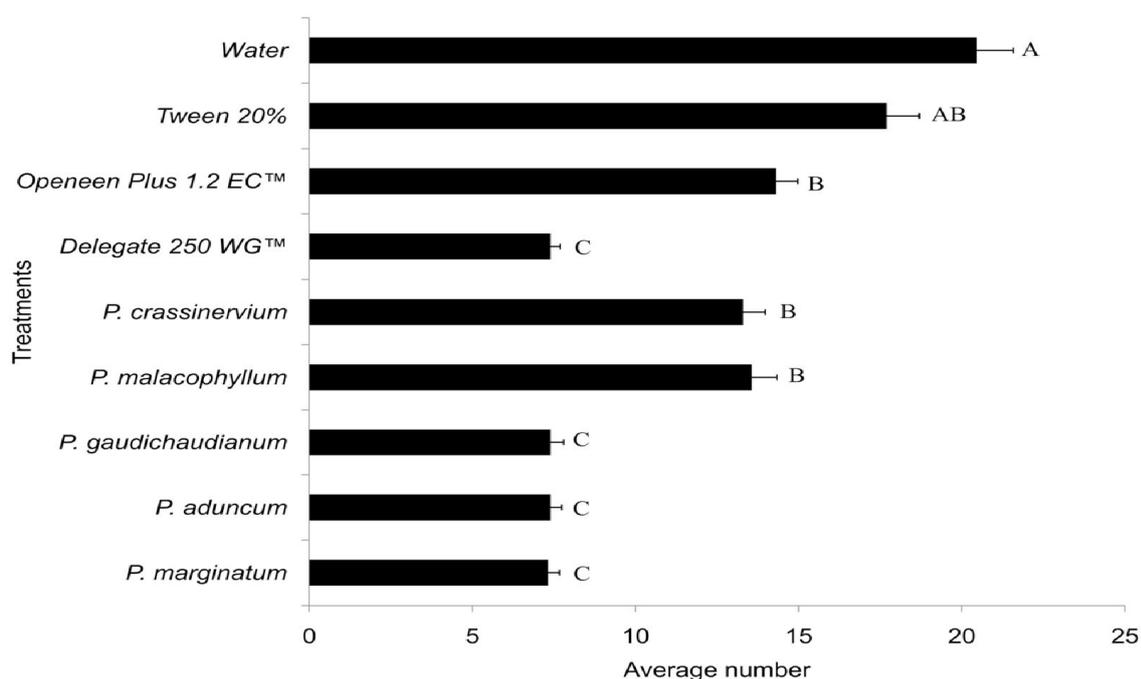


Figura 4-3- Effects of the essential oils from of *Piper* spp., spinetoram (Delegate 250 WG™) and limonene (Openeen Plus 1.2 EC™) in the oviposition of *D. suzukii* on artificial fruits.

Bars with the same letter in columns are not significantly different (GLM with a quasi-binomial distribution followed by Tukey post hoc test: $p < 0.05$)

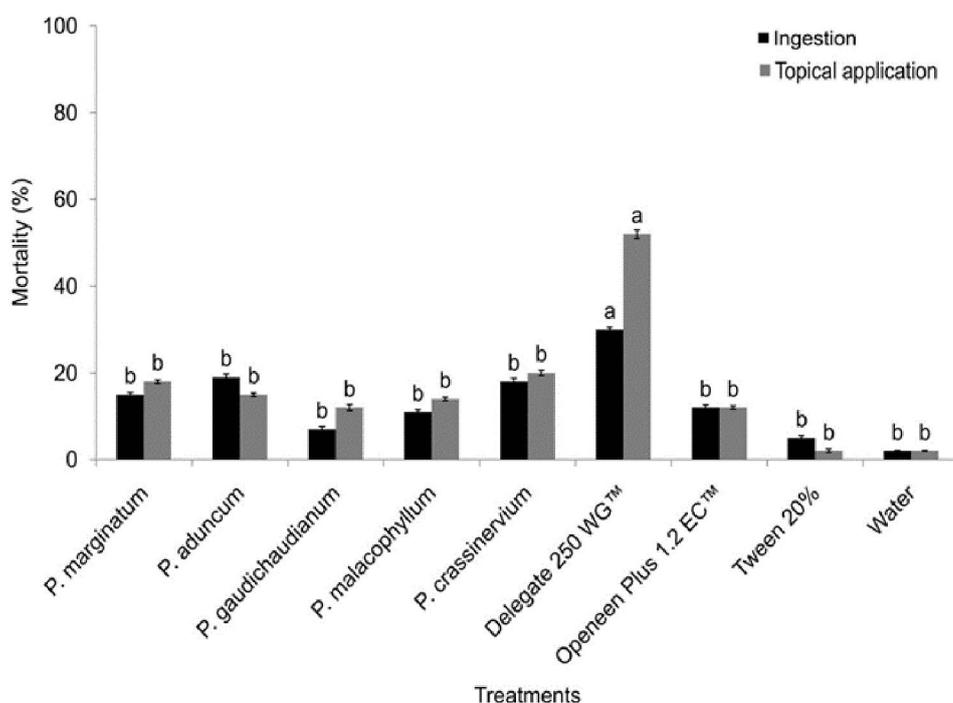


Figura 4-4- Mortality (%) (average \pm standard error) of *T. anastrephae* adults at 120 h after exposure to treatments in ingestion and topical application bioassays.

Bars with the same letter in columns not significantly different (GLM with a quasi-binomial distribution followed by the Tukey post hoc test, $p < 0.05$)

4.4 Discussion

This is the first study to investigate the toxicity and the deterrence of oviposition of EOs of *Piper* plant species for the myristicin, 1-*epi*-cubenol, and eudesm-7(11)-en-4-ol (*P. gaudichaudianum*); α -terpinene, *p*-cymene (*P. malacophyllum*); myristicin, sarisan, kakuol (*P. marginatum*). In line with our study, *Piper* species have previously been reported as containing high amounts of monoterpene hydrocarbons (α -terpinene and α -terpinene), sesquiterpene hydrocarbons (β -selinene and germacrene B), oxygenated sesquiterpenes (eudesm-7(11)-en4-ol), and and arylpropanoids (myristicin and elemicin) (Krinski et al. 2018). As expected, the analyzed EOs contained all chemical

compounds published in the literature for species of the genus (Dhifi et al. 2016; Silva et al. 2017; Krinski et al. 2018). The synergism of all EOs molecules or only the major constituents determines the desired biological properties of *Piper* spp.; among them, the insecticidal effect in the feeding deterrence (Coitinho et al. 2011), its ovicidal properties (Krinski and Foerster 2016; Krinski et al. 2018), inhibiting growth (Piton et al. 2014), repellency, and toxicity (Turchen et al. 2016).

Toxicity of EOs in arthropods has been commonly related to their lipophilic constitution and the low molecular weight of their constituents. This favors EO diffusion through the cell membrane, resulting in membrane expansion, increased fluidity and permeability, disturbance of membrane-embedded protein, inhibition of respiration, and alteration of the ion transport process (Oussalah et al. 2007). Jankowska et al. (2017) reported that EOs act on neurotoxic compounds by inhibiting AChE activity, modifying gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors, and as ligands of octopamine receptors. For *D. suzukii*, most of the products used in its control act on AChE receptors or sodium channels (Casida and Durkin 2012). This indicates that the prospection of products with a different action mode can be used in the management of this pest to generate rotation with other molecules and thus avoid the emergence of resistant insects (Bruck et al. 2011; Biondi et al. 2012; Van Timmeren and Isaacs 2013). To date, populations of *D. suzukii* resistant to spinosad were reported only in Watsonville, CA, USA (Gress and Zalom 2018). However, polyphagia (Lee et al. 2015; Poyet et al. 2015), a short generational time (Asplen et al. 2015), and rapid dispersion (Haye et al., 2016) associated with the continued use of insecticides increase the likelihood for resistance to evolve in other insecticidal molecules (Haye et al. 2016; Gress and Zalom 2018). Thus, we verified that the lethal toxicity of the EOs from *P. aduncum*, *P. gaudichaudianum*, and *P. marginatum* was equivalent to that of the chemical spinetoram insecticide. In the bioassay with topical application, the insects

died faster than by the bioassay of ingestion. The findings, corroborating with another study that showed the topical application method of the EO from *P. aduncum* as more effective for *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) (Estrela et al. 2006). This difference in the efficacy of the EOs evaluated by the two methods can be attributed to the fact that the EOs topically applied directly penetrate the hemolymph of the insects in a single dosage, when compared to the same concentration administered gradually and in small amounts throughout the feeding period (8 h). This also suggests that the higher toxicity by topical application acts on the nervous and/or respiratory system of the insects since they are the main routes of intoxication in substances absorbed by the integument (Jankowska et al. 2017). Besides, foods in the digestive tract of insects need time for metabolization and/or excretion of the chemical. This information may be useful for the future synthesis of plant-borne insecticides with feeding deterrence properties, as no economically viable products possessing this characteristic have been developed thus far.

We also found that all tested EOs had beneficial sublethal effects by preventing oviposition of *D. suzukii* females and negatively affecting embryo viability, especially from *P. aduncum*, *P. gaudichaudianum*, and *P. marginatum*. Dry residues of these EOs had behavioral effects, causing *D. suzukii* females to avoid oviposition on the surface of the artificial fruits treated with the EOs when compared to the negative controls (water or Tween® 20). Similar behavior of avoiding oviposition on strawberries was reported for *D. suzukii* after spraying the botanical insecticide with *Anona mucosa* Jacq. (Bernardi et al. 2017). The use of products that diminish oviposition of *D. suzukii* on the fruits results in a lower amount of rupture experienced on the epidermis of the fruit, which consequently reduces pathogen infestation and fruit deterioration (Mitsui et al. 2006; Calabria et al. 2012). Moreover, the reduction of the number of *D. suzukii* larvae may contribute to the reduced damage caused by the feeding of these flies.

Another factor that may contribute positively to the management of *D. suzukii* was the low toxicity of the EOs from *P. aduncum*, *P. gaudichaudianum*, and *P. marginatum* to the wasp parasitoid *T. anastrephae* when exposed to the bioassays of ingestion and topical application. These results indicate that the EOs of *Piper* spp. may be promising alternatives to be included in the integrated management programs of *D. suzukii* since they have insecticidal properties and selectivity to non-target organisms like *T. anastrephae*, a recurrent species in small fruit crops infested by these flies in Brazil. They may also be used in organic crop systems where the use of synthetic substances is not allowed for pest management. However, the mechanism of action of EOs is still a challenge when it comes to field trials. Further studies are essential to investigate plant domestication and optimization of EO extraction processes prior to stabilization of their active principles (e.g., microencapsulation and nanoencapsulation) to maintain high insecticidal efficacy and long-lasting molecules in the field. In addition, the process of biopesticide authorization is complex and expensive (Pavela and Benelli 2016), and require appropriate toxicological methods. These concerns deserve attention and need further investigation in the future for their practical application in modern agriculture.

Author contribution MTS, MTS, DB, DCO, and MACZ planned and designed research, MTS, MTS, and DCO conducted experiments, and DB, MR, DK, DJM, PHGZ, BHLNSM, and MACZ conducted statistical analysis. MTS and MR wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Funding information The authors thank the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for financial support and scholarships conceived—Financing Code 001.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

4.5 References

- Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th edn. Allured Publishing Corporation, Carol Stream
- Andreazza F, Bernardi D, Dos Santos RSS, Garcia FRM, Oliveira EE, Botton M, Nava DE (2017a) *Drosophila suzukii* in southern Neotropical region: current status and futures perspectives. *Neotrop Entomol* 46:591–605. <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0554-7>
- Andreazza F, Ajila HEV, Haddi K, Colares F, Pallini A, Oliveira EE (2017b) Toxicity to and egg-laying avoidance of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) caused by an old alternative inorganic insecticide preparation. *Pest Manag Sci* 748:61–867. <https://doi.org/10.1002/ps.4772>
- Asplen MK, Anfora G, Biondi A, Choi D-S, Chu D, Daane KM, Gibert P, Gutierrez AP, Hoelmer KA, Hutchison WD, Isaacs R, Jiang ZL, Kárpáti Z, Kimura MT, Pascual M, Philips CR, Plantamp C, Ponti L, Véték G, Vogt H, Walton VM, Yu Y, Zappala L, Desneux N (2015) Invasion biology of spotted wing *Drosophila* (*Drosophila suzukii*): a global perspective and future priorities. *J Pest Sci* 88: 469–494. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0681-z>
- Bernardi D, Ribeiro L, Andreazza F, Neitzke C, Oliveira EE, Botton M, Nava DE, Vendramin JD (2017) Potential use of *Ammonia* by products to control *Drosophila suzukii* and toxicity to its parasitoid *Trichopria anastrephae*. *Ind Crop Prod* 110:30–35. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.004>
- Biondi A, Mommaerts V, Smagghe G, Viñuela E, Zappala L, Desneux N (2012) The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest Manag Sci* 68:1523–1536. <https://doi.org/10.1002/ps.3396>
- Bruck DJ, Bolda M, Tanigoshi L, Klick J, Kleiber J, DeFrancesco J, Gerdeman B, Spitler H (2011) Laboratory and field comparisons of insecticides to reduce infestation of *Drosophila suzukii* in berry crops. *Pest Manag Sci* 67:1375–1385. <https://doi.org/10.1002/ps.2242>
- Calabria G, Maca J, Bachli G, Serra L, Pascual M (2012) First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe. *J Appl Entomol* 136:139–147. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01583.x>
- Cantrell CL, Dayan FE, Duke SO (2012) Natural products as sources for new pesticides. *J Nat Prod* 75:1231–1242. <https://doi.org/10.1021/np300024u>

- Casida JE, Durkin KA (2012) Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chem Biol Interact* 203:221–225. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.08.002>
- Coitinho RLBC, Oliveira JV, Gondim Junior MGC, Camara CAG (2011) Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: Curculionidae). *Ciênc Agrotecnol* 35:172–178. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000100022>
- Deprá M, Poppe JL, Schmitz HJ, De Toni DC, Valente VLS (2014) The first records of the invasive pest *Drosophila suzukii* in the south American continent. *J Pest Sci* 87:379–383. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0591-5>
- Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W (2016) Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines* 3:1–16. <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>
- Erland LAE, Rheault MR, Mahmoud SS (2015) Insecticidal and oviposition deterrent effects of essential oils and their constituents against the invasive pest *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae). *Crop Prot* 78:20–26. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.08.013>
- Estrela JLV, Fazolin M, Catani V, Alécio MR, Lima MS (2006) Toxicity of essential oils of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* against *Sitophilus zeamais*. *Pesq Agrop Brasileira* 41:217–222. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006000200005>
- Finney DJ (1971) Probit analysis, 3rd edn. Cambridge University Press Gress BE, Zalom FG (2018) Identification and risk assessment of spinosad resistance in a California population of *Drosophila suzukii*. *Pest Manag Sci* 75:1270–1276. <https://doi.org/10.1002/ps.5240>
- Haviland DR, Beers EH (2012) Chemical control programs for *Drosophila suzukii* that comply with international limitations on pesticide residues for exported sweet cherries. *J Integr Pest Manag* 3:1–6. <https://doi.org/10.1603/IPM11034>
- Haye T, Girod P, Cuthbertson AGS, Wang XG, Daane KM, Hoelmer KA, Baroffio C, Zhang J, Desneux N (2016) Current SWD IPM tactics and their practical implementation in fruit crops across different regions around the world. *J Pest Sci* 89:643–651. <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0737-8>
- Henderson CF, Tilton EW (1955) Tests with acaricides against the brown wheat mite. *J Econ Entomol* 48:157–161. <https://doi.org/10.1093/jee/48.2.157>
- Jankowska M, Rogalska J, Wyszowska J, Stankiewicz M (2017) Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system—a review. *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23010034>
- Krinski D, Foerster LA (2016) Toxicity of essential oils from leaves of Piperaceae species in rice stalk stink bug eggs, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae). *Ciênc Agrotecnol* 40: 676–687. <https://doi.org/10.1590/1413-70542016406021616>

