UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

TARCISIO SILVA MELO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOPESTICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Varronia curassavica* Jacq. CONTRA *Drosophila suzukii* (MATSUMURA, 1931), A MOSCA-DAS-ASAS-MANCHADAS: ABORDAGEM *IN VIVO* E *IN SILICO*.

Feira de Santana, BA
2024

TARCISIO SILVA MELO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOPESTICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DA ESPÉCIE *Varronia curassavica* Jacq. CONTRA *Drosophila suzukii* (MATSUMURA, 1931), A MOSCA-DAS-ASAS-MANCHADAS: ABORDAGEM *IN VIVO* E *IN SILICO*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Silva Andrade
Coorientador: Prof. Dr. Eugenio Eduardo de Oliveira

Feira de Santana, BA
2024

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

M486a
Melo, Tarcisio Silva
Avaliação do potencial biopesticida do óleo essencial da espécie Varronia curassavica Jacq. contra Drosophila suzukii (Matsumura, 1931), a mosca-das-asas-manchadas: abordagem in vivo e in silico / Tarcisio Silva Melo. – 2024
92 p.: il.

Orientador: Bruno Silva Andrade
Coorientador: Eugenio Eduardo de Oliveira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2024.

1. Biopesticidas. 2. Praga agrícola. 3. Plantas – Caatinga. I. Título. II. Andrade, Bruno Silva, orient. III. Oliveira, Eugenio Eduardo de, coorient. IV. Universidade Estadual de Feira de Santana.

CDU 632.95

Daniela Machado Sampaio Costa - Bibliotecária - CRB-5/2077

TARCÍSIO SILVA MELO

"Avaliação do potencial biopesticida dos óleos essenciais de plantas nativas da caatinga contra *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931), a mosca-das-asas-manchadas: Abordagem *in vivo* e *in silico*"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de doutor.

Feira de Santana, Bahia, 27 de março de 2024.

gov.br Documento assinado digitalmente
BRUNO SILVA ANDRADE
Data: 28/03/2024 06:06:50-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Orientador: Prof. Dr. **Bruno Silva Andrade**
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

gov.br Documento assinado digitalmente
RAQUEL GUIMARAES BENEVIDES
Data: 08/04/2024 11:53:13-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Membro: Profª. Dra. **Raquel Guimarães Benevides**
Universidade Estadual de Feira de Santana

gov.br Documento assinado digitalmente
BRUNO OLIVEIRA MOREIRA
Data: 28/03/2024 12:02:59-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Membro: Prof. Dr. **Bruno Oliveira Moreira**
Universidade Federal da Bahia

gov.br Documento assinado digitalmente
ANDRE LACERDA BRAGA TELES
Data: 28/03/2024 11:31:37-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Membro: Prof. Dr. **André Lacerda Braga Teles**
Universidade do Estado da Bahia

gov.br Documento assinado digitalmente
LUIS OSWALDO VITERI JUMBO
Data: 28/03/2024 12:51:23-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Membro: Prof. Dr. **Luís Viteri Jumbo**
Universidade Federal do Tocantins

À Deus, pelo amor e misericórdia

À minha esposa, Priscilla C. Rocha, pelo amor e apoio incondicional.

Aos meus pais, Vanda e José, pela criação e incentivo aos estudos.

As minhas irmãs e sobrinha, pelo amor e compreensão.

Aos meus familiares, que sempre estavam ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus por sua infinita misericórdia e por tanto me ajudar nessa caminhada, sem Ele eu nada seria.

À minha esposa Priscilla C. da Rocha, pelo apoio incondicional e por ser tão paciente e companheira, por sempre ouvir minhas histórias, meus resultados e minhas frustações também. Além disso, sempre esteve do meu lado quando eu precisei me ausentar, noites sem dormir, por toda minha luta e responsabilidades do dia-a-dia. Essa vitória também é sua.

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

Agradecer infinitamente à minha família, que também estive ausente para buscar meus objetivos, eles sempre estiveram do meu lado e me incentivaram a ir mais além. Meu Pai José Carolino de Melo, minha mãe Vanda Santos da Silva, minhas irmãs Geovana Santos de Melo e Tailane Silva Melo e minha sobrinha Julia Silva Melo. Muito obrigado por todo amor e carinho de vocês.

Ao meu orientador Dr. Bruno Silva Andrade por toda orientação, amizade e ensinamentos.

A todos meus amigos e colegas que sempre estão nos momentos bons e ruins da minha vida.

A todos meus colegas do laboratório LBQC, pela companhia diária e conversas que ajudam a melhorar o ambiente.

Aos meus amigos e companheiros do BRAIN&PHY pelo acolhimento e ajuda, em especial ao Prof. Dr. Eugênio E. Oliveira, Thiago Svacina, Jonatas Medeiros e Sabrina Araújo, muito obrigado por toda a ajuda.

A professora Dr. Rosane Aguiar e ao prof. Dr. Djalma Menezes, por ceder o LOE para extração dos Óleos essenciais e por confiar no meu trabalho.

Ao Professor Leandro Rocha e Francisco Machado da UFF-RJ, pela colaboração e contribuição nos dados da pesquisa dos óleos essenciais.

As instituições UEFS e UESB por toda ajuda técnica e de espaço.

"Dê-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter, método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar, graça e abundância para falar. Dê-me, Senhor, acerto ao começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir" (Santo Tomás de Aquino).

RESUMO GERAL

A *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) é uma espécie considerada uma praga agrícola global. Os danos econômicos causados pela *D. suzukii* resultaram em aproximadamente mais de 500 milhões de dólares na América do Norte e países da Europa, entre 2010 e 2012. Atualmente, essa espécie continua a causar danos significativos na agricultura em todo o mundo, sendo o Brasil um dos principais alvos devido à grande produção de frutas de casca mole, tais como morango, amora e uva, que são as principais culturas hospedeiras. A tese foi desenvolvida em três capítulos, Cap. 1 consistiu em uma revisão sobre as ferramentas de bioinformática no desenvolvimento de pesticidas contra *D. suzukii.* O Cap. 2 aborda a caracterização dos óleos essenciais da espécie *Varronia curassavica* Jacq. e os testes toxicológico (*in vivo*) com a praga *D. suzukii* e seus efeitos subletais em organismos não-alvo. No Cap. 3 estudos *in silico* para prever as possíveis interações e mecanismos de ação dos constituintes majoritários do óleo essencial de *V. curassavica* Jacq. (OEVC) contra a praga *D. suzukii* e organismos não-alvo. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial biopesticida dos constituintes majoritários do OEVC das folhas no controle da praga *Drosophila suzukii*, utilizando metodologias *in silico* e *in vivo*. Os dados revelados na análise de CG-EM determinaram o shyobunol (23,61%) e α-cadinol (7,29%) foram os constituintes majoritários. Nos testes *in vivo*, o óleo essencial controlou (LC_{95} = 1,95 µL/mL) *D. suzukii* sem matar ou prejudicar a espécie *Apis melífera* e as habilidades da espécie de joaninhas em predar pulgões *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus), sugerindo que os constituintes do EOs de *V. curassavica Jacq.* pode ser usado como ferramenta alternativa no controle de *D. suzukii.* Nos testes *in silico*, foi realizada a modelagem molecular das estruturas tridimensionais (3D) de alvos cruciais da *D. suzukii* e organismos não-alvos (e.g. Acetilcolinesterase – AChE, Receptor GABAa e Receptor Octopamina) pelo Swiss-Model e selecionadas as estruturas com valores de QMEAN acima de 0,5. Em seguida, foi realizado um acoplamento molecular pelo AutoDock 4 (versão 4.2.6) com os constituintes majoritários e classificadas as energias de ligação com melhores valores e comparadas com as dos organismos não alvo (e.g. *Apis mellifera e Harmonia axyridis*). Por fim, foram realizados cálculos de Dinâmica Molecular (DM) para avaliar a estabilidade dos constituintes dos OEs e comparados com as análises dos gráficos de RMSD e RMSF, além dos gráficos de ligação de hidrogênio, de raio de giro e de energia de ligação.

Palavras-chave: *Drosóphila-das-asas-manchadas; Apis melífera; Harmonia axyridis;* Óleos essenciais*;* biopesticida*; docking* molecular; dinâmica molecular;

ABSTRACT

Drosophila suzukii (Matsumura, 1931) is a global agricultural pest species. The economic damage caused by *D. suzukii* resulted in approximately 500 million dollars in North America and European countries between 2010 and 2012. This species continues to cause significant damage in agriculture worldwide, with Brazil one of the main targets due to the large production of soft-shelled fruits, such as strawberries, blackberries, and grapes, the main host crops. The thesis was developed in three chapters, Chapter 1 consisted of a review of bioinformatics tools in developing pesticides against *D. suzukii*. Chapter 2 talks about the toxicological tests (in vivo) of the essential oils of *Varronia curassavica* Jacq. with the pest *D. suzukii* and its sublethal effects on non-target organisms. In Chapter 3, in silico studies to predict the possible interactions and mechanisms of action of the major constituents of the EO of *V. curassavica* Jacq. against the pest *D. suzukii* and non-target organisms. This study aimed to evaluate the biopesticide potential of the major constituents of the essential oil (EO) of the species *Varronia curassavica* Jacq in controlling the pest *Drosophila suzukii*, using in silico and in vivo methodologies. The data revealed in the GC-MS analysis determined that shyobunol (23.61%) and α-cadinol (7.29%) were the majority constituents. In in vivo tests, the essential oil controlled (LC95 = 1.95 µL/mL) *D. suzukii* without killing or harming the species Apis melifera and the abilities of the ladybug species to prey on aphids Rhopalosiphum padi (Linnaeus), suggesting that the constituents from the EOs of *V. curassavica* Jacq. can be used as an alternative tool to control *D. suzukii*. In silico tests, molecular modeling of the three-dimensional (3D) structures of crucial *D. suzukii* targets and non-target organisms (e.g., Acetylcholinesterase – AChE, GABAa Receptor and Octopamine Receptor) was carried out by Swiss-Model and structures with values were selected of QMEAN above 0.5. Next, molecular coupling was performed using AutoDock 4 (version 4.2.6) with the majority constituents, and the binding energies with the best values were classified and compared with those of non-target organisms (e.g., *Apis mellifera* and *Harmonia axyridis*). Finally, Molecular Dynamics (MD) calculations were performed to evaluate the stability of the EO constituents and compared with the analysis of the RMSD and RMSF graphs, in addition to the hydrogen bond, radius of gyration, and binding energy graphs.

Keywords: *Spotted wing drosophila*; *Apis mellifera*; *Harmonia axyridis*; Essencial oils;; biopesticide; Molecular docking; Molecular dynamics;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Fig 1 Utilization of Molecular Databases for the Rational Development of Pesticides through Bioinformatics Tools.....**23**

Fig 2. Schematic visualization of in silico pesticide development process and bioinformatics tools.....**25**

Fig 3. Schematic Representation of Pesticide Development Using Molecular Dynamics Tools.....**30**

CAPÍTULO 2

Fig 1. Curva concentração-resposta para *Drosophila suzukii* para a espécie *V. curassavica* Jacq.....**50**

Fig 2. Números de pulgões predados durante um período de 24 h.....**50**

Fig 3. Total de Consumo das espécies de *C. maculata* e *E. connexa*.....**51**

Fig 4. Consumo da dieta e seletividade do OE durante um período de 24 h.....**52**

CAPÍTULO 3

Fig 1. Imagem dos gráficos de Ramachandran para os receptores GABA dos organismos alvo e não-alvo.....**71**

Fig 2. Imagem dos gráficos de Ramachandran para as enzimas acetilcolinesterase (AChE) dos organismos alvo e não-alvo. A. Graficos de Ramachandran das AChE dos organismos *D. suzukii*, *Apis mellifera* e *H. axyridis*. B. Estruturas tridimensionais das enzimas AChE *D. suzukii* (laranja); AChE *A. mellifera*; (verde) AChE *H. axyridis* (vermelho).....**72**

Fig 3. Imagem dos gráficos de Ramachandran para os receptores de Octopamina dos organismos alvo e não-alvo.....**73**

Fig 4. Estrutura química dos constituintes majoritários da espécie *V. curassavica* Jacq.....**74**

Fig 5. Mapa de interação da ligação dos constituintes da espécie *V. curassavica* Jacq as enzimas acetilcolinesterase (AChE) relacionados com *D. suzukii* e as espécies não-alvo *A. mellifera* e *H. axyridis*.....**75**

Fig 6. Mapa de interação da ligação dos constituintes da espécie *V. curassavica* Jacq os receptores de Octopamina relacionados com *D. suzukii* e as espécies não-alvo *A. mellifera* e *H. axyridis* **77**

Fig 7. Mapa de interação da ligação dos constituintes da espécie *V. curassavica* Jacq os receptores GABA selacionados com *D. suzukii* e as espécies não-alvo *A. mellifera* e *H. axyridis*.....**78**

Fig 8. O desvio quadrático médio (RMSD) em nanômetros (nm) *das enzimas AChE*.....**80**

Fig *9*. O desvio quadrático médio (RMSD) em nanômetros (nm) dos receptores de octopamina.....**81**

Fig 10. O desvio quadrático médio (RMSD) em nanômetros (nm) dos Receptores GABA.....**82**

Fig 11. Desvio médio quadrático de flutuação dos resíduos da enzima AChE e receptor de octopamina.....**83**

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Rendimento médio de óleos essencial das folhas frescas da espécie *Varronia curassavica Jaqc.*.....**47**

Tabela 2. Caracterização química do óleo essencial de (PL2) por CG-EM e CG-FID.....**48**

Tabela 3. Análise de variância com medidas repetidas ao longo do tempo durante 24 horas usando *V. curassavica* Jaqc. joaninhas expostas ao óleo essencial, *Coleomegilla maculata* e *Eriopis connexa*…….**50**

Tabela 4. Análise de variância com medidas repetidas ao longo do tempo durante 24 horas, incluindo 5 horas de exposição ao xarope tratado com óleo essencial de *Varronia curassavica* Jacq., com abelhas neotropicais *Apis mellifera e Partamona helleri*……..**51**

CAPÍTULO 3

Tabela 1. QMEANDisco Global (Análise de energia do modelo qualitativo).....**71**

Tabela 2. Docking Molecular dos constituintes α-Cadinol e shyobunol da espécie *V. curassavica Jaqc.* frente aos alvos moleculares das espécies alvo e não-alvo.....**74**

Tabela 3. Cálculos MM-PBSA da energia livre de ligação para os complexos dos organismos *alvo (D. suzukii)* e não alvos *(A. mellifera e H.axyridis)*.....**84**

SIGLAS

AChE – Acetilcolinesterase
GABA – Ácido-Gama aminobutírico
QMEAN - *Qualitative Model Energy Analysis*
GMQE - *Global Model Quality Estimate*
NIST - National Institute of Standards and Technology
NCBI – National Center for Biotechnology Information
nAChRs - nicotinic receptors
TRP - Transient Receptor Potential
GluCls - glutamate-gated chloride channels
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
OEs – Óleos Essenciais
IRAC – Insecticide Resistance Action Committee
MVD – Molegro Virtual Docker
PDB – Protein Data Bank
PDBQT – Protein Data Bank Partial Charge
NMR – Nuclear Magnetic Resonance
Ki – Constante de inibição
RMSD – Root-Mean Square Desviation
RMSF – Root-Mean Square Fluctuation
HBond – Ligação de hidrogênio
MD – Molecular Dynamics
RG – Radius of Gyration
CL – Concentração Letal
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG – Cromatografia Gasosa
MS – Mass Spectrometry
FID – Flame Ionization Detector
AI – Índice Aritmético
DMSO – Dimetilsulfóxido
TWEEN20 – Tensoativo Hidrofílico Polisorbato 20
ANOVA – Análise de Variância
ΔG_{bond} - Binding Free Energy
LGA – Algoritmo Genérico Lamarckiano
POPC - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
Cl – Cloro
Na – Sódio
TIP3P - Transferable Intermolecular Potentials with 3 Points
NVT – Number of Particles, System Volume and Temperature
NPT - Number of Particles, System Pressure and Temperature
K – Kelvin
Ps – Picossegundos
Ns – Nanossegundos
MMPBSA – Molecular Mechanics Poisson-Bolztmann Surface Area
ΔH_{bond} – Binding Enthalpy Energy
MM – Molecular Mechanics
μM – Micromolar

SUMÁRIO

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL **16**

CAPÍTULO 1. ADVANCING RATIONAL PESTICIDE DEVELOPMENT AGAINST *DROSOPHILA SUZUKII*: BIOINFORMATICS TOOLS AND APPLICATIONS **18**

Introduction **19**

1. *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) **19**

1.2.The Bioinformatics' role in pesticide development **20**

1.2.2 Genomic and Proteomic relational databases and datasets 21

1.2.3 Small molecules databases 22

1.3. Rational pesticide development for controling *Drosophila suzukii* **25**

1.3.1 PDB and Molecular Modeling of Proteins 25

1.3.2 Molecular Docking 27

1.3.3 Molecular Dynamics 29

1.4. Future Perspectives **32**

1.5. References **33**

CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *in vivo* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DA ESPÉCIE *Varronia curassavica* Jacq. EM *Drosophila suzukii* E ORGANISMOS NÃO-ALVOS **40**

2.1 Introdução **42**

2.2 Métodos e materiais **45**

2.2.1 Coleta do material vegetal para extração do Óleo Essencial (OEs) 45

2.2.2 Extração dos Óleos Essenciais (OEs) 45

2.2.3 Caracterização do óleo essencial 45

2.2.4 Bioensaios toxicológicos com adultos de *Drosophila suzukii* 46

2.2.5 Ensaio de seletividade de *Apis mellifera* e *Partamona helleri* 47

2.2.6 Bioensaios predatórios 47

2.2.8 Análises de dados e estatística 48

2.3 Resultados e discussão **49**

2.3.1 Óleo essencial e quantificação dos constituintes 49

2.3.2 Bioensaios toxicicológicos 51

3.4 Conclusão **56**

3.5 Referências **57**

CAPÍTULO 3. Estudos *in silico* dos receptores de *Drosophila suzukii* e dos organismos não-alvos *Coleomegilla maculata* e *Apis mellifera* **63**

3.1 Introdução **65**

3.2 Materiais e métodos **66**

3.2.3 Enzima acetilcolinesterase (AChE) e Receptor de Octopamina de *D. suzukii* 67
3.2.4 Enzima acetilcolinesterase (AChE) e Receptor de Octopamina dos organismos não-alvo *A. mellifera e H. axyridis* 67
3.2.5 Estudos de acoplamento molecular 68
3.3 Resultados e Discussões 71
3.3.1 Modelagem Molecular das Proteínas 71
3.3.2 *Docking* molecular 75
3.3.3 Dinâmica Molecular 80
3.3.4 Mecânica Molecular/Área de Superfície de Poisson-Boltzmann (MM/PBSA) 85
3.5 Referências 89
CONCLUSÃO GERAL 93

INTRODUÇÃO GERAL

A *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) é uma espécie de mosca da fruta pertencente à família Drosophilidae e ao gênero Drosophila. A espécie é considerada uma praga agrícola global, uma vez que pode causar danos significativos às frutas de diversos hospedeiros, incluindo cerejas, morangos, framboesas e uvas, entre outras (MAZZI et al., 2017)(MAZZI et al., 2017)(MAZZI et al., 2017) . Embora seja relatada primeiramente por Matsumura em 1931 no Japão, a origem da espécie é incerta e há evidências de que ela possa ser nativa da Ásia ou ter sido introduzida em várias regiões (HAUSER, 2011) ; MATSUMURA, 1931).

O clima temperado e subtropical são condições ideias para sobrevivência e permanência da mosca, com temperaturas abaixo de 30°C e umidade elevada, o que facilita sua proliferação em países, estados e regiões com condições climáticas favoráveis (ANDREAZZA et al., 2015). O Brasil apresenta condições climáticas favoráveis para a proliferação da mosca-das-frutas, que varia entre 20°C e 28°C, o que coincide com as temperaturas médias do Brasil em determinadas épocas do ano (NASCIMENTO et al., 2020).