- Krinski D, Deschamps C, Foerster LA (2018) Ovicidal effect of the essential oils from 18 Brazilian *Piper* species: controlling *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Erebidae) at the initial stage of development. *Acta Sci Agron* 40:e35273. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.35273>
- Kumar J (2015) Biopesticide: an environment friendly pest management strategy. *Biofertil Biopest* 6:e127. <https://doi.org/10.4172/2155-6202.1000e127>
- Lee JC, Dreves AJ, Cave AM, Kawai S, Isaacs R, Miller JC, Van Timmeren S, Bruck DJ (2015) Infestation of wild and ornamental non crop fruits by *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Ann Entomol Soc Am* 3:1–13. <https://doi.org/10.1093/aesa/sau014>
- McLafferty FW, Stauffer DB (1989) *The Wiley/NBS registry of mass spectral data*. Wiley, New York
- Mgbeahuruike EE, Yrjönen T, Vuorela H, Holm Y (2017) Bioactive compounds from medicinal plants: focus on *Piper* species. *S Afr J Bot* 112:54–69. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.007>
- Mitsui H, Takahashi KH, Kimura MT (2006) Spatial distributions and clutch sizes of *Drosophila* species ovipositing on cherry fruits of different stages. *Popul Ecol* 48:233–237. <https://doi.org/10.1007/s10144-006-0260-5>
- Nelder JA, Wedderburn RWM (1972) Generalized linear models. *J R Stat Soc Ser A (Gen)* 135:370–384
- Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M (2007) Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18:414–420. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.009>
- Pavela R, Benelli G (2016) Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends Plant Sci* 21:1000–1007. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>
- Piton LP, Turchen LM, Butnariu AR, Pereira MJB (2014) Natural insecticide based-leaves extract of *Piper aduncum* (Piperaceae) in the control of stink bug brown soybean. *Ciênc Rural* 44:1915–1920. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131277>
- Poyet M, Le Roux V, Gibert P, Meirland A, Prévost G, Eslin P, Chabrierie O (2015) The wide potential trophic niche of the Asiatic fruit fly *Drosophila suzukii*: the key of its invasion success in temperate Europe? *PlosOne* 10:e0142785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142785>
- R Development Core Team (2012) *R: A Language and Environment for Statistical Computing* R Foundation for Statistical Computing

- Renkema JM, Wright D, Buitenhuis R, Hallett RH (2016) Plant essential oils and potassium metabisulfite as repellents for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Sci Rep* 6:214–232. <https://doi.org/10.1038/srep21432>
- SAS Institute (ed) (2011) *Statistical Analysis System: Getting Started with the SAS Learning*, 9.2 edn. SAS Institute, Cary
- Schlesener DCH, Wollmann J, Krüger AP, Nunes AM, Bernardi D, Garcia FRM (2018) Biology and fertility life table of *Drosophila suzukii* on artificial diets. *Exp Appl Entomol* 166:932–936. <https://doi.org/10.1111/eea.12736>
- Silva JKR, Trindade R, Alves NS, Figueiredo PL, Maia JGS, Setzer WN (2017) Essential oils from neotropical *Piper* species and their biological activities. *Int J Mol* 18:1–42. <https://doi.org/10.3390/ijms18122571>
- Turchen LM, Piton LP, Dall'Oglio EL, Butnariu AR, Pereira MJ (2016) Toxicity of *Piper aduncum* (Piperaceae) essential oil against *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) and non-effect on egg parasitoids. *Neotrop Entomol* 45:604–611. <https://doi.org/10.1007/s13744-016-0409-7>
- Van Den Dool H, Kratz PDJA (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr A* 11:463–471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)
- Van Timmeren S, Isaacs R (2013) Control of spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, by specific insecticides and by conventional and organic crop protection programs. *Crop Prot* 54:126–133. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.08.003>
- Wollmann J, Schlesener DCH, Ferreira MS, Garcia MS, Costa VA, Garcia FRM (2016) Parasitoids of drosophilidae with potential for parasitism on *Drosophila suzukii* in Brazil. *Drosophila Inf Serv* 99: 38–42

5 Metabólitos secundários de Lamiaceae Neotropical: *screening* e toxicidade sobre *Drosophila suzukii* e *Trichopria anastrephae**

Resumo: Para promover novas alternativas de controle da drosófila-da-asa-manchada *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) e a seletividade ao seu parasitoide pupal *Trichopria anastrephae* Lima (Hymenoptera: Diapriidae) foram examinados óleos essenciais (OEs) de três ecótipos (ECOs) de alecrim *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) coletados no Brasil e seus constituintes majoritários comuns (α -pineno, 1,8-cineol e cânfora). Em bioensaios de ingestão e aplicação tópica, OEs do ECO 2, ECO 3 e seus constituintes individuais 1,8-cineol e cânfora foram mais tóxicos contra adultos de *D. suzukii* (ingestão CL₅₀ e CL₉₀; tópica CL₅₀ e CL₉₀). Além disso, estes tratamentos apresentaram TL₅₀ entre 18,10 a 0,55 h (ingestão) e 3,21 a 0,44 h (tópica). Adicionalmente, os resíduos secos dos ECO 2, ECO 3, 1,8-cineol e cânfora tiveram um efeito repelente na oviposição (\cong 8 ovos / frutos) e efeitos negativos na viabilidade dos ovos (\cong 2 larvas / frutos) de *D. suzukii* em frutos artificiais. Apesar da toxicidade à *D. suzukii*, os OEs dos três ECOs e seus constituintes majoritários proporcionaram seletividade a *T. anastrephae* no bioensaio de ingestão (mortalidade <15%) e de parasitismo (\cong 50%), semelhante ao tratamento da água (\pm 10% da mortalidade e \pm 49% de parasitismo). Os OEs aqui avaliados têm potencial para serem usados no manejo integrado de *D. suzukii* e podem servir como ingredientes ativos seletivos para a síntese de inseticidas botânicos.

Palavras-chave: drosófila-da-asa-manchada, alecrim, α -pineno, 1,8-cineol, cânfora

*Manuscrito formatado para Neotropical Entomology

5.1 INTRODUÇÃO

Nativa da Ásia, a drosófila-da-asa-manchada, *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) é uma praga invasora que causou graves perdas em pequenos campos de frutos silvestres em diversos países produtores (Asplen *et al* 2015, EPPO 2020). Os impactos econômicos dessa praga já foram documentados na América do Norte (Dreves 2011, Goodhue *et al* 2011, Farnsworth *et al* 2017), América do Sul (Santos 2014) e Europa (De Ros *et al* 2015). Nos Estados Unidos *D. suzukii* ocasionou perdas na produção de pequenas frutas que alcançaram US\$ 511 milhões anualmente (Goodhue *et al* 2011). E no Brasil, produtores de morangos relataram perdas na produção de até 30% (Santos *et al* 2014), sem contabilizar os custos adicionais gerados pelo monitoramento e pelo controle realizado para prevenir infestações primárias (Dreves 2011, Goodhue *et al* 2011, Lee *et al* 2011).

Atualmente, essa espécie é reconhecida como uma grave ameaça fitossanitária (Hamby *et al.* 2016) devido a muitos fatores relacionados à sua biologia, como sua ampla gama de hospedeiros (Lee *et al* 2015, Poyet *et al* 2015), capacidade de dispersão (Haye *et al* 2016) e seu curto período do ciclo biológico (Asplen *et al* 2015). Por isso, a estratégia mais adotada para manejo de *D. suzukii* em todo o mundo é uma aplicação de inseticidas organofosforados, piretróides e espinosinas (Gress & Zalom 2018). No entanto, apesar de reduzir a infestação e causar danos às frutas, o uso indiscriminado desses inseticidas sintéticos ocasiona contaminação ambiental, riscos toxicológicos, seleção para populações resistentes a inseticidas e efeitos adversos na fauna benéfica (Regnault-Roger *et al* 2012, Roubos *et al* 2014, Gress & Zalom 2018). Entre os inimigos naturais que podem ser afetados pela aplicação dos inseticidas sintéticos nos cultivos de pequenas frutas, está o parasitoide pupal, *Trichopria anastrephae* (Lima, 1940) (Hymenoptera: Diapriidae), que têm sido relatado parasitando pupas de *D. suzukii* em pomares no Brasil. Este inimigo natural é um microhimenóptero generalista (Wollmann *et al* 2016, Andrezza *et al* 2017) e sua presença já

foi relatada em diferentes estados brasileiros (Aguiar-Menezes *et al* 2001, Marchiori & Penteado-Dias 2001, Silva *et al* 2003, Garcia & Corseuil 2004, Cruz *et al* 2011) e em outros países, como Argentina (Turica & Mallo 1961) e Venezuela (Boscán & Godoy 1996). A ocorrência de *T. anastrephae* em áreas de produção de pequenas frutas, como em morangos *Fragaria* × *ananassa* Duchesne e *Rubus* spp., é um indicativo do estabelecimento dessa espécie em campo (Wollmann *et al* 2016), embora também já existem estudos demonstrando resultados promissores para criação de *T. anastrephae* usando pupas de *D. sukuzii* como hospedeiro (Vieira *et al* 2019).

Considerando a importância da *T. anastrephae* no controle biológico de *D. sukuzii*, faz-se necessária a busca por produtos seletivos a este e demais inimigos naturais. Frente a isso, o potencial de uso dos inseticidas vegetais, especialmente os óleos essenciais (OEs) e seus constituintes individuais, podem gerar alternativas para o controle de *D. sukuzii*, em detrimento aos inseticidas não seletivos que podem interferir na sobrevivência de *T. anastrephae* (Bernardi *et al* 2017). Além disso, os produtos derivados de plantas apresentam vários constituintes químicos em um único OE, o que contribui para o aumento da eficácia no controle e diminui o desenvolvimento da resistência de pragas aos produtos sintéticos por atuarem em diferentes sítios de ação (Isman 2000).

Entre as plantas com potencial para prospecção de moléculas inseticidas podem ser exploradas em espécies da família Lamiaceae que possuem valor econômico para extração de OE, como por exemplo *Rosmarinus officinalis* L., popularmente conhecida como alecrim. O OE de *R. officinalis* tem sido alvo de vários estudos em aromaterapia como estimulante do sistema nervoso para aumentar a capacidade de memória e concentração (Sayorwan *et al* 2013). Análises por cromatografia dos óleos essenciais presentes nessa espécie permitem identificar a presença de α -pineno, 1,8-cineol, borneol, acetato de bornila, cânfora e verbenona como constituintes mais abundantes e frequentes (Isman *et al* 2008; Sayorwan *et al*

2013). No entanto, o *R. officinalis* como qualquer outro vegetal pode apresentar alterações na sua composição química em função das diferentes pressões ambientais em que a planta está exposta (por exemplo, condições de herbivoria, genótipo, origem geográfica, edafoclimáticas) às quais são submetidas, e pode usar as práticas genéticas que resultam na formação de ecótipos (ECOs), apresentando por sua vez, diferentes atividades biológicas (Feitosa-Alcantara et al 2017). Dessa maneira, ao testar os óleos essenciais dos diferentes ecótipos de *R. officinalis* com potencial para a produção de inseticidas vegetais, é importante analisar a variabilidade química do óleo e determinar quais componentes influenciam na atividade inseticida (Isman et al 2008), bem como verificar sua toxicidade a organismos não-alvo.

Portanto, este estudo teve como objetivos: 1) identificar e quantificar a composição dos óleos essenciais de três ecótipos de *R. officinalis* coletados em diferentes localidades da Região Neotropical; 2) avaliar a toxicidade, via por ingestão e aplicação tópica, dos óleos essenciais obtidos das folhas dos ecótipos de *R. officinalis* e de seus constituintes majoritários contra adultos de *D. sukii*; 3) avaliar os efeitos dos resíduos secos dos OEs e de seus constituintes majoritários no comportamento da oviposição de *D. sukii* em frutos artificiais; (4) analisar a toxicidade dos óleos essenciais de *R. officinalis* e seus constituintes individuais ao parasitoide *T. anastrephae*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material vegetal, extração e obtenção dos principais compostos dos óleos essenciais

Para obtenção dos OEs, foram coletadas folhas da porção terminal de um ramo de *R. officinalis* no período vegetativo de pelo menos 10 espécimes de cada ECO. Para extrair os OEs, as folhas coletadas foram submetidas a hidrodestilação em Clevenger (Vidrolabor, São Paulo, Brasil) durante quatro horas (Tabela 5-1). Posteriormente, o hidrolato foi separado

usando sulfato de sódio anidro. As amostras foram mantidas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até análise química.

Os constituintes comuns do OE de *R. officinalis* encontrados em proporções acima de 20% em pelo menos um dos ECOs estudados foram selecionados para os bioensaios realizados, sendo estes α -pineno, 1,8-cineol e canfora. Padrões desses compostos, α -pineno (CAS: 7785-70-8), 1,8-cineol (CAS: 470-82-6) e canfora (CAS: 76-22-2), foram obtidos da Sigma-Aldrich Brazil (São Paulo, Brazil) com uma pureza de $\geq 99\%$.

5.2.2 Análise química dos óleos essenciais: identificação e quantificação

A CG / EM foi realizada em um cromatógrafo a gás Agilent 6890[®] acoplado a um detector de massa Agilent 5973 N[®]. O GC foi equipado com uma coluna capilar fundida HP-5MS (espessura do filme de $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$) revestida com fase estacionária de 5% de fenil-95% de dimetilpolisiloxano. O hélio foi usado como gás de arraste, a uma vazão de $1,0\text{ mL} / \text{min}$. A programação da temperatura foi ajustada para $60\text{--}240\text{ }^{\circ}\text{C}$ na taxa de $3\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$, aquecida a $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantida nessa temperatura por 10 minutos. A temperatura do injetor foi mantida a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras de óleo essencial foram diluídas para uma solução a 1% em diclorometano e $1,0\text{ }\mu\text{L}$ da solução foi injetado com uma proporção de partição de 1:20. O detector de massa foi operado no modo de ionização de elétrons (70 eV) a uma taxa de $3,15\text{ varredura} / \text{min}$ e uma faixa de varredura de 40 a 450 Da. A linha de transferência foi mantida a $260\text{ }^{\circ}\text{C}$, a fonte de íons a $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o analisador (quadrupolo) a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para a quantificação, os óleos essenciais foram injetados e o CG Agilent 6890A[®], equipado com detector de ionização por chama (FID), foi operado a $280\text{ }^{\circ}\text{C}$. O hidrogênio foi usado como gás transportador, a uma taxa de fluxo de $1,5\text{ mL} / \text{min}$, usando a mesma coluna e condições descritas acima.

Tabela 5-1- Tratamentos avaliados para o manejo de *Drosophila suzukii*

Tratamentos	Descrição	Concentração testada ^a	Origem	Manufatura
Ecótipo 1	Óleo essencial extraído das folhas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (pre-commercial)	8%	Quatro Barras, Paraná	Extração e formulação de laboratório (Curitiba, Paraná, Brasil) ^b
Ecótipo 2	Óleo essencial extraído das folhas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (pre-commercial)	8%	Taquarituba, São Paulo	Extração e formulação de laboratório (Curitiba, Paraná, Brasil) ^b
Ecótipo 3	Óleo essencial extraído das folhas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (pre-commercial)	8%	Coronel Macedo, São Paulo	Extração e formulação de laboratório (Curitiba, Paraná, Brasil) ^b
α -pineno	Constituinte individual, (CAS: 7785-70-8) (commercial)	8%		Sigma-Aldrich Brazil (São Paulo, SP, Brasil)
1,8-cineol	Constituinte individual, (CAS: 470-82-6) (commercial)	8%		Sigma-Aldrich Brazil (São Paulo, SP, Brasil)
cânfora	Constituinte individual, (CAS: 76-22-2) (commercial)	8%		Sigma-Aldrich Brazil (São Paulo, SP, Brasil)
Delegate [®]	Espinetoram ^a	75 g de i.a. 100 L ⁻¹ (recomendado pelo fabricante)		Dow AgroSciences Industrial Ltda. (São Paulo, SP, Brasil)

^aConcentração: 8% (0,16 mL) de óleo essencial por 1,84 mL de acetona; 250 ml de produtos comercial por L de água (Azamax[®]); 75 mg de produto comercial por L de água (Delegate[®]). *Datum WGS84. ^bLaboratório de Ecofisiologia, Universidade Federal do Paraná (Extração) e Laboratório de Semioquímicos, Universidade Federal do Paraná (Formulação), Paraná, Brasil

A quantificação de cada constituinte foi estimada pelo detector de ionização por chama (FID) com a área de pico correspondente, que foi determinada com base na média de três injeções (Tabela 5-2). A identificação dos componentes dos OE foi realizada pela comparação dos espectros de massa com os das bibliotecas comerciais (McLafferty & Stauffer 2014) e também pelos seus índices de retenção linear (Van Den Dool & Kratz 1963), após a injeção de um homólogo. série de alcanos (C₈-C₂₆), nas mesmas condições experimentais, e comparados com os dados da literatura (Adams 2007).

5.2.3 Estabelecimento das colônias de *Drosophila suzukii* e *Trichopria anastrephae*

Amostras de *D. suzukii* (30^a geração) e *T. anastrephae* (25^a geração) utilizadas em todos os bioensaios foram obtidas a partir de criação estabelecida em sala climatizada a 25±1°C, 70% ± 5% UR e fotofase de 12:12 (L: D) h. Os imaturos e adultos de *D. suzukii* foram mantidos em garrafas (290 mL) contendo dieta artificial à base de farinha de milho e tamponadas com algodão hidrofílico, seguindo a metodologia proposta por Schlesener et al (2018). Os parasitoides *T. anastrephae* foram criados em pupas de *D. suzukii* e alimentados com mel / água (80%, p: v). Antes de cada bioensaio, adultos de quatro dias de ambas as espécies foram privados de alimento por oito horas, mas com água fornecida.

5.2.4 Bioensaios

Todos os bioensaios foram realizados em condições de laboratório a 25 ± 2° C, 70 ± 10% de umidade relativa e fotofase de 12h em delineamento inteiramente casualizado. As soluções de 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0% dos OEs intactos dos ECO 1, ECO 2, ECO 3 e constituintes individuais de α-pineno, 1,8-cineol e cânfora foram preparados diluindo todos os tratamentos em solvente acetona (PanReac-UV-IR-HPLC-GPC PAI-ACS 99,9% de pureza).

Como controles positivos um inseticida químico à base de espinetoram (ingrediente ativo Delegate® 250WGTM 7.5g (i.a: ingrediente ativo) L¹) e um inseticida vegetal à base de limoneno (Azamax® 12 EC azadirachtin + 3-tigloil-azadiractol) foram usados na dosagem de campo (75 de i.a. por L de água) e (250 mL de i.a. por 100 L de água), respectivamente. A água e a acetona foram usadas como controles. Testes anteriores demonstraram que esses solventes não interferem na sobrevivência dos insetos. Todas as soluções foram preparadas uma hora antes do início dos experimentos.

5.2.4.1 Bioensaios de ingestão e aplicação tópica

Duas vias de exposição avaliaram a toxicidade dos OE intactos de *R. officinalis* e de seus principais compostos: ingestão e uso tópico. A toxicidade dos procedimentos foi avaliada em testes usando a concentração testada em adultos de *D. sukii* (Tabela 3-1).

Para os bioensaios de ingestão, os insetos foram separados em grupos (unidades amostrais) de 16 adultos por gaiola (oito casais). As gaiolas consistiam em recipientes de plástico transparentes (1 L) com a abertura sobre uma placa de Petri de plástico (25 cm de diâmetro). No lado superior da gaiola (isto é, fundo do recipiente) foi realizado uma adaptação com a colocação de uma malha de *voile* permitindo a ventilação das gaiolas. Durante o tempo de exposição (i.e., 24 h), os adultos puderam se alimentar mechas de algodão hidrofílicos saturadas com soluções contendo produto colocado dentro de um frasco de vidro de 10 mL que era mantido dentro das gaiolas. Após o período de exposição, o frasco de 10 mL de vidro contendo o rolo de algodão tratado foi substituído por alimentos e água destilada até o final do período de avaliação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos contendo cinco repetições (gaiolas) com 16 adultos de *D. sukii* (oito fêmeas e oito machos) (n = 560). A mortalidade em cada tratamento foi avaliada em intervalos de 1 hora nas primeiras 24 horas após a exposição aos tratamentos (HAET) e a

cada 24 horas após 24 a 120 HAET. Insetos que não reagiam ao toque de um pincel eram considerados mortos. A mortalidade corrigida foi calculada usando a equação de Abbott (1925).

Para os bioensaios de aplicação tópica, adultos de *D. sukii* (dez casais) da criação de manutenção foram separados e colocados em tubos de vidro transparentes (1,3 cm de diâmetro × 10 cm de comprimento), selados na parte superior com algodão hidrofílico. Posteriormente, os insetos foram sedados a 2 °C por 40 a 60 s e em seguida colocados em uma placa de Petri (9 cm de diâmetro) e pulverizados com "Potter's Tower" (Burkard Scientific Uxbridge, Reino Unido), aplicando 2 mL do OE por unidade de amostra a uma pressão de trabalho de 7 lb in⁻², resultando em uma deposição média de resíduos de 1,0 mg cm². Após a pulverização, as moscas foram colocadas dentro de gaiolas plásticas transparentes (500 mL), conforme descrito anteriormente, e alimentadas com dieta artificial e água destilada durante todo o período de avaliação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos e quatro repetições (gaiolas) com 20 adultos de *D. sukii* (dez fêmeas e dez machos) (n = 560). A mortalidade em cada tratamento foi avaliada em intervalos de 1 hora nas primeiras 24 horas após a exposição aos tratamentos (HAET) e a cada 24 horas após esse período, de 24 a 120 HAET. Insetos que não reagiam ao toque de um pincel eram considerados mortos. A mortalidade corrigida foi calculada usando a equação de Henderson & Tilton (1955).

5.2.4.2 Curvas de concentração-resposta dos tratamentos ativos em *Drosophila sukii*

Com base nos resultados desse teste inicial, os tratamentos e o controle positivo (espinetoram Delegate[®] 250 WGTM e limoneno Azamax[®] 12 EC) foram avaliados posteriormente para estimar a concentração necessária para matar 50 e 90% das moscas expostas [Concentração letal (CL); CL₅₀ e CL₉₀, respectivamente].

Para esse fim, sete valores de concentração foram testados para cada tratamento (entre 0,1–2,0% para EOs; 5 mg L⁻¹– 75 mg L⁻¹ para espinetoram; 25 mL⁻¹– 250 mL 100 L⁻¹ para azadaractina), sendo que o modo de exposição foi baseado em Finney (1971). Os procedimentos e critérios de exposição e avaliação foram idênticos aos dos testes iniciais. Nos bioensaios de ingestão, cinco repetições com 16 moscas (n = 80) foram utilizados para cada concentração de cada produto (n = 560), enquanto nos bioensaios de aplicação tópica foram utilizadas quatro repetições de 20 moscas (n = 80) para cada concentração de cada produto (n = 560).

5.2.4.3 Tempo letal (TL₅₀) dos tratamentos ativos em *Drosophila suzukii*

Tempo médio para matar 50% da população testada (TL₅₀) dos OEs intactos de *R. officinalis* e os constituintes indivíduos (α -pineno, 1,8-cineol e cânfora) foi estimado usando a concentração máxima testada nos bioensaios de ingestão e aplicação tópica (Tabela 5-1). O delineamento experimental e os procedimentos de bioensaio foram idênticos aos utilizados nos testes iniciais.

5.2.5 Efeitos dos OEs de *Rosmarinus officinalis* e seus constituintes majoritários na oviposição e viabilidade larval de *Drosophila suzukii*

Para esse propósito, “frutos artificiais” foram preparados com ágar (19 g), gelatina de framboesa (10 g), metilparabeno (Nipagin[®]; 8 mL; 0,8 g dissolvido em 8 mL de álcool etílico absoluto a 99,9%) e água destilada (refluxada; 850 mL), de acordo com o método adaptado proposto por Schlesener et al (2017). Em cada “fruto artificial” procedeu-se a pulverização de 1 mL de óleo essencial (do ECO 1, ECO 2, ECO 3, α -pineno, 1,8-cineol e cânfora) por unidade de amostra em uma pressão de trabalho de 7 lb in⁻², resultando em uma deposição média de resíduos de 0,4 mg cm². Em seguida, os frutos artificiais foram condicionados por

três horas em uma sala climatizada ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $70\%\pm 10\%$ UR e fotoperíodo de 12:12 (L: D) horas para evaporar o excesso de umidade e, conseqüentemente, a deposição residual. Depois, o fruto artificial (unidade amostral), foi colocado individualmente em um recipiente de plástico (250 mL), revestido com tecido de *voile* (4 cm de diâmetro) para troca de gases do interior com o ambiente externo e externo. Posteriormente, cinco casais de *D. sukukii* (\cong sete dias) que estavam mantidos em gaiolas individualizados por sexo (machos ou fêmeas) foram adicionados para acasalamento e oviposição. Após 24 horas, os adultos foram removidos e os ovos foram contados em cada fruto artificial usando um microscópio estereoscópico (40 \times de aumento). As larvas foram contadas entre 24 e 48 horas após a remoção dos adultos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 30 repetições por tratamento.

5.2.6 Toxicidade dos óleos essenciais sobre *Trichopria anastrephae*

Para avaliar a toxicidade dos tratamentos ativos em *T. anastrephae*, parasitóide de *D. sukukii*, os valores CL_{50} e CL_{90} dos OEs de *R. officinalis* intactos (ECO 1, ECO 2, ECO 3), α -pineno, 1,8-cineol, cânfora, Azamax[®] 12 EC e Delegate[®] 250 WG TM foram usados em cada procedimento de exposição, que foram determinados a partir das curvas de concentração-resposta às 120 h. As vespas adultas foram submetidas ao procedimento de ingestão conforme descrito nos testes anteriores. A mortalidade das vespas foi avaliada em até 120 horas após o início da exposição usando os mesmos critérios para avaliar a mortalidade de *D. sukukii*.

Para avaliar os efeitos sub-letais dos tratamentos nas vespas, dez pupas de *D. sukukii* (pupas de 24 horas) foram oferecidas diariamente por sete dias (começando às 120 h), para cada fêmea de *T. anastrephae* sobrevivente (Bernardi *et al* 2017). As pupas, obtidas da colônia de laboratório, foram expostas às vespas em um recipiente com uma camada de algodão hidrofílico em uma placa de Petri. As pupas foram removidas diariamente e colocado em copos plásticos (100 mL) selados por cima com *voile* até a emergência de mosca ou

vespas. Durante o período de avaliação, as vespas foram alimentadas com 80% mel / água (p / v). O parasitismo percentual foi determinado dividindo-se o número total de descendentes das vespas pelo número total de pupas oferecidas, multiplicado por 100.

5.2.7 Análise dos dados

Modelos lineares generalizados (GLM) da família de distribuições exponenciais (Nelder e Wedderburn, 1972) foram utilizados para a análise das variáveis estudadas. Quando houve diferenças significativas entre os tratamentos, foram realizadas comparações múltiplas (teste de Tukey, $P < 0,05$) utilizando a função `glht` por meio do pacote `Multcomp`, com ajuste dos valores de p . Todas as análises foram realizadas usando o software estatístico “R” versão 2.15.1 (R Development Core Team, 2012). Um modelo binomial com uma função complementar de log-log link (modelo `gompit`) foi usado para estimar as concentrações letais (LC50 e LC90), usando o Probit Procedure no software SAS versão 9.2 (SAS Institute, 2011). Finalmente, o tempo letal médio (LT₅₀) foi estimado pelo método proposto por Throne et al. (1995) para análise Probit de dados correlacionados.

5.3 RESULTADOS

Mediante as análises cromatográficas dos ECOs de *R. officinalis* foram identificados 20 picos dos EOs (Figura 5-1). Os picos cromatográficos foram classificados em monoterpenos hidrocarbonetos (20,9-47,3%), monoterpenos oxigenados (45,2-76,3%), sesquiterpenos hidrocarbonetos (1,2-2,0%) e éster (0,7-14,9%) (Tabela 5-2). Os ecótipos 1, 2 e 3 apresentaram α -pineno (9,3-20,1%), 1,8-cineol (13,0-44,9%) e cânfora (12,1-19,9%) como constituintes majoritários comuns. Na constituição dos óleos essenciais do ECO 1 foram identificados 16 constituintes, totalizando 97,1% de óleo essencial, com predominância de α -

pineno (20,1%), 1,8-cineol (13,0%), cânfora (12,1%) e acetato de bornila (14,9%) (Tabela 5-2). A composição química do ECO 2 inclui 16 constituintes, com α -pineno (19,5%), canfeno (11,2%), 1,8-cineol (20,1%) e cânfora (20,5%) representando os constituintes majoritários, com 98,7 % do total da identificação do óleo (Tabela 5-2). Os principais constituintes do EO do ECO 3 foram α -pineno (9,3%) 1,8-cineol (49,1%) e cânfora (17,8%), entre os 16 constituintes identificados de um total de 99,1% (Tabela 5-2).