Além disso, o Brasil é um grande produtor de frutas de casca mole, como morango, amora e uva, que são as principais culturas hospedeiras dessa espécie. Em 2020, a produção nacional de morango atingiu cerca de 219 mil toneladas, com um valor de produção de mais de 2 bilhões de reais (IBGE, 2021). Já a produção de uva no país ultrapassou 1,3 milhão de toneladas, com valor de produção de mais de 2,2 bilhões de reais (IBGE, 2021). Devido à sua rápida disseminação e ao dano econômico que pode causar, a *D. suzukii* é um importante alvo de pesquisa para o desenvolvimento de biopesticidas e estratégias de controle de pragas. Os prejuízos causados pela *D. suzukii* na fruticultura brasileira ainda não são tão expressivos quanto em outros países, mas a presença da praga no país tem preocupado os produtores e técnicos, que buscam formas de controlar sua disseminação e reduzir seus danos. Os danos causados pela mosca da fruta resultaram em cerca de 500 milhões de dólares nos EUA, enquanto na Itália foram registrados prejuízos de 500 mil euros em 2010 e 3 milhões de euros em 2011 (CINI; FONDAZIONE; MACH, 2012) .

O uso de inseticidas e métodos de controle de pragas, bem como a mão de obra necessária, são custosos(GOODHUE et al., 2011) . Dentre as estratégias de manejo, destacam-se o uso de armadilhas, controle biológico e químico, além de práticas

culturais como a eliminação de frutos hospedeiros no pomar. Devido à algumas limitações à resistência desenvolvida pela praga e preocupações com a saúde humana e o meio ambiente, têm-se buscado alternativas de controle que sejam mais eficientes e menos impactantes. Uma alternativa que vem ganhando destaque é o uso de óleos essenciais (OEs) de espécies vegetais com propriedades biopesticidas. Os OEs são substâncias voláteis e aromáticas que são produzidas pelas plantas como mecanismo de defesa contra pragas e patógenos. Eles têm se mostrado promissores no controle de diversos insetos-praga, incluindo a *D. suzukii* (GHASSEMI et al., 2019). Estudos têm apontado que os OEs podem atuar como inseticidas, repelentes, inibidores de oviposição e modificadores de comportamento da *D. suzukii*.

Alguns exemplos de OEs com potencial biopesticida contra a praga incluem o óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*), o óleo de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), o óleo de menta (*Mentha sp*.), entre outros (CASTAÑEDA et al., 2020; HARO-GONZÁLEZ et al., 2021). O óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) também foi relatado como tendo efeito inseticida contra *D. suzukii* (DAPENA et al., 2018). Já o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) tem sido relatado como tendo efeito repelente e inseticida contra *D. suzukii* (YAN et al., 2018).

Além disso, a identificação de compostos bioativos em produtos vegetais e o uso de metodologias *in silico* têm sido empregados para o desenvolvimento de novos biopesticidas contra *D. suzukii*. Por exemplo, o uso de técnicas de triagem em extratos de plantas tem sido utilizado para identificar compostos bioativos com atividade inseticida e repelente contra *D. suzukii* (WANG et al., 2019). Já o uso de modelagem molecular tem sido empregado para identificar alvos moleculares e auxiliar no planejamento de novos compostos bioativos com atividade contra a praga (REDDY et al., 2017).

É importante ressaltar que o uso de OEs como alternativa ao controle químico ainda está em fase experimental e mais pesquisas são necessárias para avaliar sua eficiência em diferentes condições de cultivo e para diferentes espécies de frutas. Além disso, é importante que o uso dessas substâncias seja realizado com cautela, considerando-se a toxicidade para o ambiente e para os organismos não-alvos (TAVAKOLI et al., 2019).

CAPÍTULO 1. ADVANCING RATIONAL PESTICIDE DEVELOPMENT AGAINST *DROSOPHILA SUZUKII*: BIOINFORMATICS TOOLS AND APPLICATIONS

Abstract

Drosophila suzukii (Matsumura, 1931) is a pervasive agricultural pest that damages various fruit hosts, including cherries, strawberries, raspberries, and grapes. The revolutionary potential of bioinformatics in agriculture emerges from its capacity to furnish extensive information concerning pests, fungi, chemical resistance, plant genetic enhancement, residue management, non-target species implications, and other critical aspects. This wealth of information empowers researchers to engage in projects and applied research across diverse agricultural domains grappling with these challenges. In this context, bioinformatics tools assume a pivotal role. The detrimental impact of pests on crops, resulting in substantial economic losses, has underscored the importance of in-silico methods. These methods enable examining interactions between potential pesticide compounds and molecular targets. This facilitates the prediction of binding affinities and affords opportunities for structural optimization to enhance activity and selectivity. This rational approach to pesticide development holds immense promise for expediting the discovery and optimization of novel pesticides while mitigating the need for resource-intensive experimental screening processes. As technology advances and data availability expands, the potential of in-silico studies to guide pesticide discovery and optimization is poised for further growth. Realizing this potential demands collaborative endeavors involving multidisciplinary experts to harness the full scope of bioinformatics and AI in advancing pesticide research. This expertise convergence ultimately underpins pest control strategies' innovation and efficacy. This review offers a contemporary overview of the prospects of employing bioinformatics tools for developing new pesticides that can be applied to control *D. suzukii*. It highlights existing alternatives that have been explored and rendered available. Moreover, it identifies gaps in knowledge, particularly regarding the untapped potential for research on *D. suzukii*.

Keywords: *Drosophila suzukii,* Bioinformatics, Rational Pesticides, Molecular Docking, Molecular Dynamics.

Introduction

The presence of *Drosophila suzukii* in the agricultural environment has become a significant concern for producers and specialists worldwide, mainly Brazil, known as a potent agricultural producer. Known as a pest, it has been causing a devastating impact on fruit crops, and substantial economic losses have aroused interest in developing methods for population control of this pest (ASPLEN et al., 2015; VIANA et al., 2023) .

The damage caused by *D. suzukii* is multiple, first with the fruit fly larvae, which use the fruit's interior to obtain nutrients, making the fruit unsuitable for human consumption or commercialization. Second, due to the opening of the fruits by the entrance of the larvae, they generate alternative insertions for secondary infections by fungi and bacteria, which cause deterioration of the fruits (TUNGADI et al., 2023) .

In this way, research in the development of methods to control *D. suzukii* is the main focus for controlling and managing this pest. Bioinformatics is a crucial area for rationally developing new pesticides for this type of pest. Its main objective is to understand the mechanisms of the mode of action that can lead to the biological control of *D. suzukii* (VAN LEEUWEN et al., 2020) .

The need for solutions is evident, with great opportunities for bioinformatics tools to develop more effective and targeted combat methods to minimize impacts on plantations, financial losses, and the environment (MALLA et. al, 2022).

1. *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931)

Drosophila suzukii (Matsumura, 1931) is a member of the Drosophilidae family and *Drosophila* genus. This species is recognized as a widespread agricultural pest, inflicting substantial damage to various host fruits, including cherries, strawberries, raspberries, and grapes, among other species (MAZZI et al., 2017). Despite its initial documentation by Matsumura in 1931 in Japan, the species' origin remains uncertain, and there is compelling evidence suggesting that it could be either native to Asia or introduced to diverse regions (MATSUMURA, 1931; HAUSER, 2011).

The temperate and subtropical climates offer favorable conditions for the survival and persistence of *Drosophila suzukii*, with temperatures below 30°C and high humidity, which promote its proliferation in regions with such climatic characteristics (ANDREAZZA et al., 2015). Brazil, with its temperatures ranging from 20°C to 28°C during certain periods, provides a suitable environment for the proliferation of fruit flies (NASCIMENTO et al., 2020). In addition, as a major producer of soft-skinned fruits like strawberries, blackberries, and grapes, Brazil's agricultural sector is highly susceptible to infestations by this species, as these fruits

serve as its main host crops. For instance, in 2020, this country produced approximately 219 thousand tons of strawberries, with a production value exceeding 2 billion Brazilian Reais (approximately $400,000,000). Additionally, grape production in the country surpassed 1.3 million tons, with a production value exceeding 2.2 billion brazilian reais (IBGE, 2021).

Given the swift spread and the potential economic damage that *D. suzukii* can cause, it has become a significant focus of research for the development of effective pesticides and pest control strategies. Although the extent of damage caused by this fly in Brazilian fruit production is not as severe as in some other countries, its presence in the country has raised concerns among producers and technicians. Consequently, efforts are being made to control its dissemination and mitigate its impact. Notably, the economic toll of *D. suzukii* in the USA amounted to approximately 500 million dollars, while in Italy, losses of 500 thousand euros were recorded in 2010 and 3 million euros in 2011(CINI; FONDAZIONE; MACH, 2012) .

The employment of insecticides and pest control techniques, along with the labor involved, entails substantial expenses (GOODHUE et al., 2011) . To address this challenge, various management strategies have been considered, including the implementation of traps, biological and chemical control methods, and cultural practices like the removal of host fruits from orchards. Nonetheless, there are certain limitations related to the development of resistance by the pest, as well as concerns regarding the potential impact on human health and the environment. Consequently, there is a growing emphasis on exploring alternative control approaches that are more effective and have reduced adverse effects on the ecosystem.

1.2.The Bioinformatics' role in pesticide development

Bioinformatics is an evolving field that holds a crucial position in scientific research, particularly in agriculture. It has become indispensable as the volume of devastating pest species affecting large-scale crops and plantations has increased. Historically, bioinformatics emerged as a powerful tool for analyzing vast biological datasets, enabling the discovery of novel approaches to combat and control populations of pests, fungi, and pathogens through the development of innovative pesticides, insecticides, fungicides, and herbicides (GIRALDO-CALDERÓN et al., 2022; LIMA et al., 2022; MEHER et al., 2017) .

The potential of bioinformatics in agriculture is revolutionary. By providing extensive information on pests, fungi, resistance to chemical products, plant genetic improvement, environmental management of residues, and the impacts on non-target species, among other aspects, it has empowered scientists to undertake projects and applied research in various agricultural sectors facing these challenges (AWASTHI, 2021; PATEL et al., 2014; RAVICHANDRA, 2018).

In this context, bioinformatics tools play a fundamental role. Pests can cause severe crop devastation and incur substantial economic losses. The current means of control mainly involve the application of synthetic insecticides with chemically complex structures, leaving high levels of toxic residues that pose serious risks to human health and non-target organisms. Additionally, the complexity of their structures contributes to environmental pollution, and improper use can lead to the development of resistance in pest populations, reducing insecticide efficacy and presenting new challenges (AWASTHI, 2021). Bioinformatics offers a promising alternative to address these issues by enabling the development of more targeted and environmentally friendly pest management strategies.

Indeed, the advanced capabilities of bioinformatics encompass high-capacity processing and robust indexing algorithms, along with the integration of machine learning techniques, which are pivotal for achieving success in modern biological discoveries. The qualification of the research team and continuous updates are essential to harness the full potential of these tools, enabling the planning, processing, analysis, and extraction of meaningful data from vast biological datasets (POLIANA FERNANDA GIACHETTO; ROBERTO HIROSHI HIGA, 2014) .

The utilization of bioinformatics tools facilitates the handling of large-scale biological data, including genomic, transcriptomic, proteomic, and metabolomic information. The development of sophisticated algorithms and machine learning models enables the identification of patterns, associations, and novel insights from these complex datasets, significantly advancing our understanding of biological processes and contributing to the discovery of potential pest targets and its inhibitor candidates, as well as facilitating to the development of new approaches for agricultural and environmental challenges.

Given the rapidly evolving nature of biological research and the constant generation of new data, staying up-to-date with the latest methodologies and tools is crucial for researchers in the field of bioinformatics. Regular training and continuous professional development ensure that scientists can effectively utilize cutting-edge technologies and methodologies to explore the vast realm of biological information, ultimately driving scientific progress and innovation.

1.2.2 Genomic and Proteomic relational databases and datasets

Databases containing biological information serve as crucial initial resources for constructing research projects focused on the development of pesticides for agricultural pests. To gather data on an agricultural pest, researchers can utilize genetic information available in public databases from various countries or refer to secondary databases (PRUITT; TATUSOVA; MAGLOTT, 2007) .

In the context of genomic databases, comprehensive genetic information on the pest *Drosophila suzukii* can be found in the world's largest public database, the National Center for Biotechnological Information (NCBI) (WHEELER et al., 2007)(. The NCBI contains primary

sequence data of nucleotides and proteins, providing valuable insights for research. Additionally, there are other databases with specific information on *D. suzukii*, such as SpottedWingFlyBase (http://spottedwingflybase.org/), UNIPROT (https://www.uniprot.org/taxonomy/32353), and the European Molecular Biology Laboratory database (RODRIGUEZ-TOMÉ et al., 1996) (http://www.ebi.ac.uk/embl/). These databases can be explored to identify potential molecular targets essential for the pest's life cycle and development. As this research aims to develop potential pesticides, it is crucial to investigate probable molecular targets with known pesticide action, both documented for the target pest and phylogenetically related organisms.

The primary mechanisms of action of insecticides and insect growth regulators primarily involve neuronal targets responsible for stimuli and behavior. Essential neuronal targets for pesticide action include GABA receptors (γ-aminobutyric acid), nicotinic receptors (nAChRs), acetylcholinesterase (AChE) enzyme, sodium channels, glutamate-gated chloride channels (GluCls), Transient Receptor Potential (TRP) channels, and octopamine and dopamine receptors (CASIDA, 2009; HIRATA, 2016; IRAC, 2024, BUCKINGHAM, et al., 2017). Building the three-dimensional structures of these targets for in-silico studies and analyzing their interactions with candidate pesticide molecules will be essential in the research process. This computational approach aids in understanding the binding interactions and potential efficacy of candidate pesticides, guiding the design and optimization of novel compounds for pest control.

1.2.3 Small molecules databases

In the pursuit of small molecules with potential for rational pesticide development, various strategies are employed, and one of them involves searching for chemical structures through public databases of molecules. Several well-known databases serve as valuable resources for this purpose, including:

1. PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/): A widely used database that houses experimentally resolved chemical structures. It offers easy accessibility and is free of charge. PubChem contains a vast number of registered substances, approximately 307,434,809 (AYERS, 2012).

2. CHEMSpider (http://www.chemspider.com/): Another public database offering experimentally determined chemical structures for diverse molecules.

3. NIST Chemistry WebBook (https://webbook.nist.gov/chemistry/): A resource provided by the National Institute of Standards and Technology (NIST), containing comprehensive chemical and physical property data for various compounds.

4. ZINC database (https://zinc.docking.org/): ZINC, an updated version of ZINC-22, is a substantial repository of molecular structures. It offers approximately 37 billion molecules in 2D format and about 4.5 billion in 3D format (TINGLE et al., 2023)(Fig. 1).

These databases are valuable assets for researchers engaged in pesticide development, as they provide a vast collection of known chemical structures that can serve as starting points for

rational drug design and virtual screening studies. The large number of available molecules in these databases enhances the chances of finding potential candidates with specific activity against target pests while considering factors like efficacy, safety, and environmental impact. The accessibility and cost-free nature of these resources further facilitate their widespread use in the scientific community (Fig. 1).

The abundance of known chemical structures presents a challenge in filtering potential pesticides from the vast structural and chemical diversity. To address this, researchers can create filters based on desired physical-chemical properties, such as LogP (partition coefficient), LogS (solubility), molecular mass, number of hydrogen donors or acceptors, and others. These filters aid in conducting virtual screenings of bioactive compounds and are essential for the rational planning of pesticide development research (LIMA et al., 2022).

In projects focused on pesticide development using *in-silico* methods, the initial step involves searching for the three-dimensional (3D) structure of a molecular target. This search can start from a primary sequence of known amino acid residues, or it can be based on the 3D structure of a phylogenetically related organism. *Drosophila melanogaster*, which belongs to the same group and family as the pest *D. suzukii*, is a well-studied organism with extensive genetic, biological, and chemical information available. Consequently, it has been widely explored in in-silico studies. On the other hand, *D. suzukii* has relatively few in-silico studies, creating opportunities for new and unpublished research focused on this target (CASTELLANO et al., 2001; RAMÍREZ-MORENO; LUBINUS; RIVEROS, 2022; SAHOO et al., 2021).

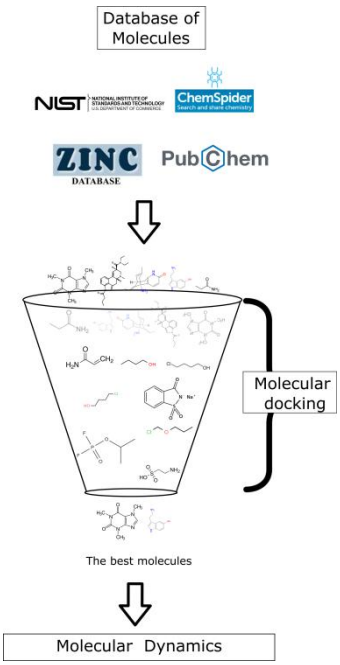

Fig 1 Utilization of Molecular Databases for the Rational Development of Pesticides through Bioinformatics Tools

In-silico methods allow researchers to study the interactions between potential pesticide compounds and the molecular targets of interest, predicting their binding affinities, and optimize the structure of the compounds for enhanced activity and selectivity. This rational approach to pesticide development holds the promise of accelerating the discovery and optimization of novel pesticides while minimizing the need for costly and time-consuming experimental screening processes.

The study conducted by RODRIGUES et al., 2021 exemplifies the application of in-silico methodologies, which involve computer-assisted predictions, to assess compounds with known insecticidal activity against two organisms, Aphis gossypii and Drosophila melanogaster. The researchers focused on analyzing the structure of diterpenes, specifically ent-kaurane, kaurene, and clerodane, to determine their potential bioinsecticidal activity. Additionally, they compared the stability of the interactions formed by these compounds with commercial insecticides. To carry out their *in-silico* strategy the primary sequence of the enzyme Acetylcholinesterase (AChE) from *Drosophila melanogaster* was obtained from GenBank. Additionally, the target was homology modeled using MODELLER 9.20 software to generate a three-dimensional structure of the AChE. The researchers assessed the stereochemical quality of the built structure using the PSVS web server (http://psvs-1_5-dev.nesg.org/) and PROCHECK. For molecular docking, they utilized two tools, Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0 and GOLD 5.6.2, which enabled them to investigate the potential interactions between the diterpenes and the AChE enzyme. Based on the results, the study concluded that the tested compounds showed promising activity against the AChE enzyme, particularly against *Drosophila melanogaster*. Furthermore, the diterpenes were found to have a high likelihood of activity and low toxicity against the studied species. This study exemplifies how bioinformatics and in-silico methodologies can serve as valuable tools in pesticide development research. By using computational approaches, researchers can efficiently assess the potential activity of compounds, predict their interactions with molecular targets, and prioritize promising candidates for further experimental validation. These methods can significantly expedite the identification of novel bioinsecticides while minimizing the need for laborious and costly experimental testing.

Indeed, several studies have demonstrated the use of computational strategies for the development of new potential pesticides against pests. The works conducted by (CHAUDHURI et al., 2020; LOW et al., 2010; LOZA-MEJÍA; SALAZAR; SÁNCHEZ-TEJEDA, 2018; SHUKLA et al., 2016) NCHEZ-TEJEDA, 2018; SHUKLA et al., 2016)are among those that have highlighted the value of computational approaches in pesticide development. In the specific case of *Drosophila suzukii*, the lack of published *in-silico* studies represents a significant opportunity for researchers, and applying bioinformatics methods for controlling this target, scientists can explore new potential rational pesticide candidates.

Considering the challenges posed by pests like *Drosophila suzukii* and the ever-increasing demand for effective and sustainable pest control strategies, *in-silico* methods offer a cost-effective and time-efficient means to screen and prioritize candidate compounds for further experimental testing. The computational predictions can narrow down the vast chemical space, guiding researchers toward the most promising molecules with the highest potential for activity against the target pest.

1.3. Rational pesticide development for controling *Drosophila suzukii*

The use of bioinformatics tools for carrying out rational planning and prospecting of potential molecules with pesticide action against *D. suzukii* is very welcome once these tools are capable of predicting the binding mode of potential ligands with a given molecular target of interest (AGNIHOTRY et al, 2022).

The first point to be addressed in the development of pesticides using *in-silico* approaches is the choice of a key-protein target. Choosing the more suitable target allows for determining the mechanism of action, as well as the desired biological interference on the pest metabolism, and additionally do comparisons with already known insecticides/pesticides and physical-chemical characteristics. The first tool to be used after choosing the molecular target is protein molecular modeling (LI; FU; ZHANG, 2019) .

1.3.1 PDB and Molecular Modeling of Proteins

In the field of bioinformatics, several tools are available to construct the three-dimensional (3D) structure of a protein from its primary sequence of amino acid residues, especially when no known structure is available in the Protein Data Bank (PDB) - a public database containing structural information of 3D biological structures, including proteins and nucleic acids. These structural data are determined using techniques such as X-ray crystallography, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, and other structural biology methods. The PDB's primary objective is to organize and provide a comprehensive source of information about the structures and functions of biomolecules, which are essential for research in fields like molecular biology, biochemistry, pharmacology, medicine, chemistry, and related areas (GOODSELL et al., 2020) . On the other hand, when a protein's 3D structure is not available in the PDB or other databases, computational methods can be employed to predict its structure. These methods generally fall into template-based modeling and ab initio modeling. (de novo) modeling.