Tabela 5-2- Composição do óleo essencial (%) das folhas frescas de três ecótipos (ECO) de *Rosmarinus officinalis* coletados na região Neotropical, Brasil.

Constituintes	IR ^{lit}	IR ^{cal}	% area do pico		
			ECO 1*	ECO 2	ECO 3
1. α -thujeno	923	923	0.9	---	---
2. α -pineno	934	943	20.1	19.5	9.3
3. canfeno	952	953	5.0	11.2	3.5
4. β -pineno	980	980	2.2	5.0	3.2
5. β -myrceno	991	991	0.8	3.0	0.8
6. 3-careno	1011	1011	---	0.8	---
7. m-cimeno	1023	1021	1.3	2.4	1.5
8. limoneno	1031	1030	4.7	4.0	2.1
9. γ -terpineno	1059	1059	---	0.8	0.5
10. isoterpinoleno	1086	1085	---	0.6	---
Monoterpeno hidrocarboneto			35.0	47.3	20.9
11. 1,8-cineol	1034	1033	13.0	20.1	49.1
12. linalool	1098	1097	1.8	0.5	1.1
13. cânfora	1143	1143	12.1	20.5	17.8
14. borneol	1165	1165	7.8	3.9	4.2
15. terpinen-4-ol	1177	1178	---	---	0.8
16. α -terpineol	1185	1185	2.0	2.8	3.3
17. verbenona	1204	1203	8.5	---	---
Monoterpeno oxigenado			45.2	47.8	76.3
18. β -cariofileno	1418	1419	1.5	2.0	0.7
19. α -cariofileno	1444	1444	0.5	---	0.5
Sesquiterpeno hidrocarboneto			2.0	2.0	1.2
20. Acetate de bornila	1285	1285	14.9	1.6	0.7
Éster			14.9	1.6	0.7
Total da identificação			97,1	98,7	99,1

Nota: IR^{lit} = Índice de Retenção da Literatura, IR^{cal} = Índice de Retenção Calculado. *ECO 1 (Ecótipo 1 coletado em Quatro Barras, PR, Brasil); ECO 2 (Ecótipo 2 coletado em Taquarituba, SP, Brasil); ECO 3 (Ecótipo 2 coletado em Coronel Macedo, SP, Brasil).

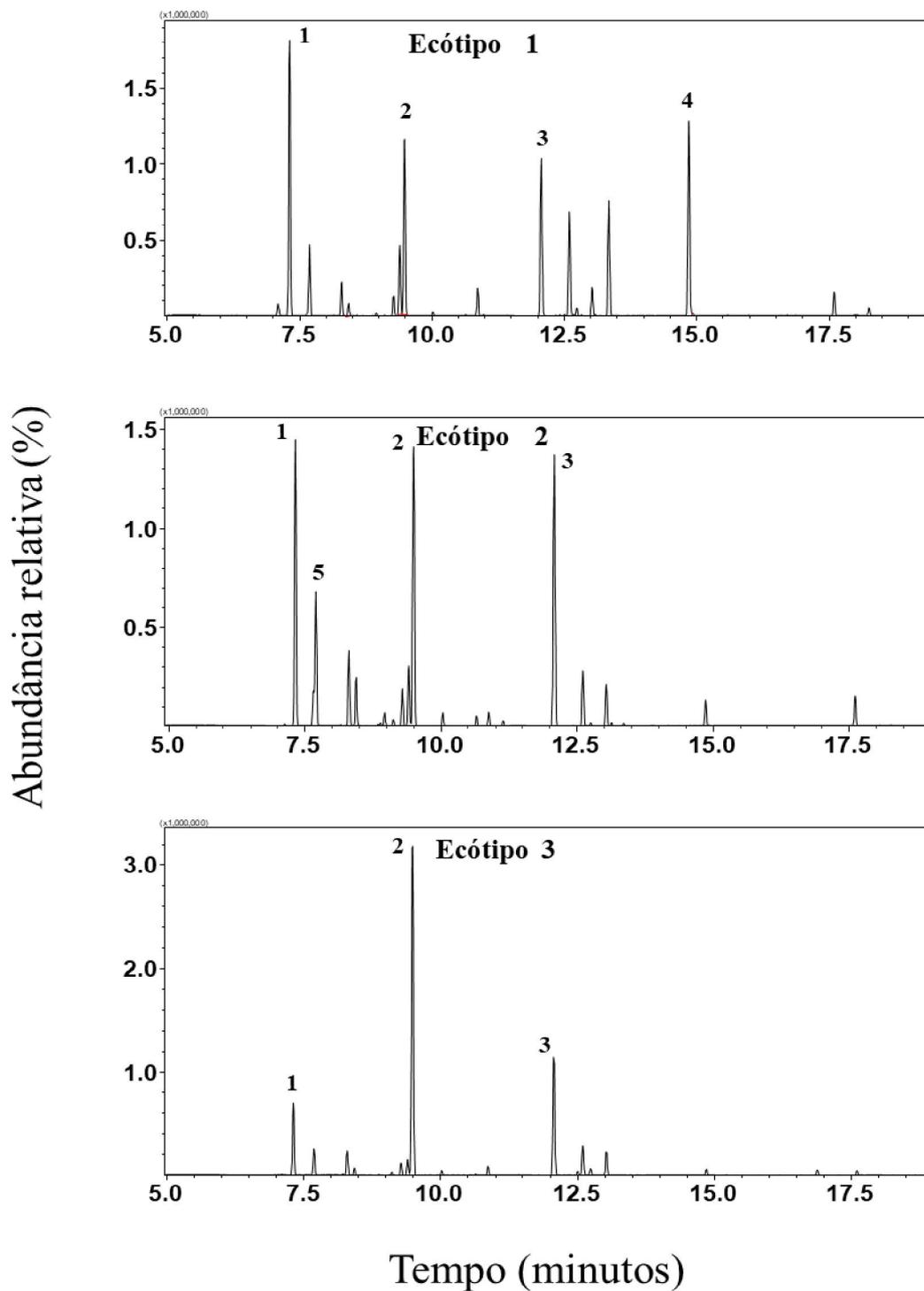


Figura 5-1- Constituintes principais encontrados nos óleos essenciais dos ecótipos de *Rosmarinus officinalis*: 1) α -pineno, 2) 1,8-cineol, 3) cânfora, 4) acetato de bornila, 5) canfeno.

Cento e vinte horas após a exposição, todos os tratamentos ECO 1, ECO 2, ECO 3, e seus constituintes majoritários α -pineno, 1,8-cineol e cânfora e o espinoteram mostrou toxicidade semelhante no bioensaio de ingestão (mortalidade entre 65 a 80%) (F8, 32 = 17,84, $p < 0.0001$) ou bioensaio tópico (mortalidade entre 85 a 100%) (F8, 32 = 14,32, $p < 0.0001$) (Figura 5-2). Com base nas curvas de concentração resposta e pela sobreposição dos intervalos de confiança, os ECO 1, ECO 2, ECO 3, e seus constituintes majoritários α -pineno, cânfora, 1,8-cineol apresentaram toxicidade similar (CL_{50} e CL_{90}) em bioensaio de ingestão (LC_{50} de 11,03 a 12,10 $mg L^{-1}$; LC_{90} de 19,48 a 22,24 $mg L^{-1}$; Table 5-4).

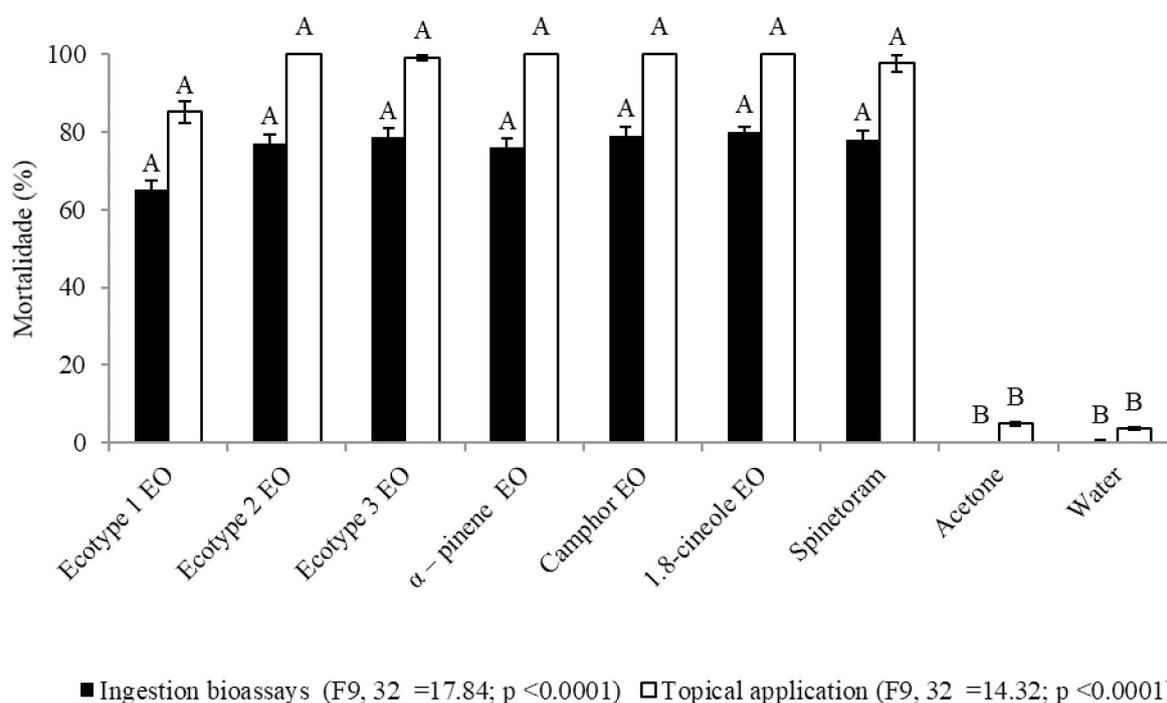


Figura 5-2- Mortalidade de *Drosophila sukuzii* quando submetida a bioensaios de aplicação tópica e ingestão em diferentes tratamentos, contituidos de óleos essenciais de diferentes ecótipos de *Rosmarinus officinalis*, limoneno, Azadiractina[®] e Delegate[®]

As médias seguidas de letras diferentes nas colunas (dentro de cada bioensaio de exposição) indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase binomial seguida pelo teste de Tukey, $P > 0,05$);

Entretanto, foram mais tóxicos quando comparado com o inseticida comercial espinetoram ($CL_{50} = 63,10$ e $CL_{90} 86,17$ mg L⁻¹; Tabela 5-3). Em bioensaio de aplicação tópica, todos os tratamentos avaliados apresentaram a mesma toxicidade sobre adultos de *D. suzukii* em relação aos valores de CL_{50} (CL_{50} DE 7,13 a 11,45 mg L⁻¹; Tabela 5-4) e CL_{90} (CL_{90} de 17,12 a 24,11 mg L⁻¹; Tabela 5-4).

Os resultados também mostraram que o TL_{50} depende da concentração em ambos os procedimentos de exposição. Nos bioensaios de ingestão, TL_{50} foi de 48,11 HAET para ECO 1; 17,11 para ECO2; 18,10 para ECO 3; 54,11 para α -pineno; 3,24 para cânfora; 0,55 para 1,8-cineol. Nos bioensaios tópico, TL_{50} foi de 7,10 HAET para ECO 1; 3,21 para ECO 2; 0,62 para ECO 3; 2,58 para α -pineno; 2,15 para cânfora; 0,41 para 1,8-cineol (Tabela 5-3).

Tabela 5-3- Estimativa do tempo letal mediano (TL_{50} , em horas) e o intervalo de confiança dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* e seus constituintes principais para adultos de *Drosophila suzukii* usando a concentração máxima testada.

Tratamentos	<i>n</i>	Slope \pm SE	TL_{50} (IC 95%) ^a	χ^2 ^c	GL ^d
Bioensaio de ingestão					
Ecótipo 1 OE	720	3,55 \pm 0,25	48,11 (45,31 – 61,23)	7,12	32
Ecótipo 2 OE	720	3,11 \pm 0,19	17,11 (15,31 – 19,23)	6,56	32
Ecótipo 3 OE	720	3,44 \pm 0,63	18,10 (17-14 – 20,57)	8,13	32
α – pineno OE	720	3,02 \pm 0,17	54,11 (40,17 – 67,11)	9,74	32
cânfora OE	720	3,21 \pm 0,22	3,24 (2,62 – 4,22)	5,98	32
1,8-cineol OE	720	3,20 \pm 0,16	0,55 (0,32 – 0,74)	8,90	32
Delegate [®] 250 WG	640	3,03 \pm 0,24	1,14 (0,98 – 1,20)	9,67	32
Bioensaio de aplicação tópica					
Ecótipo 1 OE	720	2,44 \pm 0,19	7,10 (5,31 – 8,23)	7,11	32
Ecótipo 2 OE	720	3,12 \pm 0,32	3,21 (2,17 – 5,23)	6,78	32
Ecótipo 3 OE	720	3,11 \pm 0,13	0,62 (0,35 – 1,23)	8,13	32
α – pineno OE	720	3,10 \pm 0,78	2,58 (1,78 – 3,28)	9,14	32
cânfora OE	720	3,42 \pm 0,76	2,15 (1,90 – 2,75)	8,52	32
1,8-cineol OE	720	3,03 \pm 0,54	0,41 (0,23 – 0,54)	7,12	32
Delegate [®] 250 WG	640	2,50 \pm 0,72	6,50 (6,17 – 8,59)	8,07	32

^a TL_{50} : tempo necessário para matar 50% dos adultos de *D. suzukii* após a exposição aos tratamentos (IC: intervalo de confiança com 95% de probabilidade de erro; ^b χ^2 : valor do qui-quadrado de Pearson; ^cGL: grau de liberdade.

Tabela 5-4- Estimativa da CL₅₀ e CL₉₀ (em mg L⁻¹) bem como o intervalo de confiança de *Rosmarinus leaves* (OEs) e seus constituintes majoritários, e inseticida sintético à base de espinosina (Delegate®) e azadiractina (Azamax®) sobre adultos de *Drosophila suzukii* em 120 HAE nos bioensaios de aplicação tópica e ingestão.