1. Template-based modeling: In this approach, the 3D structure of the target protein is predicted by comparing its primary sequence to the sequences of proteins with known structures (templates) in the PDB or other databases. Homology modeling is a common template-based

method that relies on the assumption that proteins with similar sequences have similar structures and functions Fig.2.

2. *Ab initio* modeling: This approach involves predicting the protein's 3D structure based solely on its primary sequence without using information from known structures. Ab initio methods use physical principles and energy calculations to explore the protein's conformational space and determine the most stable 3D structure.

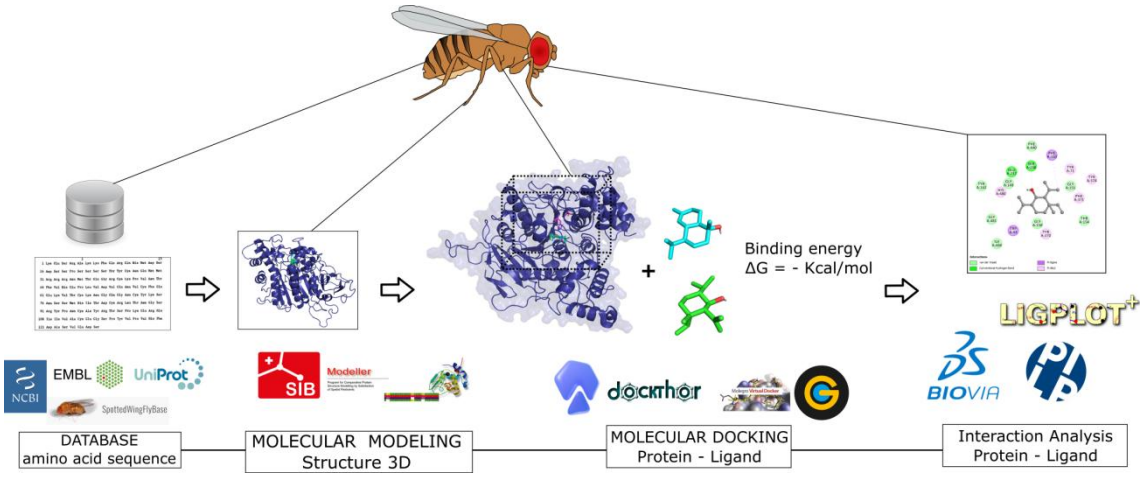

Fig 2. Schematic visualization of in silico pesticide development process and bioinformatics tools

Additionally, there are tools and software packages that facilitate the modeling process, such as MODELLER, SWISS-MODEL, Rosetta, and I-TASSER SCHWEDE et. al, 2003; DAS, BAKER, 2008; KIEFER et. al, 2009; YANG et al., 2015; BIENERT et. al, 2017) . These tools help researchers predict the 3D structure of proteins efficiently and enable further studies on protein function, interactions, and potential drug targeting. The availability of such computational tools and resources has revolutionized the field of structural biology and bioinformatics, allowing researchers to explore the molecular basis of biological processes and develop new insights for various scientific disciplines.

The most used homology-modeling tool are MODELLER (NARAYANAN ESWAR et al., 2008; WEBB; SALI, 2016) and SWISSMODEL(BIENERT et al., 2017; KIEFER et al., 2009; SCHWEDE et al., 2003 (https://swissmodel.expasy.org/). These programs are suitable for predicting the three-dimensional (3D) structure of a protein sequence using information from another homologous protein whose structure is already known and deposited in the PDB database. MODELLER uses the principle of position by geometric constraints, which in general terms build conserved regions first with the limit between the alpha Carbon distances (C α) and the dihedral angles of the backbone and then finds variable regions (called *loop*) considering also the side chains (WEBB; SALI, 2016). On the other hand, SWISS-MODEL uses the rigid body methodology, which establishes the rigid body assembly and is divided into basic central

regions such as loops and conserved side chains (Fig. 2). The quality of the generated model will depend on the quality of the crystallographic structure and the alignment between the mold and the constructed model (MUHAMMED; AKI-YALCIN, 2019).

Computational comparative modeling methods offer several advantages, particularly in terms of cost and time savings for scientists. These methods are valuable tools for predicting the 3D structure of proteins when experimental structures are not available or when conducting wet-lab experiments to determine the structure is time-consuming and costly. Advantages of in-silico comparative modeling methods include: cost-effectiveness, time efficiency, rational design of experiments, exploration of intermolecular interactions and hypothesis generation about the protein's structure and function. Overall, *in-silico* comparative modeling methods play a crucial role in modern structural biology and bioinformatics. They offer a cost-effective and efficient approach to explore the 3D structure and function of proteins, guiding experimental design and generating valuable insights for a wide range of scientific investigations.

The methods of analysis of the stereochemical quality of the built models can be performed using the tools PROCHECK (https://saves.mbi.ucla.edu/) - for RAMACHANDRAN plot (https://saves.mbi.ucla.edu/); SWISS-MODEL structure assessment - for QMEAN (*Qualitative Model Energy Analysis*) and GMQE (*Global Model Quality Estimate*) and MODELLER - for DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*).

1.3.2 Molecular Docking

Molecular Docking studies are used to analyze the types of intermolecular interactions between the ligands (the potential pesticide molecules) and the protein elucidated by experimental methods or molecular modeling calculations. Molecular docking consists of performing a simulation of a connection between a chemical structure and the protein target, in regions considered important for the biological response, usually named active site, allosteric site, among others (ONODERA; SATOU; HIROTA, 2007; SETHI et al., 2019; STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021; TAO et al., 2020) . In this case, the active site of a protein target is considered the region where essential amino acids are found that perform the biological function of the specific protein. The allosteric site is considered an alternative site for the active site, which consists of enhancing or preventing the biological action of the three-dimensional structure of the protein (CAMPBELL et al., 2003; HAN et al., 2017; SPYRAKIS; CAVASOTTO, 2015; WIJMA et al., 2015).

Studies performed by (SHUKLA et al., 2016) demonstrated the importance of using bioinformatics tools, fundamental to determine the residues of the catalytic site of an enzyme called Trehalase (DmTre) from *Drosophila melanogaster*. They also mentioned that the modeled structure presented the characteristics of a glycosidase superfamily, including signature motifs (sequence patern) and catalytic domain (substructure). Finally, molecular docking was

performed to understand the interactions with the substrate, evidencing the involvement of other residues also responsible for the catalytic action.

The most common tools utilized for performing Molecular Docking include AutoDock 4 (https://autodock.scripps.edu/download-autodock4/), AutoDock Vina (https://vina.scripps.edu/) (MORRIS et al., 2009) , DockThor (https://dockthor.lncc.br/v2/) (GUEDES; KREMPSER; DARDENNE, 2017), DockingServer (https://www.dockingserver.com/web),GOLD (https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/software/gold/) (NURISSO et al., 2012), Molegro (http://molexus.io/molegro-virtual-docker/) (GABRIELA BITENCOURT-FERREIRA AND WALTER FILGUEIRA DE AZEVEDO JR., 2019), and others. These tools primarily employ the rigid 3D structure of the protein and flexible conformation of the ligand to achieve optimal structural fitting. Some tools additionally support flexible molecular docking for both the protein and the ligand (PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017; SPYRAKIS; CAVASOTTO, 2015). Both methods facilitate investigations of intermolecular interactions and yield insights into the mechanism of action of biological targets (Fig.2).

Numerous studies have been conducted to investigate the mode of action of synthetic insecticides and to explore strategies for discovering novel molecules with pesticide potential against pests. There is a strong emphasis on identifying compounds that exhibit low levels of adverse reactions towards non-target organisms and humans, as well as minimal environmental pollution (KUZNETSOVA et al., 2019; WEYRICH et al., 2022).

For this, molecular docking calculations consider some evaluation parameters, such as binding affinity with an estimated ΔG in Kcal/mol, RMSD in Angstrom (Å), an estimated inhibition constant (Ki), and effective intermolecular interactions at the active site as well. The effectiveness of ligand binding with a protein receptor is determined by the types of intermolecular interactions involved. These interactions can range from strong to weak, with hydrogen bonding and ionic bonds being the strongest, while van der Waals bonds (induced dipole), hydrophobic interactions, and dipole-dipole interactions are considered weaker. The specific interactions formed between the ligand and the receptor are crucial in determining the binding affinity and potency of the ligand as a potential insecticide. Understanding these interactions is essential for developing effective pesticides with minimal adverse effects on non-target organisms and the environment (SHIRZADI et al., 2008) .

In the work by (RODRIGUES et al., 2021), they analyzed the interactions of compounds identified as potential insecticides and compared them to commercial insecticides. The results revealed that these potential insecticides displayed interactions that were either similar to or even superior to those of commercial insecticides. Such insights can guide the design and optimization of novel pesticides with improved efficacy and reduced ecological impact. Furthermore, other *in-silico* studies, one of them made by (NAKAO; BANBA; HIRASE, 2015), explored the binding modes of ivermectin and milbemectin as allosteric agonists of

Drosophila melanogaster GABA-RDL receptors, and demostrating how lactones and metadiamide interact with this receptor and the effects of mutations on these interactions. These investigations shed light on the molecular basis of insecticide action and resistance, providing valuable information for the rational design of insecticides with enhanced potency and target specificity.

Overall, these molecular docking studies are vital in advancing our understanding of pesticide-target interactions and guiding the development of safer and more effective pest control strategies. By employing computational approaches, researchers can explore a wide range of potential molecules and predict their interactions with biological targets, significantly accelerating the discovery and optimization of novel pesticides with superior performance and reduced ecological impact. In this way, molecular docking studies can help the scientist to reduce the costs and time of searching for potential pesticides/insecticides with the virtual screening method, fitting with protein targets of the pest under study and determining the most efficient position with the residues. of the active site. Furthermore, it is possible to use knowledge in chemistry, synthesis techniques and reaction mechanisms to propose possible structural modifications in the structures of ligands, to provide improvements in physicochemical properties, in biological activity, possible reductions in side effects, increase in stability and bonding mode, making it possible to obtain a new and improved chemical structure that allows patent filing and commercialization.

1.3.3 Molecular Dynamics

Molecular Dynamics (MD) is also a powerful tool to aid *in-silico data* in searches for potential insecticides/pesticides. DM is considered a computational technique used to simulate atomistic or molecular motion and their interactions in a system in a given time. This approach is currently used in several areas of science, such as computational chemistry, biochemistry, biophysics and biotechnology. Indeed, this technique provides data on the dynamics of complex moleculares systems (HUGGINS et al., 2019).

MD allows simulating the behavior of atoms and molecules based on the principles of Newton's laws (GREW; CHIU, 2012) . The method uses bound and unbound interaction algorithms and equations to calculate the forces, energies and motions of particles in a system. The initial positions and velocities of the particles allow MD to perform a series of calculations to predict their trajectories over time. Interactions are usually used as described using simplified force potentials, such as the Lennard -Jones potential for van der Waals interactions and Coulomb potentials for electrostatic interactions. In addition, it is possible to reproduce a very close environment to the real biological system that the enzyme/protein is in nature. In addition, it is possivle to simulate this system with water, ions, solvents, lipids, and create membranes and lipid bilayers as well (ARNAREZ et al., 2015).

Some MD tools are freely available to the public as open-source packages. For this with can cite GROMACS (VAN DER SPOEL et al., 2005) as one of the most used, because of its easy usability and available tutorials and forums, as well as its capacity of performing fast and efficient Molecular Dynamics simulations. Furthermore, this package is easy to install and ultra-processing tools such as GPUs (Graphics Processing Unit) to power simulation calculations. Other tools are also used to perform computer-aided simulations of biological systems such as the AMBER package (CASE; THOMAS, 2021), CHARMM (BROOKS et al., 1983) and NAMD (NOELSON et. al, 1996) (Fig.3).

The most common analyses of the protein-ligand system after DM calculations include target and ligand RMSD (Root- Mean Square Deviation), target amino acid RMSF (Root- Mean Square Fluctuation) on its APO and HOLO forms, hydrogen bond (H-Bond) number formed between protein target and proposed ligand, Radius of Gyration (RG) for evaluating the influence of the proposed ligand over the protein folding, Potential (PE) and Binding Energies (Gbind.). Furthermore, other evaluations can be carried out, such as the simulation time the ligand remained interacting in the active site, which interactions were fundamental to stabilize the enzyme/protein, if there was interference from other atoms or molecules in the system (water, ions, membrane). For the development of pesticides/insecticides, the use of the MD tools can be used for evaluating the stability of protein-ligand complexes which obtained promising results in molecular docking experiments (Fig.3).

Studies by (JOHNSON et al., 2021) observed in MD simulations the *Drosophila melanogaster* AChE (DmAChE)-Cymbodiacetal complex, the effects of the ligand and protein flexibility, where they were analyzed and found that the (+)-Cymbodiacetal ligand remained in the binding pocket as previously performed in the studies of molecular docking. It was observed some interactions between important amino acid residues in the docking study and that the ligand (+)-Cymbodiacetal may be responsible for the inhibitory activity against AChE of *D. melanogaster*.

In the studies of LYISON et. al (2020) the authors identified pesticide candidates against *Carausius morosus* (stick insect), using *in-silico studies*, in which they used MD techniques to assess the stability of pesticide candidates in the binding pocket of CamAKHR in its active and inactive states. They also demonstrate that the residues in the MD simulations corroborated to demonstrate that other residues also aggregated in the interaction. Briefly, thirteen amino acids have been shown to contribute primarily to ligand binding in CamAKHR. In this simulation, they used the ligand and complex RMSD graphs, alpha carbon RMSF (Cα) and the Interaction Diagram for the evaluation of MD.

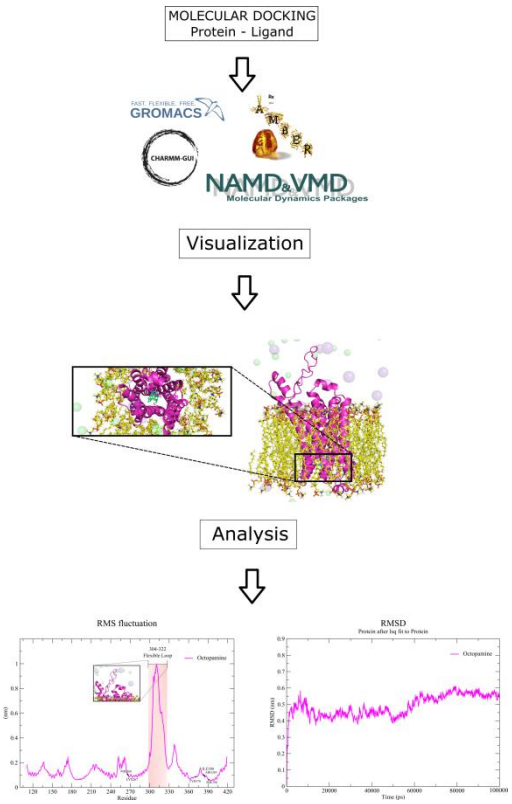

Fig 3. Schematic Representation of Pesticide Development Using Molecular Dynamics Tools

In conclusion, molecular docking (DM) is a valuable tool in the quest for discovering new candidates for pesticides and insecticides. However, its effective utilization requires a combination of computational expertise and a solid understanding of biochemistry, biology, and chemistry. By using MD simulations, researchers can explore and elucidate the interactions between potential pesticides and their target proteins, providing valuable insights into their mechanism of action. Despite its potential, there is currently a gap in the application of MD simulations to agricultural pest targets. The lack of published articles and studies in this area represents an opportunity for future research and development of new agricultural pesticides. By harnessing the power of computational methods and integrating them with other disciplines, researchers can expedite the discovery of novel pesticides with enhanced efficacy and reduced environmental impact.

To fully realize the potential of MD in pesticide development, interdisciplinary collaboration and continued advancements in computational techniques are essential. As researchers delve deeper into the complexities of pesticide-target interactions and optimize MD methodologies, we can expect significant strides in the development of more sustainable and effective pest control solutions for the agricultural industry.

1.4. Future Perspectives

During the course of this review article, we observed a limited number of *in-silico* studies focused on controlling *Drosophila suzukii*, particularly concerning important molecular targets for pesticide and insecticide development. Nevertheless, we acknowledge the value of bioinformatics tools in aiding the development and rational planning of pesticide candidates, thanks to technological advancements and the increasing reliability of computational techniques, supported by more robust computers. The emergence of Artificial Intelligence (AI) has also proven beneficial in current bioinformatics studies, enhancing research capabilities and providing novel insights. As we delve into this exciting era of bioinformatics and AI, it becomes evident that there is an extensive field yet to be explored in pesticide development. The combination of advanced computational methods, bioinformatics tools, and AI algorithms presents tremendous potential for accelerating the discovery of novel pesticides with improved specificity, reduced toxicity, and minimal environmental impact. Then, the future holds immense opportunities for scientists to contribute to groundbreaking discoveries in the field of pesticide development. By leveraging bioinformatics and AI, researchers can tackle the challenges posed by agricultural pests more efficiently, offering sustainable and environmentally friendly solutions to enhance global food security and agricultural productivity.

As technologies continue to evolve and data availability increases, the potential for *in-silico* studies to guide pesticide discovery and optimization will only grow. Collaborative efforts between experts in various disciplines will be crucial in harnessing the full potential of bioinformatics and AI for the advancement of pesticide research, ultimately leading to the development of innovative and effective pest control strategies.

1.5. References

AGNIHOTRY, Shikha et al. protein structure prediction . In: Bioinformatics . **Academic Press,** p. 177-188. 2022..

ARNAREZ, C. et al. Dry martini, a coarse-grained force field for lipid membrane simulations with implicit solvent. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, n. 1, p. 260–275, 13 jan. 2015.

ASPLEN, M. K. et al. Invasion biology of spotted wing Drosophila (*Drosophila suzukii*): a global perspective and future priorities. **Journal of Pest Science**Springer Verlag, , 20 set. 2015.

AWASTHI, L. P. **Biopesticides in Organic Farming**. 1st Edition ed. 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, Boca Raton, FL 33487-2742: Environment & Agriculture, 2021.

BIENERT, S. et al. The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D313–D319, 1 jan. 2017.

BROOKS, B. R. et al. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations*. **Journal of computational chemistry**, v. 4, n. 2, p. 187–217, 1983.

BUCKINGHAM, Steven et al. Mechanisms of action, resistance and toxicity of insecticides targeting GABA receptors . **Current medicinal chemistry** , v. 24, no. 27, p. 2935-2945, 2017.

CAMPBELL, S. J. et al. Ligand binding: functional site location, similarity and docking. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 13, n. 3, p. 389–395, 1 jun. 2003.

CASE ROSS C WALKER UC SAN DIEGO, D. A.; THOMAS CHEATHAM, G. E. **Amber 2021 Reference Manual Principal contributors to the current codes**. 2021. Disponível em: <https://ambermd.org/contributors.html>.

CASTAÑEDA-BABARRO, Arkaitz et al. Physical activity change during COVID-19 confinement. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 18, p. 6878, 2020.

CASTELLANO, S. et al. **In silico identification of novel selenoproteins in the Drosophila melanogaster genomeEMBO reports**. 2001.

CHAUDHURI, A. et al. Exposure to Spectracide® causes behavioral deficits in Drosophila melanogaster: Insights from locomotor analysis and molecular modeling. **Chemosphere**, v. 248, p. 126037, 1 jun. 2020.

CINI, A.; FONDAZIONE, C. I.; MACH -, E. 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.

DAS, R.; BAKER, D. **Macromolecular modeling with Rosetta**. **Annual Review of Biochemistry**, 2008.

E. CASIDA, J. Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 609–619, 16 mar. 2009.

GABRIELA BITENCOURT-FERREIRA AND WALTER FILGUEIRA DE AZEVEDO JR. Docking Screens for Drug Discovery. Em: **Docking Screens for Drug Discovery**. Porto Alegre: Walter Filgueira de Azevedo Jr., 2019. p. 149–167.

GHASSEMI, Mona. Accelerated insulation aging due to fast, repetitive voltages: A review identifying challenges and future research needs. **IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation**, v. 26, n. 5, p. 1558-1568, 2019.

GIRALDO-CALDERÓN, G. I. et al. VectorBase.org updates: bioinformatic resources for invertebrate vectors of human pathogens and related organisms. **Current Opinion in Insect Science**, v. 50, 1 abr. 2022.