Tratamentos	<i>Slope</i> ± SE	CL ₅₀ (CI 95%) ^a	CL ₉₀ (CI 95%) ^b	χ ^{2c}	GL ^d
Bioensaio de ingestão					
Ecótipo 1 OE	3,14 ± 0,65	11,89 (11,55 – 11,98)	20,10 (19,75 – 23,93)	7,23	7
Ecótipo 2 OE	3,01 ± 1,15	11,84 (11,68 – 12,10)	20,17 (19,69 – 22,87)	9,16	7
Ecótipo 3 OE	3,10 ± 0,86	11,92 (11,75 – 12,12)	21,56 (21,02 – 22,95)	9,54	7
α – pineno OE	3,54 ± 0,73	12,10 (11,86 – 13,88)	22,24 (20,11 – 23,99)	8,19	7
cânfora OE	3,45 ± 1,18	11,99 (11,78 – 14,15)	19,48 (18,95 – 23,86)	8,37	7
1.8-cineol OE	2,54 ± 0,45	11,03 (10,86 – 13,13)	20,04 (18,16 – 25,71)	9,74	7
Delegate®	1,94 ± 0,45	63,10 (60,78 – 65,10)	86,17 (74,12 – 98,13)	5,68	6
Bioensaio de aplicação tópica					
Ecótipo 1 OE	3,20 ± 0,40	9,38 (8,21 – 10,53)	22,34 (18,89 – 23,88)	8,17	8
Ecótipo 2 OE	3,80 ± 0,22	9,42 (9,36 – 11,49)	20,11 (17,62 – 21,51)	4,11	8
Ecótipo 3 OE	3,78 ± 0,45	9,55 (9,38 – 10,70)	19,86 (17,10 – 20,26)	7,70	8
α – pineno OE	3,15 ± 0,32	8,63 (7,95 – 10,39)	19,10 (18,07 – 20,23)	9,01	8
cânfora OE	3,17 ± 0,44	7,13 (6,81 – 9,83)	17,23 (15,97 – 19,10)	5,10	8
1.8-cineol OE	3,23 ± 0,49	7,38 (6,15 – 9,03)	17,12 (16,14 – 18,86)	6,78	8
Delegate®	3,45 ± 0,19	11,45 (9,45 – 12,78)	24,11 (19,12 – 28,17)	7,13	7

^{a,b}CL₅₀ e CL₉₀: Concentração: 8% de óleo essencial para 2 mL de acetona; 75 mg de produto commercial por L de água (Delegate®); ^bTL₅₀, tempo requerido para matar 50% dos adultos de *D. suzukii* após a exposição dos tratamentos; IC, interval de confiança com 95% de probabilidade de erro; ^cχ², valor do teste de qui-quadrado de Pearson's; GL: grau de Liberdade.

Ao avaliar o efeito deterrente, fêmeas de *D. sukii* reduziram significativamente ($F_{8, 22} = 11.84$; $P < 0.0001$) a oviposição em frutos artificiais quando submetidos aos resíduos secos dos constituintes α -pineno (8,1 ovos/fêmea), cânfora (7,4 ovos/ fêmea), 1,8-cineol (7,5 ovos/ fêmea) e do inseticida espinetoram (7,3 ovos/ fêmea) (Figura 5-3). Em contraste, os ECO 1 (15,1 ovos/ fêmea), ECO 2 (11,4 ovos/ fêmea), ECO 3 (12,6 ovos/ fêmea) não apresentaram efeito deterrente na oviposição em relação aos controles negativos (Figura 5-3).

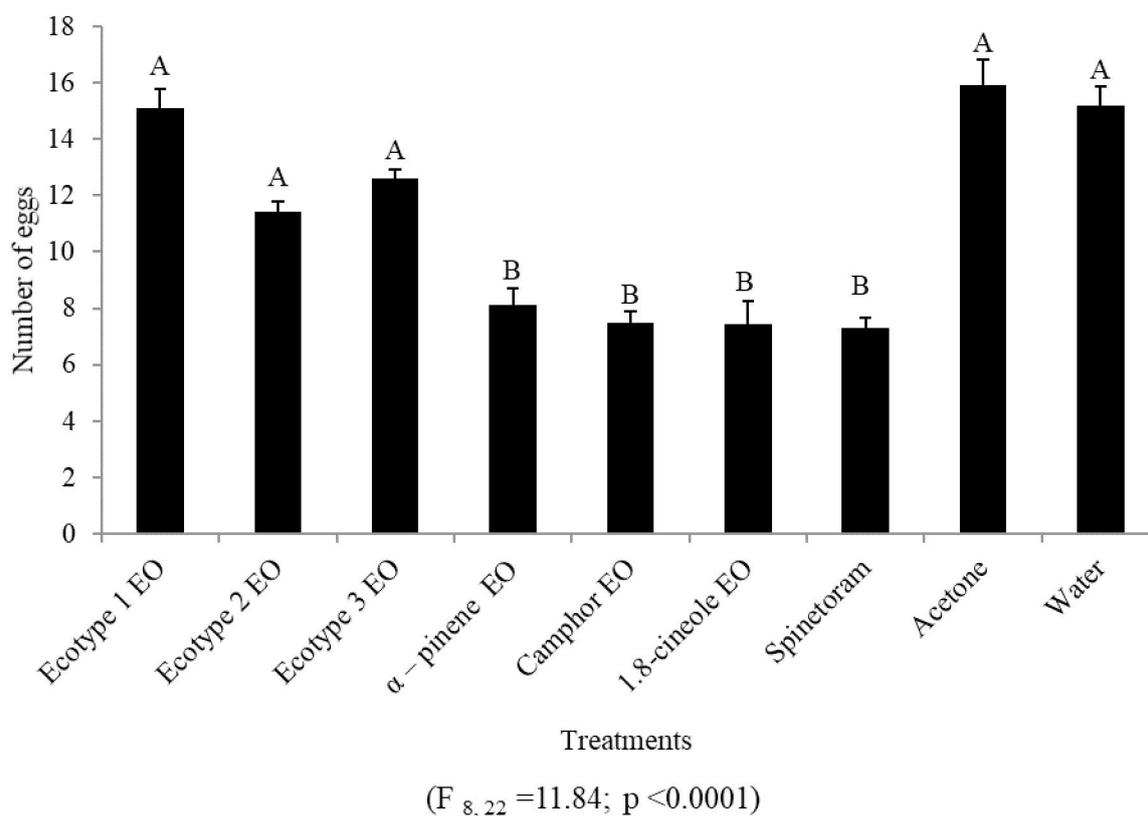


Figura 5-3- Número de ovos de *Drosophila sukii* no bioensaio de imersão em “frutos artificiais” em condições de laboratório.

As médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferiram significativamente (GLM com distribuição quase binomial seguida pelo teste de Tukey; $P > 0,05$).

Ao avaliar a toxicidade letal sobre adultos de *T. anastrephae*, os ECO 1, 2 e 3 e seus constituintes majoritários α -pineno, cânfora, 1,8-cineol proporcionaram mortalidade inferior a 20% dos adultos em bioensaio de ingestão (Tabela 5-5). Estes valores foram significativamente menores ($F_{6, 14} = 10,12, p < 0.0004$) ao comparar com o spinetoram (mortalidade de 46,1%) (Table 5-5). Em contraste, todos os tratamentos avaliados não apresentaram efeito subletal ($F_{6, 14} = 10,12, P < 0,1115$) no parasitismo diário ao longo de sete dias (Tabela 5-5).

Tabela 5-5- Mortalidade (%) e parasitismo (P, %) de *Trichopria anastrephae* após 120 horas de exposição dos tratamentos pelo bioensaio de ingestão.

Tratamentos	Concentration (mg L ⁻¹)	Mortalidade ^a	P (%) ^a
Ecótipo 1 OE	8%	15,4 ± 1,14B	49,7 ± 1,40A
Ecótipo 2 OE	8%	14,3 ± 2,97B	53,1 ± 1,46A
Ecótipo 3 OE	8%	16,5 ± 2,11B	48,6 ± 2,11AB
α – pineno OE	8%	11,45 ± 3,24B	50,2 ± 1,17A
cânfora OE	8%	12,4 ± 1,15B	58,6 ± 0,98A
1,8-cineol OE	8%	10,5 ± 3,13B	52,1 ± 0,97A
espinoteram	75g 100 L ⁻¹ g	46,1 ± 3,10A	43,8 ± 2,14

^aMédias dentro de uma coluna seguidos pela mesma letra não diferem significativamente (GLM com uma distribuição quase binomial seguida pelo teste de Tukey $P > 0.05$).

5.4 DISCUSSÃO

Neste estudo, diferenças qualitativas e quantitativas na composição química dos OEs foram identificadas nos três ECOs de *R. officinalis* cultivadas na região Neotropical. Conforme verificado a composição química dos OEs de *R. officinalis*, os componentes majoritários foram constituídos de terpenos, com destaque aos α -pineno; 1,8-cineol e cânfora,

corroborando com estudos realizados na com espécies de *R. officinalis* coletadas na Espanha (Arnold *et al* 1997), Itália, Canadá e Tunísia (Bereta *et al* 2011, Isman *et al* 2008; Zoauali *et al* 2010). Entretanto, pode-se observar que ocorre uma variação na composição desses compostos com taxas variando de 9,3 a 20,1% (α -pineno), 13,0 a 44,9% (1,8-cineol) e 12,1 a 19,9 (cânfora). De acordo com vários estudos, essa variação na composição química dos constituintes majoritários dentro da mesma espécie em folhas pode estar atribuída a fatores ambientais, climáticos, genéticos e localização geográfica (Junior, 2003; Ismann *et al* 2008; Feitosa-Alcantara, 2017).

Ao avaliar a toxicidade sobre adultos de *D. sukii* foi verificado que os OEs intactos dos três ECOs de *R. officinalis* e seus constituintes majoritários foram altamente tóxicos para adultos de *D. sukii* em bioensaio de ingestão e aplicação tópica, sendo similar ao inseticida comercial a base de espinosina. Embora, o modo de ação dos terpenos não tenha sido atribuído, podemos destacar que os metabólitos secundários interferiram nos componentes vitais do sistema nervoso, uma vez com que as moscas apresentaram sinais de tremores, seguidas de paralisia e conseqüente morte após a ingestão ou contato com os produtos.

Para *D. sukii*, a maioria dos inseticidas sintéticos utilizados no controle, tais como organophosphorous, pyrethroid and spinosyn, atuam em receptores da AChE ou canais de sódio (Casida & Durkin 2013). Até o momento, populações de *D. sukii* resistentes a espinosina foram relatadas apenas em Watsonville, CA, EUA (Gress & Zalom 2018). Porém, devido aos aspectos biológico da espécie (grande polifagia, curto ciclo biológico e rápida dispersão) (Lee *et al* 2011, Hauser 2011) associado ao uso indiscriminado de inseticidas no Brasil (6 a 8 aplicações por safra) (Andreazza *et al* 2017), em épocas de ocorrência da praga (fevereiro a junho) (Wollmann *et al* 2019), pode favorecer a evolução da resistência da praga no País. Dentro deste cenário, a prospecção de produtos com um modo de ação diferente pode

ser utilizada no manejo da praga para favorecer a rotação de modo de ação, prevenir, retardar ou evitar a evolução da resistência da praga (Gress & Zalom 2018).

Além de apresentar elevada toxicidade sobre adultos de *D. suzukii*, os constituintes individuais (α -pineno, 1,8-cineol e cânfora) tiveram efeitos deterrentes na oviposição, reduzindo significativamente o número de ovos por fruto. Fato não observado para os ecótipos 1, 2 e 3. A prospecção de produtos que afetam o comportamento biológico da praga é de suma importância para o manejo da espécie, visto que os maiores danos ocasionados pela infestação de *D. suzukii* é mediante o rompimento da epiderme dos frutos, principalmente, frutos de epiderme fina, para a deposição dos ovos (Lee *et al* 2011; Goodhue *et al* 2011; Asplen *et al* 2015; Andrezza *et al* 2017; Farnsworth *et al* 2017). Desta forma, produtos que possuem a característica deterrente podem resultar em menor quantidade de ruptura na epiderme e, conseqüentemente, uma redução significativa de infestação por patógenos que aceleram os processos de deterioração dos frutos (Mitsui *et al* 2006, Calabria *et al* 2012; Bernardi *et al* 2017). Além do mais, favorece para a diminuição da densidade populacional da praga no pomar (Ioannou *et al* 2012; Bernardi *et al* 2017; Geisler *et al* 2019).

Outro fator que pode contribuir positivamente para o manejo das populações de *D. suzukii* com a utilização de ECOs de *R. officinalis* e seus contituintes majoritários foi a baixa mortalidade ocasionada a adultos de *T. anastrephae* em bioensaio de ingestão. Espécie encontrada naturalmente no campo parasitando pupas de *D. suzukii* em áreas com cultivos de morango (Wollmann *et al* 2016, Andrezza *et al* 2017). Além de proporcionar baixa mortalidade, não ocasionaram efeitos subletais no parasitismo de pupas ao logo do tempo, ficando evidente ser uma alternativa para o uso em programas de Manejo Integrado de *D. suzukii* (Kogan 1998, Desneux *et al* 2007, Biondi *et al* 2012, Biondi *et al* 2013).

Desta forma, levando-se em consideração a elevada toxicidade sobre adultos de *D. suzukii* em diferentes formas de exposição, efeitos deterrentes na oviposição de fêmeas e

compatibilidade com adultos de *T. anastrephae*, a utilização de óleos essenciais de *R. officinalis* ou de seus constituintes majoritários α -pineno, 1,8-cineol e cânfora para a formulação de bioinseticidas torna-se uma alternativa viável, sustentável e com capacidade de gerar produtos naturais compatíveis com a entomofauna benéfica. Sendo assim, este estudo pode contribuir futuramente para o desenvolvimento de novos produtos (moléculas) para o manejo de *D. suzukii*, em programas de MIP, principalmente, devido a *R. officinalis* ser abundantemente cultivado na região Neotropical.

Acknowledgments

This study was carried out with the support of the Coordination of Superior Level Staff Improvement—Brazil (CAPES) — Financing Code 001 and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ).

5.5 REFERÊNCIAS

Adams RP (2007) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th edn. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL

Andreazza F, Haddi K, Oliveira E E Ferreira JAM (2016) *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) Arrives at Minas Gerais State, a Main Strawberry Production Region in Brazil. Florida Entomologist 99(4):796–798. <http://dx.doi:10.1653/024.099.0439>

Andreazza F, Bernardi D, Nava DEBotton M, Costa VA (2017) Inimiga parasitada. Cultivar HF 102:20–23.

Aguiar-Menezes EL, Menezes E.L, Silva PSBittar AC, Cassino PCR (2001) Native hymenopteran parasitoids associated with *Anastrepha* spp (Diptera: Tephritidae) in

Seropedica city, Rio De Janeiro, Brazil. Florida Entomologist 84 (4):706–711.
<http://dx.doi:10.2307/3496405>

Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coisson JD, Arlorio M, Dessi S, Coroneo V, Cabras P (2004) Chemical Composition, Plant Genetic Differences, Antimicrobial and Antifungal Activity Investigation of the Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(11):3530–3535. <http://dx.doi:10.1021/jf049913t>

Arnold N, Valentini G, Bellomaria B, Hocine L (1997) Comparative Study of the Essential Oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. from Algeria and *R. officinalis* L. from Other Countries. Journal of Essential Oil Research 9(2):167–175.
<http://dx.doi:10.1080/10412905.1997.9699454>

Asplen MK, Anfora G, Biondi A, Choi D-S, Chu D, Daane KM, Gibert P, Gutierrez AP, Hoelmer KA, Hutchison WD, Isaacs R, Jiang Z-L., Kárpáti Z, Kimura MT, Pascual M, Philips CR, Plantamp C, Ponti L, Véték G, Vogt H, Walton VM, Yu Y, Zappalà L, Desneux N (2015) Invasion biology of spotted wing drosophila (*Drosophila suzukii*): a global perspective and future priorities. Journal of Pest Science 88 (3):469–494.
<https://doi.org/10.1007/s10340-015-0681-z>

Beretta G, Artali R, Facino RM, Gelmini F (2011) An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: The case of *Rosmarinus officinalis* L. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 55(5): 1255–1264.
<http://dx.doi:10.1016/j.jpba.2011.03.026>

Bernardi D, Ribeiro L, Andreatza F, Neitzke C, Oliveira EE, Botton M, Nava DE, Vendramim JD (2017) Potential use of *Ammonia* by products to control *Drosophila suzukii* and toxicity to its parasitoid *Trichopria anastrephae*. Industrial Crops and Products 110:30–35. <http://dx.doi:10.1016/j.indcrop.2017.09.004>

Biondi A, Mommaerts V, Smagghe G, Viñuela E, Zappalà L, Desneux N (2012) The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. Pest Management Science 68(12):1523–1536. <http://dx.doi:10.1002/ps.3396>

Bóscan MN, Godoy F (1996) Nuevos parasitoides de moscas de las frutas de los géneros *Anastrepha* y *Ceratitis* en Venezuela. *Agronomia Tropical* 46 (4):465–471.

Bruck DJ, Bolda M, Tanigoshi L, Klink J, Kleiber J, DeFrancesco J, Gerdeman B, Spitler H (2011) Laboratory and field comparisons of insecticides to reduce infestation of *Drosophila suzukii* in berry crops. *Pest Management Science* 67(11):1375–1385. <http://dx.doi:10.1002/ps.2242>

CAB International (2019) Invasive species compendium: *Drosophila suzukii* (spotted wing drosophila). Available at <https://www.cabi.org/isc/datasheet/109283>.

Calabria G, Máca J, Bächli G, Serra L, Pascual M (2012) First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe. *Journal of Applied Entomology* 136(1-2):139–147. <http://dx.doi:10.1111/j.1439-0418.2010.01583.x>

Casida JE, Durkin K A (2013) Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annual Review of Entomology* 58(1):99–117. <http://dx.doi:10.1146/annurev-ento-120811-153645>

Corrêa JCR, Salgado HRN (2011) Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s 13(4):500–506. <http://dx.doi:10.1590/s1516-05722011000400016>

Cruz PP, Neutzling AS, Garcia FRM (2011) Primeiro registro de *Trichopria anastrephae*, parasitoide de moscas-das-frutas, no rio grande do Sul. *Ciencia Rural* 41 (8):1297–1299. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011000800001>

De Ros G, Conci S, Pantezzi T, Savini G (2015) The economic impact of invasive pest *Drosophila suzukii* on berry production in the Province of Trento, Italy. *Journal of Berry Research* 5(2):89–96. <http://dx.doi:10.3233/jbr-150092>

Dreves AJ (2011) IPM program development for an invasive pest: coordination, outreach and evaluation. *Pest Management Science* 67(11):1403–1410. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.2266>

EPPO 2020 European and mediterranean plant protection organization (EPPO) global database. EPPO, Paris, France. <https://gd.eppo.int/taxon/DROSSU/distribution>. (Accessed 22 February 2020).

Erland LAE, Rheault MR, Mahmoud SS (2015) Insecticidal and oviposition deterrent effects of essential oils and their constituents against the invasive pest *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae). *Crop Protection* 78:20–26. <http://dx.doi:10.1016/j.cropro.2015.08.013>

McLafferty FW, Stauffer DB (1994) *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, 6th edn. Wiley Interscience, New York, NY.

Farnsworth D, Hamby KA, Bolda M, Goodhue RE, Williams JC, Zalom FG (2017) Economic analysis of revenue losses and control costs associated with the spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii* (Matsumura), in the California raspberry industry. *Pest Manag. Sci.* 73:1083–1090. <https://doi.org/10.1002/ps.4497>

Feitosa-Alcantara R, Bacci L, Blank A, Alves P, Silva I, Soares C, Sampaio TS, Nogueira PCL, Arrigoni-Blank M (2017) Essential oils of *Hyptis pectinata* chemotypes: isolation, binary mixtures and acute toxicity on leaf-cutting ants. *Molecules* 22(4):621. <http://dx.doi:10.3390/molecules22040621>

Finney DJ (1971) *Probit Analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press.

Garcia FRM, Corseuil E (2004) Native hymenopteran parasitoids associated with fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Santa Catarina state, Brazil. *Florida Entomologist* 87 (4):517–521. [http://dx.doi:10.1653/0015-4040\(2004\)087\[0517:NHPAWF\]2.0.CO;2](http://dx.doi:10.1653/0015-4040(2004)087[0517:NHPAWF]2.0.CO;2)

Goodhue RE, Bolda M, Farnsworth D, Williams JC, Zalom FG (2011) Spotted wing drosophila infestation of California strawberries and raspberries: economic analysis of potential revenue losses and control costs. *Pest Management Science* 67(11):1396–402. <https://doi.org/10.1002/ps.2259>

Gress BE, Zalom FG (2018) Identification and risk assessment of spinosad resistance in a California population of *Drosophila suzukii*. *Pest Management Science* 75: 1270-1276. <http://dx.doi:10.1002/ps.5240>

Hamby KA, Bellamy DE, Chiu JC, Lee JC, Walton VM, Wiman NG, York RM, Biondi A (2016) Biotic and abiotic factors impacting development, behavior, phenology, and reproductive biology of *Drosophila suzukii*. *Journal of Pest Science* 89 (3):605–619. <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0756-5>

Hauser M, Gaimari S, Damus M (2009) *Drosophila suzukii* new to North America. *Fly Times* 43:12–15.

Hauser M (2011) A historic account of the invasion of *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in the continental United States, with remarks on their identification. *Pest Management Science* 67(11):1352–1357. <http://dx.doi:10.1002/ps.2265>

Haye T, Girod P, Cuthbertson AGS, Wang XG, Daane KM, Hoelmer KA, Baroffio C, Zhang JP, Desneux N (2016) Current SWD IPM tactics and their practical implementation in fruit crops across different regions around the world. *Journal of Pest Science* 89(3):643–651. <http://dx.doi:10.1007/s10340-016-0737-8>

Henderson CF, Tilton EW (1955) Tests with acaricides against the brown wheat mite. *Journal of Economic Entomology* 48(2):157–161. <http://dx.doi:10.1093/jee/48.2.157>

Holley RA, Patel D (2005) Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22(4):273–292. <http://dx.doi:10.1016/j.fm.2004.08.006>

Isman MB (2000) Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19(8-10):603–608. [http://dx.doi:10.1016/s0261-2194\(00\)00079-x](http://dx.doi:10.1016/s0261-2194(00)00079-x)

Isman MB, Wilson JA, Bradbury R (2008) Insecticidal Activities of Commercial Rosemary Oils (*Rosmarinus officinalis*.) Against Larvae of *Pseudaletia unipuncta*. and *Trichoplusia*

ni. in Relation to Their Chemical Compositions. *Pharmaceutical Biology* 46(1-2):82–87.
<http://dx.doi:10.1080/13880200701734661>

Jankowska M, Rogalska J, Wyszowska J, Stankiewicz M (2017) Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System—A Review. *Molecules* 23(1):34. <http://dx.doi:10.3390/molecules23010034>

Kim J, Jang M, Shin E, Kim J, Lee SH, Park CG (2016) Fumigant and contact toxicity of 22 wooden essential oils and their major components against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 133:35–43.
<http://dx.doi:10.1016/j.pestbp.2016.03.007>

Kostyukovsky M, Rafaeli A, Gileadi C, Demchenko N, Shaaya E (2002) Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Management Science* 58(11):1101–1106.
<http://dx.doi:10.1002/ps.548>

Lahlou M, Berrada R (2003) Composition and nematicidal activity of essential oils of three chemotypes of *Rosmarinus officinalis* L. acclimatized in Morocco. *Flavour and Fragrance Journal* 18(2):124–127. <http://dx.doi:10.1002/ffj.1160>

Lee JC, Bruck DJ, Curry H, Edwards D, Haviland DR, Van Steenwyk RA, Yorgey BM (2011) The susceptibility of small fruits and cherries to the spotted-wing drosophila, *Drosophila suzukii*. *Pest Management Science* 67(11):1358–1367.
<http://dx.doi:10.1002/ps.2225>

Lee JC, Bruck DJ, Dreves AJ, Ioriatti C, Vogt H, Baufeld P (2011) In Focus: Spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, across perspectives. *Pest Management Science* 67(11):1349–1351. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.2271>.

Lee JC, Dreves AJ, Cave AM, Kawai S, Isaacs R, Miller JC, Van Timmeren S, Bruck DJ (2015) Infestation of wild and ornamental noncrop fruits by *Drosophila suzukii* (Diptera:

Drosophilidae). *Annals of the Entomological Society of America* 108 (2):117–129.
<https://doi.org/10.1093/aesa/sau014>

Marchiori CH, Pentead-Dias AM (2001) *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae) parasitoide de Diptera, coletadas em área de mata nativa e pastagem em Itumbiara, Goiás, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico* 68 (1):123–124.

Mitsui H, Takahashi KH, Kimura MT (2006) Spatial distributions and clutch sizes of *Drosophila* species ovipositing on cherry fruits of different stages. *Population Ecology* 48(3):233–237. <http://dx.doi:10.1007/s10144-006-0260-5>

Nelder JA, Wedderburn RWM (1972) Generalized linear models. *Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General)* 135 (3):370–384.

Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M (2007) Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18(5):414–420. <http://dx.doi:10.1016/j.foodcont.2005.11.009>

Park CG, Jang M, Yoon KA, Kim J (2016) Insecticidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of Lamiaceae plant essential oils and their major components against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Industrial Crops and Products* 89:507–513. <http://dx.doi:10.1016/j.indcrop.2016.06.008>

Park C, Jang M, Shin E, Kim J (2017) Myrtaceae Plant Essential Oils and their β -Triketone Components as Insecticides against *Drosophila suzukii*. *Molecules* 22(7):1050. <http://dx.doi:10.3390/molecules22071050>

Poyet M, Le Roux V, Gibert P, Meirland A, Prévost G, Eslin P, Chabrierie O (2015) The wide potential trophic niche of the asiatic fruit fly *Drosophila suzukii*: the key of its invasion success in temperate Europe? *PLoS One* 10:e0142785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142785>

R, D.C.T, 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation

Regnault-Roger C, Vincent C, Arnason JT (2012) Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. *Annual Review of Entomology* 57(1):405–424. <http://dx.doi:10.1146/annurev-ento-120710-100554>

Renkema JM, Wright D, Buitenhuis R, Hallett R H (2016) Plant essential oils and potassium metabisulfite as repellents for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Scientific Reports* 6(1). <http://dx.doi:10.1038/srep21432>

Renkema J, Buitenhuis R, Hallett R (2017) Reduced *Drosophila suzukii* Infestation in Berries Using Deterrent Compounds and Laminate Polymer Flakes. *Insects* 8(4):117. <http://dx.doi:10.3390/insects8040117>

Roubos CR, Rodriguez-Saona C, Holdcraft R, Mason KS, Isaacs R (2014) Relative Toxicity and Residual Activity of Insecticides Used in Blueberry Pest Management: Mortality of Natural Enemies. *Journal of Economic Entomology* 107(1):277–285. <http://dx.doi:10.1603/ec13191>

Ruangrungsi N, Piriyaipunyporn T, Hongratanaworakit T, Kotchabhakdi N, Siripornpanich V (2013) Effects of inhaled rosemary oil on subjective feelings and activities of the nervous system. *Scientia Pharmaceutica* 81(2): 531–542. <http://dx.doi:10.3797/scipharm.1209-05>

Santos RSS (2014) Ocorrência de *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) atacando frutos de morango no Brasil (Comunicado Técnico 159). Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, Brazil.

SAS Institute 2011. *Statistical Analysis System: Getting Started with the SAS Learning*, 9.2 ed. SAS Institute, Carry, NC.

Schlesener DCH, Wollmann J, Krüger APNunes A M, Bernardi D, Garcia FRM (2018) Biology and fertility life table of *Drosophila suzukii* on artificial diets. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 116(12):932-936. <http://dx.doi.org/10.1111/eea.12736>

Schlesener DCH, Wollmann J, Pazini JB, Grützmacher AD, Garcia FRM (2017) Effects of insecticides on adults and eggs of *Drosophila suzukii* (Diptera, Drosophilidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 43(2): 208-214. <http://dx.doi.org/10.25100/socolen.v43i2.5945>

Throne JE, Weaver DK, Chew V, Baker JE (1995) Probit Analysis of Correlated Data: Multiple Observations Over Time at One Concentration. *Journal of Economic Entomology* 88(5):1510–1512. <http://dx.doi:10.1093/jee/88.5.1510>

Tochen S, Dalton DT, Wiman N, Hamm C, Shearer PW, Walton VM (2014) Temperature-Related Development and Population Parameters for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) on Cherry and Blueberry. *Environmental Entomology* 43(2):501–510. <http://dx.doi:10.1603/en13200>

Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G. (2005) Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(6):2474–2478. <http://dx.doi:10.1128/aac.49.6.2474-2478.2005>

Turica A, Mallo RG (1961) Observaciones sobre la población de las “Tephritidae” y sus endoparásitos en algunas regiones citrícolas Argentinas. *Revista IDIA*. 6:145–161.

van den Dool H, Kratz PDJA (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A* 11:463–471. [http://dx.10.1016/s0021-9673\(01\)80947-x](http://dx.10.1016/s0021-9673(01)80947-x)

van Timmeren S, Isaacs R (2013) Control of spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, by specific insecticides and by conventional and organic crop protection programs. *Crop Protection* 54:126–133. <http://dx.doi:10.1016/j.cropro.2013.08.003>

Vieira JGA, Krüger AP, Scheuneumann T, Morais MC, Speriogin HJ, Garcia FRM, Nava DE, Bernardi D (2019) Some Aspects of the Biology of *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae), a Resident Parasitoid Attacking *Drosophila suzukii* (Diptera:

Drosophilidae) in Brazil. Journal of Economic Entomology 113(1):81-87. <https://doi.org/10.1093/jee/toz270>

Wilson TG (2001) Resistance of *Drosophila* to toxins. Annual Review of Entomology 46(1):545–571. <http://dx.doi:10.1146/annurev.ento.46.1.545>

Wollmann J, Schlesener DCH, Ferreira MSGarcia MS, Costa VA, Garcia FRM (2016) Parasitoids of Drosophilidae with potential for parasitism on *Drosophila suzukii* in Brazil. Drosophila Information Service . 99:38–42.

6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados apresentados na Tese fornecem informações importantes sobre o complexo de artrópodes (praga e inimigo natural) presentes na produção de frutas com epiderme delgada cultivadas no estado do Paraná. Esse Estado é caracterizado pela maioria de seu cultivo frutícola serem realizados em pequenas propriedades de cultivo orgânico ou de baixo resíduo, nas quais o uso de substâncias sintéticas é proibido ou restrito. Considerando os danos causados pela *Drosophila suzukii*, experimentos com plantas aromáticas inseticidas da família Asteraceae (*Baccharis* spp.), Lamiaceae (*Rosmarinus officinalis* L.) e Piperaceae (*Piper* spp.) foram realizados visando buscar métodos alternativos o manejo de pragas agrícolas menos impactante ao meio ambiente.

Após os bioensaios de ingestão e aplicação tópica verificou-se que os óleos essenciais de *B. calvescens*, *B. mesounera*, *B. oblongifolia*, *P. aduncum*, *P. gaudichadianum*, *P. marginatum*, ECO 1,8-cineol de *R. officinalis*, ECO cânfora de *R. officinalis*, e os constituintes isolados de cânfora e 1,8-cineol causaram mortalidade em aproximadamente 100% dos adultos de *D. suzukii*. Além disso, os resíduos secos desses OEs proporcionaram um efeito repelente na oviposição e efeitos negativos na viabilidade do ovo de *D. suzukii*. Produtos que diminuem a oviposição e repelem fêmeas de *D. suzukii* reduz a incidência de ruptura da epiderme por oviposição, o que conseqüentemente reduz a infestação por patógenos que aumentam os processos de decomposição de frutas. Outro fator importante foi a redução da viabilidade dos ovos, onde essa redução do número de larvas de *D. suzukii* traz como vantagem a redução de danos causados pela alimentação dos adultos em frutos.

No Brasil, não existe produtos registrados para o controle de *D. suzukii*, porém em casos emergenciais os produtores empregam o grupo químico da espinosina. Contudo, populações resistentes de *D. suzukii* a espinosina foram relatadas nos EUA. Isto é preocupante, devido aos aspectos biológico da espécie (grande polifagia, curto ciclo biológico e rápida dispersão) associado ao uso indiscriminado de inseticidas no Brasil (6 a 8 aplicações por safra), em épocas de ocorrência da praga (janeiro a junho), pode favorecer a evolução da resistência da praga no País. Dentro deste cenário, os OEs por possuírem modos de ação diferente podem ser uma ferramenta adicional no manejo da praga para favorecer a rotação de modo de ação, prevenir, retardar ou evitar a evolução da resistência da praga. Destaca-se também que a maioria dos OEs estudados proporcionaram baixa toxicidade para *T. anastrephae*, um endoparasitóide pupal recorrente nos pomares de frutas do Brasil.

Por fim, pretende-se dar continuidade aos estudos com *D. sukii*. Neste sentido, estudos adicionais são essenciais para investigar a domesticação das plantas e a otimização dos processos de extração de OE antes da estabilização de seus princípios ativos para manter alta eficácia inseticida no campo. Essas preocupações ainda merecem atenção e precisam de mais investigações para sua aplicação prática na agricultura moderna.

7 REFERÊNCIAS GERAIS

ABIHPEC-Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **Panorama do setor de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos**. Disponível em: <<http://www.abihpec.org.br/wp-content/uploads/2014/04/2014-PANORAMA-DO-SETOR-PORTUGU%C3%8AS-21-08.pdf>>. Acesso em: 03/12/2019.

AGGARWAL, D. D., RANGA, P., KAIRA, B., PARKASH, R., RASHKOVETSKY, E., BANTIS, L. E. Rapid effects of humidity acclimation on stress resistance in *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 166, 1, 81-90, 2013.

AGUIAR-MENEZES, E.L., MENEZES E.L., SILVA P.S., BITTAR A.C., CASSINO, P.C.R. Native hymenopteran parasitoids associated with *Anastrepha* spp (Diptera: Tephritidae) in Seropedica city, Rio De Janeiro, Brazil. **Florida Entomologist**, v. 84, p. 706–711, 2001.

AMARAL, W.; DESCHAMPS, C.; BIZZO, H.R.; PINTO, M.A.S.; SILVA, L.E.; BIASI, L.A. ; FREITAS, T.S.; ROCHA, J.E.; CAMPINA, F.F.; COSTA, M.S.; BEZERRA, C.F.; COUTINHO, H.D.M. **Essential oil of *Baccharis milleflora* in the Atlantic Rain Forest of the Paraná State in Brazil: chemical composition and biological evaluation**. In: Akhatar, Mohd sayeed; Swamy, Mallappa Kumara; Sinniah, Uma Rani. (Org.). *Natural Bio-active Compounds*. 1ed., 2019, v. 1, p. 599 – 608.

ANDREAZZA, F., BERNARDI, D., DOS SANTOS, R.S.S., GARCIA, F.R.M., OLIVEIRA, E.E., BOTTON, M., NAVA, D.E. *Drosophila suzukii* in Southern Neotropical Region: current status and future perspectives. **Neotropical Entomology**, v. 46, p. 591–605, 2017a.

ANDREAZZA, F.; BERNARDI, D.; NAVA, D.E.; BOTTON, M.; COSTA, V.A. Inimiga parasitada. **Cultivar HF**, 102, 20–23, 2017c.

ANDREAZZA, F., BERNARDI, D., BOTTON, M., NAVA, D.E. *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in peaches: is it a problem? **Science Agricola**, v. 74, p. 489–491, 2017b.

ANDREAZZA, F., BARONIO, C.A., BOTTON, M., VALGAS, R.A., RITSCHER, P.S., MAIA, J.D., GARCIA, F. NAVA, D.E. Suscetibilidade de bagas de genótipos de videira pela infestação por *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 599-606, 2016b.

ANDREAZZA, F., HADDI, K., OLIVEIRA, E.E., FERREIRA, J.A.M. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) arrives at Minas Gerais state, a main strawberry production region in Brazil. **Florida Entomologist**, 99, 796–798, 2016a.

ANFORA, G., GRASSI, A., REVARDI, S., GRAIFF, M. *Drosophila suzukii*: a new invasive species threatening European fruit production. **Environmental Change**, p. 1-7, 2012.

ARTUSO, A. **Bioprospecting, Benefit Sharing, and Biotechnological Capacity Building**. World Development, New Brunswick, v. 30, n. 8, p. 1355-1368, 2002.

ATALLAH, J., TEIXEIRA, L., SALAZAR, R., ZARAGOZA, G., KOPP, A. The making of a pest: the evolution of a fruit-penetrating ovipositor in *Drosophila suzukii* and related species. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, 281, 20132840–20132840, 2014.

BÄCHLI, G. TaxoDros: **The Database on Taxonomy of Drosophilidae**. v 1.04; Database 2015/03. Disponível em: <www.taxodros.uzh.ch> Acesso em: 03/12/2018.

BANDONI, A.L., CZEPAK, M.P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores, 1 ed. EDUFES: Vitória, Brazil, 2008. 345–367 p.

BASER, K.H.C., BUCHBAUER, G. Handbook of essential oils; science, technology, and applications. CRC Press, p. 994, 2012.

BEERS E.H., STEENWYK, R.A., SHEARER, P.W., COATES, W.W., GRANT. J.A. Developing *Drosophila suzukii* management programs for sweet cherry in the western United States. **Pest Management Science**, 67, p.1386-1395, 2011.

BENITO, N.P.; SILVA, M.L.; SANTOS, R.S.S. Potential spread and economic impact of invasive *Drosophila suzukii* in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 51, 571-578, 2016.

BERNARDI, D., ANDREAZZA, F., BOTTON, M., BARONIO, C.A., NAVA, D.E. Susceptibility and interactions of *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in damaging strawberry. **Neotropical Entomology**, v. 46, p. 1–7, 2017a.

- BERNARDI, D., RIBEIRO, L., ANDREAZZA, F., NEITZKE, C., OLIVEIRA, E. E., BOTTON, M., NAVA, D.E., VENDRAMIM, J.D. Potential use of *Annona* by products to control *Drosophila suzukii* and toxicity to its parasitoid *Trichopria anastrephae*. *Industrial Crops and Products*, 110, 30–35, 2017b.
- BIASI, L.A., DECHAMPS, C. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. 1 ed. Layer Studio Grafico e Editora Ltda, Curitiba, 2009. 16 p.
- BIZZO, H.R., HOVELL, A.M.C., REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, São Paulo, v.32, n.3, p. 588-594, 2009.
- BITNER-MATHÉ, B.C., VICTORINO, J., FARIA, F.S. *Drosophila suzukii* has been found in tropical Atlantic rainforest in southeastern Brazil. *Drosophila Information Service*, 97, 136–137, 2014.
- BÓSCAN, M.N., GODOY F. Nuevos parasitoides de moscas de las frutas de los géneros *Anastrepha* y *Ceratitidis* en Venezuela. *Agronomía Tropical*, 46, 465–471, 1996.
- BRASIL. Presidência da República. **MP- nº 2.186-16 de 23 de agosto de 2001**.
- BUBLIY, O.A., KRISTENSEN, T.N., LOESCHCKE, V. Stress-induced plastic responses in *Drosophila simulans* following exposure to combinations of temperature and humidity levels. *Journal of Experimental Biology*, 216, 4601–4607, 2013.
- CALABRIA, G., MACA, J., B'ACHLI, G., SERRA, L., PASCUA, M. First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe. *Journal Applied Entomology*, 136, 139-147, 2011.
- CARVALHO, G.A., ALVES, D.S., OLIVEIRA, D.F. A química na produção vegetal. In: Bioensaios para a seleção de metabólitos secundários de plantas ativos contra insetos. Rio Parnaíba: MG Dos autores. 2017, p. 52-84.
- CICHÓN, L.I., LAGO, J.D., GARRIDO, S.A. (2015) Primera detección de *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1939) (Diptera: Drosophilidae) en frambuesas del Valle de Río Negro, Argentina. In: Marti D (ed) IX Congreso Argentino de Entomología Posadas: libro de resúmenes. Universidad Nacional de Misiones, Posadas, p 270.

CINI, A., IORIATTI, C., ANFORA, G. A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. **Bulletin of Insectology**, v. 65, n. 1, p. 149-160, 2012.

ČOLOVIĆ, M.B., KRSTIĆ, D.Z., LAZAREVIĆ-PAŠTI, T.D., BONDŽIĆ, A.M., VASIĆ, V.M. 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Current Neuropharmacology**, 11, 315–335.

CRUZ, P.P., NEUTZLING, A.S., GARCIA, F.R.M. Primeiro registro de *Trichopria anastrephae*, parasitoide de moscas-das-frutas, no rio grande do Sul. **Ciencia Rural**, 41, 1297–1299, 2011.

CUNHA, F.A.B., SANTOS, E.B., BRAGA JÚNIOR, F.A.T. Bioprospecção: marcos legais para a proteção da biodiversidade e normatização do acesso ao patrimônio genético e seus derivados. In: **XXI Encontro Regional de Estudantes de Direito e Encontro Regional de Assessoria Jurídica Universitária “20 anos de Constituição. Parabéns! Por quê?”** 2008.

DA LAGE, J.L., KERGOAT, G.J., MACZKOWIAK, F., SILVAIN, J.F., CARIOU, M.L., LACHAISE, D.A. phylogeny of Drosophilidae using the Amyrel gene: questioning the *Drosophila melanogaster* species group boundaries. **Journal of Zoological and Evolutionary Research**, v. 45, p. 4763, 2007.

DAFF. **Final pest risk analysis report for *Drosophila suzukii***. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Australian Government. 2013. Disponível em: <<http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/ba/plant/2013/drosophilasuzukii-pra/Final-PRAreport-Drosophila-uzukii.pdf>> Acesso em: 03/12/2019.

DEPRÁ, M., POPPE, J.L., SCHMITZ, H.J., DE TONI, D.C., VALENTE, V.L.S. The first records of the invasive pest *Drosophila Suzukii* in South American Continent. **Journal of Pest Science**, v. 87, p. 379-383, 2014.

DE ROS, G., CONCI, S., PANTEZZI, T., SAVINI, G. The economic impact of invasive pest *Drosophila suzukii* on berry production in the Province of Trento, Italy. **Journal of Berry Research**, v. 5, p. 89–96, 2015.

DJILANI, A., DICKO, A. **The Therapeutic Benefits of Essential Oils**. In: BOUAYED, J. (Ed.). Nutrition, Well-Being and Health. [s.l.] InTech, 2012. p. 155–178.

DREVES, A.J., RHODALACK, G.A.L. **Protecting garden fruits from spotted wing drosophila**. Oregon State University, Extension Service. 2011. Disponível em: <<http://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/20883/em9026>>. Acesso em: 03/12/2019.

EMILJANOWICZ, L.M., RYAN, G.D., LANGILLE, A., NEWMAN, J. Development, reproductive output and population growth of the fruit fly pest *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) on artificial diet. **Journal of Economy Entomological**, v.107, p.1392-1398, 2014.

EPPO – **European and mediterranean plant protection organization**. EPPO, Paris, France. <<https://gd.eppo.int/taxon/DROSSU/distribution>> Acesso em: 03/12/2019.

ERLAND, L.A.E., RHEAULT, M.R., MAHMOUD, S.S. Insecticidal and oviposition deterrent effects of essential oils and their constituents against the invasive pest *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae). **Crop Protection**, 78, 20–26, 2015.

FARNSWORTH, D.K.A., HAMBY, M., BOLDA, R.E., GOODHUE, J.C., WILLIAMS, J.C., ZALOM, F.G. Economic analysis of revenue losses and control costs associated with the spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii* (Matsumura), in the California raspberry industry. **Pest Management Science**, v. 73, n. 6, p. 1083–1090, 2017.

FERRONATO, P., WOCH, A.L., SOARES, P. L., BERNARDI, D., BOTTON, M., ANDREAZZA, F., OLIVEIRA, E., CORREA, A.S. A Phylogeographic Approach to the *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) Invasion in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 112, p. 425–433, 2019.

FRITZ, L.L., HEINRICHS, E.A., PANDOLFO, M., SALLES, S.M., OLIVEIRA, J.V., FIUZA, L.M. Agroecossistemas orizícolas irrigados: insetos-praga, inimigos naturais e manejo integrado. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 720-732, 2008.

FORZZA, R.C.; BAUMGRATZ, J.F.A.; BICUDO, C.E.M.; CANHOS, D.A.L.; JUNIOR CARVALHO, A.A.; COELHO, M.A.N.; COSTA, A.F.; COSTA D.P.; HOPKINS, P.M.; LOHMANN, L.G.; LUGHADHA, E.N.; MAIA, L.C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; PIRANI, J.R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L.P.; SOUZA, S.; SOUZA, V.C.;

STEHMANN, J.R.; SYLVESTRE, L.S.; WALTER, B.M.T.; ZAPPI, D.C. New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. **BioScience**, v.62, n.1, p. 39-45, 2012.

FUNARI, C.S., FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.15, n.2, p. 178-182, 2005.

FUNES, C.F., KIRSCHBAUM, D.S., ESCOBAR, L.I., HEREDIA, A.M. **La mosca de las alas manchadas, *Drosophila suzukii* (Matsumura), nueva plaga de las frutas finas en Argentina**. 1ª ed. – Famaillá, Tucumán: Ediciones INTA, Libro digital, 2018.

KAWASE, S., UCHINO, K., YASUDA, M., MOTOORI, S. Netting control of cherry *Drosophila suzukii* injurious to blueberry. **Bulletin of Chiba-Ken Agricultural Experiment Station**, v. 7, p. 9–15, 2008.

GABARRA, R., RIUDAVETS, J., RODRIGUEZ, G.A., PUJADE-VILLAR, J., ARNÓ, J. Prospects for the biological control of *Drosophila suzukii*. **Biological Control**, 60, 331-339, 2015.

GARCIA, F.R.M., CORSEUIL, E. Native hymenopteran parasitoids associated with fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Santa Catarina state, Brazil. **Florida Entomologist**, 87, 517–521, 2004.

GEISLER, F.C.S., SANTOS, J., HOLDEFER, D.R., GARCIA, F.R.M. Primeiro registro de *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) para o estado do Paraná, Brasil e de novos hospedeiros. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 9, p. 125–129, 2015.

GONZÁLEZ, G., MARY, A.L., GOÑI, B. *Drosophila suzukii* (Matsumura) found in Uruguay. **Drosophila Information Service**, v. 98, p. 103–107, 2015.

GOODHUE, R.E., BOLDA, M., FARNSWORTH, D., WILLIAMS, J.C., ZALOM, F.G. Spotted wing drosophila infestation of California strawberries and raspberries: economic analysis of potential revenue losses and control costs. **Pest Management Science**, 67, 1396-402, 2011.

HAUSER, M. A historic account of the invasion of *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in the continental United States, with remarks on their identification. **Pest Management Science**, v. 67, p. 1352-1357, 2011.

HAYE, T., GIROD, P., CUTHBERTSON, A.G.S., WANG, X.G., DAANE, K.M., HOELMER, K.A., BAROFFIO, C., ZHANG, J.P., DESNEUX, N. Current SWD IPM tactics and their practical

implementation in fruit crops across different regions around the world. **Journal of Pest Science**, 89, 643- 651, 2016.

IDEO, S., WATADA, M., MITSUI, H., KIMURA, M.T. Host range of *Asobara japonica* (Hymenoptera: Braconidae), a larval parasitoid of drosophilid flies. **Entomological Science**, 11, 1–6, 2008.

ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, 19, 603–608, 2000.

ITC TRADE MAP-Internation Trade Center. **Trade statistics for international business development**. Disponível em: <<http://www.trademap.org/Index.aspx>>. Acesso em: 03/12/2018.

JANKOWSKA, M., ROGALSKA, J. WYSZKOWSKA, J. STANKIEWICZ, M. Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system-a review. **Molecules**. 23:pii E34, 2017.

KACSOH, B.Z., SCHLENKE, T.A. High hemocyte load is associated with increased resistance against parasitoids in *Drosophila suzukii*, a relative of *D. melanogaster*. **PLoS One**, 7, 1–16, 2012.

KANZAWA, T. Research into the fruit fly *Drosophila suzukii* Matsumura Yamanashi Prefecture Agricultural Experiment Station Report, v. s/e, p.1934-1948, 1939.

KAWASE, S., UCHINO, K., YASUDA, M., MOTOORI, S. Netting control of cherry *Drosophila suzukii* injurious to blueberry. **Bull Chiba Pref Agric Res Cent**, 7, 9–15, 2008.

KIM, J., JANG, M., SHIN, E., KIM, J., LEE, S.H., PARK, C.G. Fumigant and contact toxicity of 22 wooden essential oils and their major components against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 133, 35–43, 2016.

KIMURA, M.T. Cold and heat tolerance of drosophilid flies with reference to their latitudinal distribution. **Oecologia**, 140, 442–449, 2004.

KRÜGER, A.P., SCHEUNEMANN, T., VIEIRA, J.G.A., MORAIS, M.C., BERNARDI, D., NAVA, D.E., GARCIA, F.R.M. Effects of extrinsic, intraspecific competition and host deprivation on the biology of *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae) reared on *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Neotropical Entomology**, 48, 957–965, 2019.

LEE, J.C., BRUCK, D.J., CURRY, H., EDWARDS, D., HAVILAND, D.R., VAN STEENWYK, R.A., YORGEY, B.M. The susceptibility of small fruits and cherries to the spotted-wing drosophila, *Drosophila suzukii*. **Pest Management Science**, 67, 1358–1367, 2011.

LAIRD, S., WYNBERG, R. **Bioprospecting: securing a piece of the pie**. World Conservation, Gland, v.38, n.1, p.28, 2008.

LIONETTO, M.G., CARICATO, R., CALISI, A., GIORDANO, M.E., SCETTINO, T. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. **BioMed Research International**, 39; Int. 2013, 1–8, 2013.

MALGUASHCA, F., FERGUSON, H., BAHDER, B., BROOKS, T., O'NEAL, S., WALSH, D. Spotted wing *Drosophila*, grape update: injured and ripening fruit may become more attractive: Monitoring strongly recommended. Pullman: Washington State University Extension, 2010. Disponível em < https://extension.wsu.edu/swd/Documents/SWDGrapeUpdate10_4_10.pdf>. Acesso em 05 março de 2020.

MARCHIORI, C.H., PENTEADO-DIAS, A.M. *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae) parasitóide de Diptera, coletadas em área de mata nativa e pastagem em Itumbiara, Goiás, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, 68, 123–124, 2001.

MAZZETTO, F., MARCHETTI, E., AMIRESMAEILI, N., SACCO, D., FRANCATI, S., JUCKER, C., DINDO, M.L., LUPI, D., TAVELLA, L. Field surveys on parasitoids of *Drosophila* spp. in North Italy and laboratory evaluation of their capacity to parasitize *Drosophila suzukii*. **Journal of Pest Science**, 89, 837-850, 2016.

MEDINA-MUÑOZ, M.C., LUCERO, X., SEVERINO, C., CABRERA, N., OLMEDO, D., DEL PINO, F., ALVAREZ, E., JARA, C., GODOY-HERRERA, R. *Drosophila suzukii* arrived in Chile. **Drosophila Information Service**, 98, 75, 2015.

MILLER B., ANFORA G., BUFFINGTON M., DAANE K.M., DALTON D.T., HOELMER K.M., ROSSI STACCONI, M.V., GRASSI A., IORIATTI C., MILLER J., QUANTAR M., WANG X.G., WIMAN, N., LONI, A., WALTON, V.W. Seasonal occurrence of resident parasitoids associated with *Drosophila suzukii* in two small fruit production regions of Italy and the USA.- **Bulletin of Insectology**, 68, 255-263, 2015.

MITSUI, H., VAN ACHTERBERG, K., NORDLANDER, G., KIMURA, M.T. Geographical distributions and host associations of larval parasitoids of frugivorous Drosophilidae in Japan. **Journal of Natural History**, 41, 1731–1738, 2007.

MITSUI, H., TAKAHASHI, K.H., KIMURA, M.T. Spatial distribution and clutch sizes of *Drosophila* species ovipositing on cherry fruits of different stages. **Population Ecology**, 48, 233–237, 2006.

NAVA, D.E. Controle biológico de insetos-praga em frutíferas de clima temperado: uma opção viável, mas desafiadora. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 20 p. 2007. (**Documentos 208**).

NAVA, D.E., BOTTON, M., BERNARDI, D., ANDREAZZA, F., BARONIO, C. A. Bioecologia, monitoramento e controle de *Drosophila suzukii* na cultura do morangueiro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 15p. 2015. (**Comunicado Técnico 398**).

PALMA, C.M., PALMA, M.S. Bioprospecção no Brasil: análise crítica de alguns conceitos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.64, n.3, p. 22-26, 2012.

PARRA, J.R.P., BOTELHO, P.S.M., CÔRREA-FERREIRA, B.S., BENTO, J.M.S. Controle biológico: terminologia. p.1-17, 2002.

PARK, C.G., JANG, M., YOON, K.A., KIM, J. Insecticidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of Lamiaceae plant essential oils and their major components against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Industrial Crops and Products**, 89, 507–513, 2016.

PAULA MA, LOPES PHS, TIDON R First record of *Drosophila suzukii* in the Brazilian savanna. **Drosophila Information Service**, 97, 113–115, 2014.

PEREIRA, A.M., LIMA, D.A.L.L. **Acordos de bioprospecção e conhecimentos tradicionais: as lições de casos nacionais e internacionais**. Anais do IV Encontro Nacional da Anppas, Brasília, 2008.

POYET, M., ESLIN, P., HÉRAUDE, M., LE ROUX, V., PRÉVOST, G., GILBERT, P., CHABRERIE, O. Invasive host pest: when the Asiatic cherry fly (*Drosophila suzukii*) meets the American black cherry (*Prunus serotina*) in Europe. **Agriculture and Forest Entomology**, 1-9, 2014.

RAJASHEKAR, Y., RAGHAVENDRA, A., BAKTHAVATSALAM, N. Acetylcholinesterase inhibition by biofumigant (Coumaran) from leaves of *Lantana camara* in stored grain and household insect pests. *BioMed Research International*, ID 187019, 1–6, 2014.

REFLORA – Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: Acesso em: 06 Mar. 2020.

REID, W.V., LAIRD, S.A., MEYER, C.A., GÁMEZ, R., SITTENFELD, A., JANZEN, D.H., GOLLINAND, M.A., JUMA, C. **Biodiversity prospecting: Using genetic resources for sustainable Development**. World Resources Institute, Washington, 1993. 341 p.

RENKEMA, J.M., WRIGHT, D., BUITENHUIS, R., HALLETT, R.H. Plant essential oils and potassium metabisulfite as repellents for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Scientific Reports*, 6, 1, 2016.

REVADI, S., LEBRETON, S., WITZGALL, P., ANFORA, G., DEKKER, T., BECHER, P. Sexual Behavior of *Drosophila suzukii*. *Insects*, 6, 183–196, 2015.

ROSSI STACCONI, M.V., GRASSI, A., DALTON, D.T., MILLER, B., OUANTAR, M., LONI, A., IORIATTI, C., WALTON, V.M., ANFORA, G. First field records of *Pachycrepoideus vindemiae* as a parasitoid of *Drosophila suzukii* in European and Oregon small fruit production áreas. *Entomologia*, 1, 11-16, 2013.

SACCARO-JUNIOR, N.L.A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. *Ambiente & Sociedade*, Campinas, v.14, n.1, p. 229-244, 2011.

SANTADINO, M.V., RIQUELME VIRGALA, M.B., ANSA, M.A., BRUNO, M., DI SILVESTRO, G., LUNAZZI, E.G. Primer registro de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) asociado al cultivo de arándanos (*Vaccinium* spp.) de Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 74, 183–185, 2015.

SANTILLI, J. Conhecimentos Tradicionais Associados à Biodiversidade: Elementos para a Construção de um Regime Jurídico Sui Generis de Proteção. In: **Diversidade Biológica e Conhecimentos Tradicionais**, Belo Horizonte, p.341-342, 2004.

SANTOS, R.S.S. Ocorrência de *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) atacando frutos de morango no Brasil. Embrapa Uva E Vinho, Bento Gonçalves, 4p. 2014. (Comunicado Técnico 159).

SCHLESENER, D.C.H, WOLLMANN, J., KRÜGER, A.P., NUNES, A.M., BERNARDI, D., GARCIA, F.R.M. Biology and fertility life table of *Drosophila suzukii* on artificial diets. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 166, 932-936, 2018.

SCHLESENER, D.C.H., WOLLMANN, J., TEIXEIRA, C.M., NUNES, A.M., GOTTSCHALK, M.S., GARCIA, F.R.M. *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera, Drosophilidae): biologia, ecologia e controle. Ed. da Universidade Federal de Pelotas [FAU - Fundação de Apoio Universitário], 2017. p.187.

SILVA, J.K.R., TRINDADE, R. ALVES, N.S., FIGUEIREDO, P.L., MAIA, J.G.S., SETZER, W.N. Essential Oils from Neotropical Piper Species and Their Biological Activities. *Int J Mol Sci.* 18, 1–42, 2017.

SILVA, C.G., MARCHIORI, C.H., FONSECA A.R., TORRES, L.C. Himenópteros parasitoides de larvas de *Anastrepha* spp. em frutos de carambola (*Averrhoa carambola* L.) na região de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil. *Ciência Agrotecnologia*, 27, 1264–1267, 2003.

SOUZA, M.T. **Bioprospecção da flora aromática de um segmento de Floresta Ombrófila Mista Montana do Paraná.** 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal – Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

STEWART, T.J., WANG, X.G., MOLINAR, A., DAANE, K.M. Factors limiting peach as a potential host for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Economic Entomology*, 107, 1771-1779, 2014.

TAIZ, L., ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*, trad. Eliane Romanato Santerém, et al. 4 ed. Porto Alegre, 2009.

THORMAR, H. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents.* John Wiley & Sons, Ltda, 1º edição, 2011. 334 p.

TIMMEREN, S.V., ISAACS, R. Control of spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, by specific insecticides and conventional and organic crop protection programs. **Crop Protection**, 54, 126-133, 2013.

TOCHEN, S.; DALTON, D.T.; WIMAN, N.; HAMM, C.; SHEARER, P.W.; WALTON, V.M. Temperature-related development and population parameters for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) on cherry and blueberry. **Environmental Entomology**, 43, 501–510, 2014.

TURICA, A., MALLO, R.G. Observaciones sobre la población de las “Tephritidae” y sus endoparásitos en algunas regiones cítricas Argentinas. **Revista IDIA**, 6, 145–161, 1961.

VIEIRA, J.G.A., KRÜGER, A.P., SCHEUNEUMANN, T., MORAIS, M.C., SPERIOGIN, H.J., GARCIA, F.R.M., NAVA, D.E., BERNARDI, D. Some aspects of the biology of *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae), a resident parasitoid attacking *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 113, 81-87, 2019.

VILELA, C.R., MORI, L. The invasive spotted-wing drosophila (Diptera, Drosophilidae) has been found in the city of São Paulo (Brazil). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, p. 371-375, 2014.

VOGEL, J.H. **Genes for sale: privatization as a conservation policy**. New York: Oxford University Press, 1994. 176 p.

WALSH, D.B., BOLDA, M.P., GOODHUE, R.E., DREVES, A.J., LEE, J.C., BRUCK, D.J., WALTON, V.M., O’NEAL S. D., ZALOM, F.G. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): Invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. **Journal of Integrated Pest Management**, v.1, p.1-7, 2011.

WOLLMANN, J.; SCHLESENER, D.C.H.; FERREIRA, M.S.; GARCIA, M.S.; COSTA, V.A.; GARCIA, F.R.M. Parasitoids of Drosophilidae with potential for parasitism on *Drosophila suzukii* in Brazil. **Drosophila Information Service**, 99, 38–42, 2016.

WUNDER, S. **Value determinants of plant extractivism in Brazil**. (Texto para discussão, 682). Instituto de Pesquisa Agronômica Aplicada, Rio de Janeiro, 1998. 59p.

YUNES, R.A. 2012. **In Chemistry of natural products: new drugs and modern pharmacognosy**; Yunes, R. A.; Cechinel Filho V., Org.; 3ª Ed. Univali, Itajaí, 384p. [Translation]

ZANARDI, O.Z., RIBEIRO, L.D.P., ANSANTE, T.F., SANTOS, M.S., BORDINI, G.P., YAMAMOTO, P.T., VENDRAMIM, J.D. Bioactivity of a matrine-based biopesticide against four pest species of agricultural importance. **Crop Protection**, 67, 160–167, 2015.