GOODHUE, R. E. et al. Spotted wing drosophila infestation of California strawberries and raspberries: Economic analysis of potential revenue losses and control costs. **Pest Management Science**, v. 67, n. 11, p. 1396–1402, nov. 2011.

GOODSELL, D. S. et al. **RCSB Protein Data Bank: Enabling biomedical research and drug discovery**. **Protein Science**Blackwell Publishing Ltd, , 1 jan. 2020.

GREW, K. N.; CHIU, W. K. S. A review of modeling and simulation techniques across the length scales for the solid oxide fuel cell. **Journal of Power Sources**, v. 199, p. 1–13, 1 fev. 2012.

GUEDES, I. A.; KREMPSER, E.; DARDENNE, L. E. **DockThor 2.0: a Free Web Server for Protein-Ligand Virtual Screening**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.lncc.br/sinapad>.

HAN, S.-W. et al. Active Site Engineering of ω-Transaminase Guided by Docking Orientation Analysis and Virtual Activity Screening. **ACS Catalysis**, v. 7, n. 6, p. 3752–3762, 27 abr. 2017.

HARO-GONZÁLEZ, José Nabor et al. Clove essential oil (Syzygium aromaticum L. Myrtaceae): Extraction, chemical composition, food applications, and essential bioactivity for human health. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6387, 2021.

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, n. 11, p. 1352–1357, nov. 2011.

HIRATA, K. Studies on the mode of action of neurotoxic insecticides. **Journal of Pesticide Science**, v. 41, n. 3, p. 87–94, 2016.

HUGGINS, D. J. et al. **Biomolecular simulations: From dynamics and mechanisms to computational assays of biological activity**. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**Blackwell Publishing Inc., , 1 maio 2019.

IRAC. **MODE OF ACTION CLASSIFICATION SCHEME**. [s.l: s.n.].

JOHNSON, T. O. et al. Biochemical evaluation and molecular docking assessment of Cymbopogon citratus as a natural source of acetylcholine esterase (AChE)- targeting insecticides. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 28, p. 101175, 1 dez. 2021.

KIEFER, F. et al. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, 2009.

KUZNETSOVA, M. et al. Reduction of Environmental Pollution with Pesticides: in silico Evaluation of the Efficiency of the Agrodozor Online Resource. **Entomology and Applied Science Letters**, v. 6, n. 3, p. 55–61, 1 ago. 2019.

LI, J.; FU, A.; ZHANG, L. **An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking**. **Interdisciplinary Sciences –**

Computational Life Sciences Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 jun. 2019.

LIMA, L. R. et al. Identification of Potential New Aedes aegypti Juvenile Hormone Inhibitors from N-Acyl Piperidine Derivatives: A Bioinformatics Approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, 1 set. 2022.

LOW, W. Y. et al. Recognition and Detoxification of the Insecticide DDT by Drosophila melanogaster Glutathione S-Transferase D1. **Journal of Molecular Biology**, v. 399, n. 3, p. 358–366, 11 jun. 2010.

LOZA-MEJÍA, M. A.; SALAZAR, J. R.; SÁNCHEZ-TEJEDA, J. F. In silico studies on compounds derived from calceolaria: Phenylethanoid glycosides as potential multitarget inhibitors for the development of pesticides. **Biomolecules**, v. 8, n. 4, 1 dez. 2018.

MAZZI, D. et al. **Economic impact of the introduction and establishment of *Drosophila suzukii* on sweet cherry production in Switzerland**. **Insects**MDPI AG, , 1 mar. 2017.

MEHER, P. K. et al. DIRProt: A computational approach for discriminating insecticide resistant proteins from non-resistant proteins. **BMC Bioinformatics**, v. 18, n. 1, 24 mar. 2017.

MORRIS, G. M. et al. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MUHAMMED, M. T.; AKI-YALCIN, E. **Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives**. **Chemical Biology and Drug Design**Blackwell Publishing Ltd, , 1 jan. 2019.

NAKAO, T.; BANBA, S.; HIRASE, K. Comparison between the modes of action of novel meta-diamide and macrocyclic lactone insecticides on the RDL GABA receptor. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 120, p. 101–108, 1 maio 2015.

NARAYANAN ESWAR et al. Protein Structure Modeling with MODELLER. Em: **Protein Structure Modeling**. [s.l: s.n.]. p. 145–159.

NARAYANAN ESWAR, D. E. B. W. M.-Y. S. AND A. S. Protein Structure Modeling with MODELLER. Em: **Structural Proteomics**. 2008 . v. 426p. 145–159.

NELSON, Mark T. et al. NAMD: a parallel, object-oriented molecular dynamics program. **The International Journal of Supercomputer Applications and High Performance Computing**, v. 10, n. 4, p. 251-268, 1996.

NURISSO, A. et al. Molecular Docking Using the Molecular Lipophilicity Potential as Hydrophobic Descriptor: Impact on GOLD Docking Performance. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 5, p. 1319–1327, 21 abr. 2012.

ONODERA, K.; SATOU, K.; HIROTA, H. Evaluations of Molecular Docking Programs for Virtual Screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 4, p. 1609–1618, 28 jun. 2007.

PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. **Software for molecular docking: a review**. **Biophysical Reviews**Springer Verlag, , 1 abr. 2017.

PATEL, N. et al. **Review Article Agronanotechnology for Plant Fungal Disease Management: A ReviewInt.J.Curr.Microbiol.App.Sci**. 2014. Disponível em: <http://www.ijcmas.com>.

POLIANA FERNANDA GIACHETTO; ROBERTO HIROSHI HIGA. Bioinformática aplicada à agricultura. Em: **Tecnologias da Informação e Comunicação e suas relações com a agricultura**. [s.l: s.n.]. p. 67–82.

PRUITT, K. D.; TATUSOVA, T.; MAGLOTT, D. R. NCBI reference sequences (RefSeq): A curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL. 1, jan. 2007.

RAMÍREZ-MORENO, D. M.; LUBINUS, K. F.; RIVEROS, A. J. The flavonoid kaempferol protects the fruit fly Drosophila melanogaster against the motor impairment produced by exposure to the insecticide fipronil. **Journal of Experimental Biology**, v. 225, n. 20, 1 out. 2022.

RAVICHANDRA, N. G. **Agrochemicals in Planb Disease Management**. 1st Edition ed. Scientific Publisher, 2018.

RODRIGUES, G. C. S. et al. In silico studies of lamiaceae diterpenes with bioinsecticide potential against aphis gossypii and drosophila melanogaster. **Molecules**, v. 26, n. 3, 1 fev. 2021.

RODRIGUEZ-TOMÉ, P. et al. **The European Bioinformatics Institute (EBI) databasesNucleic Acids Research**. 1996.

SAHOO, S. et al. In silico investigation of methyl parathion and diazinon with different metabolic protein in drosophila melanogaster. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 14, n. 7, p. 3794–3798, 1 jul. 2021.

SCHWEDE, T. et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3381–3385, 1 jul. 2003.

SETHI, A. et al. Molecular Docking in Modern Drug Discovery: Principles and Recent Applications. **Drug discovery and development-new advances**, v. 2, p. 1–21, 2019.

SHIRZADI, A. et al. Application of Saturation Transfer Double Difference NMR to Elucidate the Mechanistic Interactions of Pesticides with Humic Acid. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 4, p. 1084–1090, 12 jan. 2008.

SHUKLA, E. et al. Molecular cloning and in silico studies of physiologically significant trehalase from Drosophila melanogaster. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 282–292, 1 nov. 2016.

SPYRAKIS, F.; CAVASOTTO, C. N. **Open challenges in structure-based virtual screening: Receptor modeling, target flexibility consideration and active site water molecules description**. **Archives of Biochemistry and Biophysics**Academic Press Inc., , 22 ago. 2015.

STANZIONE, F.; GIANGRECO, I.; COLE, J. C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 273–343, 1 jan. 2021.

TAO, X. et al. **Recent developments in molecular docking technology applied in food science: a review**. **International Journal of Food Science and Technology**Blackwell Publishing Ltd, , 1 jan. 2020.

TINGLE, B. I. et al. ZINC-22─A Free Multi-Billion-Scale Database of Tangible Compounds for Ligand Discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 63, n. 4, p. 1166–1176, 27 fev. 2023.

TUNGADI, T. D. et al. **Factors influencing oviposition behaviour of the invasive pest, *Drosophila suzukii*, derived from interactions with other Drosophila species: potential applications for control**. **Pest Management Science**John Wiley and Sons Ltd, , 1 nov. 2023.

VAN DER SPOEL, D. et al. **GROMACS: Fast, flexible, and free**. **Journal of Computational Chemistry**, dez. 2005.

VAN LEEUWEN, T. et al. Significance and interpretation of molecular diagnostics for insecticide resistance management of agricultural pests. **Current Opinion in Insect Science**, v. 39, p. 69–76, 1 jun. 2020.

VIANA, J. P. C. et al. Establishment and Expansion Scenario of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Central Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 52, n. 6, p. 975–985, 1 dez. 2023.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 2016, p. 5.6.1-5.6.37, 2016.

WEYRICH, A. et al. Review of the state of science and evaluation of currently available in silico prediction models for reproductive and developmental toxicity: A case study on pesticides. **Birth Defects Research**, v. 114, n. 14, p. 812–842, 15 ago. 2022.

WHEELER, D. L. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL. 1, jan. 2007.

WIJMA, H. J. et al. Enantioselective enzymes by computational design and in silico screening. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 12, p. 3726–3730, 16 mar. 2015.

YANG, J. et al. **The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction**. **Nature Methods**Nature Publishing Group, , 1 jan. 2014.

CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *in vivo* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DA ESPÉCIE *Varronia curassavica* Jacq. EM *Drosophila suzukii* E ORGANISMOS NÃO-ALVOS

Resumo

A *Drosophila suzukii* (Matsumura) é uma mosca pertencente à família Drosophilidae da ordem Diptera, primeiro descrita por Matsumura em 1931. Conhecida mundialmente com nomes populares: Mosca de vinagre de cereja, Drosophila-da-asa-manchada, mosca-da-cereja, entre outros. É considerada uma praga de frutos globalmente comerciáveis, majoritariamente de casca fina, acarretando danos significativos nas frutas maduras e levando a perda do fruto, provocando graves prejuízos aos agricultores. Sendo necessário buscar alternativas sustentáveis capazes de controlar o crescimento populacional dessa praga e que não afete os organismos não-alvo. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar a composição química do OEVC e avaliar o potencial biopesticida do óleo frente a espécie praga *D. suzukii* e avaliar os efeitos subletais da concentração (CL_{95}) nas espécies não-alvo *A. mellifera* e *P. heleri*. Além disso, também testamos o efeito do OEVC na predação das espécies *C. maculata* e *E. connexa*. Considerando as evidências dos resultados obtidos neste estudo, indicam que, os constituintes majoritários para OEVC foram o shyobunol (21,79-23,61%) e α-Cadinol (6,87-7,29%). Além disso, o OEVC demonstrou ser um promissor biopesticida contra *D. suzukii* com uma concentração CL_{95}= 19,9 nL /cm^2 ou 1,95 µL/ mL, ao mesmo tempo essa concentração exibe um perfil de biossegurança em relação a organismos não-alvos em abelhas (*A. mellifera* e *P. helleri*) e joaninhas (*C. maculata* e *E. connexa*), importantes agentes de equilíbrio ecossistêmico. Além do mais, os mesmos também não interferiram significativamente na atividade locomotora e predação das joaninhas, qualificando ainda mais esse OE como seletivo para o organismo alvo *D. suzukii*.

Palavras-chaves: Drosophila; Óleo essencial; *V. curassavica* Jacq., Organismos não-alvo, Toxicidade; Potencial biopesticida.

CHAPTER 2. Assessment of the *in vivo* toxicity of essential oils from the species *Varronia curassavica* Jacq. in *Drosophila suzukii* and non-target organisms

Summary

Drosophila suzukii (Matsumura) is a fly belonging to the Drosophilidae family of the order Diptera, first described by Matsumura in 1931. They are known worldwide by popular names: Cherry vinegar fly, Spotted-wing Drosophila, and cherry fly, among others.It is considered a pest of globally marketable fruits, mostly with thin skin, causing significant damage to ripe fruits and leading to the loss of the fruit, causing severe losses to farmers. It is necessary to seek sustainable alternatives capable of controlling the population growth of this pest and that do not affect non-target organisms. Therefore, the objective of this study was to evaluate the biopesticide potential of essential oils (EOs) from the species *V. curassavica* Jacq. against the pest species *D. suzukii* and evaluate the sublethal effects of the concentration (LC_{95}) on the non-target species *A. mellifera* and P. heleri. Furthermore, we also tested the effect of OE on predation on the species C. maculata and E. connexa. Considering the evidence from the results obtained in this study, they indicate that the EO of the species *V. curassavica* demonstrated to be a promising biorational biopesticide against *D. suzukii* with a concentration CL95= 19.9 nL /cm2 or 1.95 µL/ mL, at the same time this concentration exhibits a biosafety profile concerning non-target organisms in bees (*A. mellifera* and P. helleri) and ladybugs (C. maculata and E. connexa), important agents of ecosystem balance. Furthermore, they did not significantly interfere with ladybugs' locomotor activity and predation, further qualifying this EO as selective for the target organism *D. suzukii*.

Keywords: Drosophila; Essential oil; *V. curassavica* Jacq., Non-target organisms, Toxicity; Biopesticide potential.

2.1 Introdução

A *Drosophila suzukii* (Matsumura) é uma mosca pertencente à família Drosophilidae (Berry et al., 2012) da ordem Diptera, primeiro descrita por Matsumura em 1931 (HAUSER, 2011; MATSUMURA, 1931). Conhecida mundialmente com nomes populares: Mosca de vinagre de cereja, Drosophila-da-asa-manchada, mosca-da-cereja, entre outros (EMBRAPA, 2018). É considerada uma praga de frutos globalmente comerciáveis, majoritariamente de casca fina, como: ameixas, amoras, caqui, cereja, damasco, framboesa, morango, pêssego (ANDREZZA et al., 2016; BERNARDI et al., 2016; DIEPENBROCK e BURRACK, 2017, MAZZI et al., 2017; EMBRAPA, 2018; TROMBIN DE SOUZA et al., 2020; KNAPP et al., 2021), causando danos economicamente relevantes ao comércio agrícola (SANTOS ET AL., 2014). Portanto, seu poder de invasão cresce exponencialmente a cada ano.

O potencial geográfico dessa espécie é mundial, com ocorrências registradas na América do Norte, Europa (protocolos indicam que há ocorrência em todos os países deste continente) (CINI ET AL., 2012), América do Sul, algumas partes da África e principalmente no continente Asiático (WALSH ET AL., 2011; DEPRÁ ET AL, 2014). As regiões mais afetadas pela praga no Brasil são: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais (BENITO ET AL., 2016), por conta dessas regiões apresentarem clima altamente favorável a *D. suzukii*. Existe também uma alta concentração na produção de frutas de casca fina, como uvas, maçã, cereja, etc. Desta forma, métodos de controle são necessários para frear o crescimento populacional dessa praga e diminuir a infestação nas culturas agrícolas.

Atualmente, o principal método de controle utilizado é o controle químico, ou seja, o uso de pesticidas nas lavouras. Nesse contexto, moléculas sintéticas muito comuns pertencem as classes das (os): espinosinas, piretróides, organofosforados, neonicotinoides e diamidas (EMBRAPA, 2018; SCHLESENER ET AL., 2014). Entretanto, a eficácia destes compostos contra *D. suzukii* tem suscitado diversas preocupações, uma vez que estes produtos têm sido relatados como causadores de danos à saúde humana e ao meio ambiente (e.g., polinizadores, insetos predadores, parasitoides, além da contaminação de solos e corpos d'água), prejudicando assim o ciclo natural de perpetuação de organismos pertencentes a fauna e flora dos biomas brasileiros (GUSSONI, RIBEIRO, 2018). Outra problemática relevante é a presença de resíduos nos frutos comercializados, ultrapassando o limite permitido pela ANVISA (Soares et al., 2012). Desta forma, novos métodos de controle sustentáveis e seletivos

são fundamentais para combater esse tipo de praga. Uma alternativa sustentável é a utilização de óleos essências derivados de plantas. O Brasil é rico em biodiversidade, o que sugere um vasto campo a ser explorado e identificado para utilização dessas espécies no combate a pragas agrícolas.

O semiárido ocupa cerca de 13% de todo território brasileiro, com estados localizados em sua maioria no Nordeste como: Rio Grande do Norte, Maranhão, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Piauí, uma pequena região de Minas Gerais e principalmente a Bahia (com o maior território) (ALVES, 2007).

A Caatinga é caracterizada por apresentar um alto nível de temperatura (com média de 35°C), irregularidades e baixo índice de chuvas (BEZERRA ET AL., 2004). Existe um descaso em relação aos estudos de conservação deste bioma, o que tem contribuído significativamente para a devastação da fauna e flora da Caatinga.. These methods generally fall into template-based modeling and ab initio modeling. (BARBOSA ET AL., 2008). Assim, plantas da caatinga são consideradas promissora, principalmente pelo amplo conteúdo químico bioativo, úteis em controle de insetos pragas e vetores (DA SILVA CARVALHO et al., 2023).

A espécie vegetal *Varronia curassavica* Jaqc. pertencente à família Boraginaceae, nativa da América Central e do Sul. É encontrada em diversos habitats, como florestas, restingas, manguezais, cerrados e semiárido, possuindo uma grande importância na área econômica e medicinal devido aos seus constituintes químicos e propriedades biológicas (HOELTGEBAUM, et al., 2015; MENDES, et al., 2015). Atualmente, são conhecidas cerca de 47 espécies do gênero *Varronia*, distribuídas principalmente na América Central e do Sul. No Brasil, a *V. curassavica* é uma das espécies mais encontradas, com distribuição em praticamente todo o país. Essa espécie é conhecida popularmente como "erva-baleeira", sendo aplicada para diversas atividades como anti-inflamatório, cicatrizante, diurético, antitérmico e pesticida (VIEIRA, et al., 2013; ANDRADE et al., 2021) devido a sua variedade química.

A diversidade dos constituintes químicos dos óleos essenciais de *V. curassavica* são realidade, principalmente no Brasil com diferentes tipos de localizações, regiões e clima. Dentre os principais constituientes, temos monoterpenos e sesquiterpenos. Para os monoterpenos temos o 1,8-Cineol, seguido do α -Pineno (TONIAL et al., 2020) e α-Felandreno. Já os sesquiterpenos mais encontrados são o Shyobunol (NIZIO, et al., 2018), α-Cadinol (BRANDÃO et al., 2017) e β-Cariofileno (TONIAL et al., 2020). Esses compostos têm mostrado diversas atividades biológicas, como antimicrobiana,

antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, inseticida e pesticida. Alguns estudos têm sido realizados com o óleo essencial de *V. curassavica*, assim como o de Souza et al. (2017), o óleo essencial dessa espécie foi testado contra o mosquito *Aedes aegypti* e mostrou atividade larvicida e repelente. Em outro estudo, realizado por Oliveira et al. (2018), o óleo essencial foi testado contra a espécie de inseto-praga *Spodoptera frugiperda*, com resultados promissores como potencial inseticida.

Portanto, o objetivo deste estudo foi quantificar e testar os óleos essências (OEs) da espécie *V. curassavica* Jacq. frente a espécie praga *D. suzukii* e avaliar os efeitos de seletividade da concentração letal (CL_{95}) nas espécies não-alvo *A. mellifera* e *P. heleri*. Além disso, também testamos o efeito do OE na predação das espécies *C. maculata* e *E. connexa*.

2.2 Métodos e materiais

2.2.1 Coleta do material vegetal para extração do Óleo Essencial (OEs)

A coleta da espécie *Varronia curassavica* Jacq. foi obtida na região rural da cidade de Jequié- Bahia, popularmente conhecida como Brejo Novo nas seguintes coordenadas geográficas W 13º56'40.9"S 40º06'33.8"W. A região de origem é considerada Mata de Cipó, pertencente ao bioma da Caatinga.

A coleta foi realizada em duas épocas distintas, outubro de 2021 e setembro de 2022. Na primeira época não foi bem-sucedida devido à falta de flor e fruto, enquanto que na segunda coleta foi obtido êxito, na coleta da espécie, que apresentava aroma característico e além da presença de flor e fruto. Utilizamos um fator de seleção baseado na presença de aroma das espécies de interesse, de modo a maximizar a probabilidade de obtenção do óleo essencial (SILVA et al., 2020).

Foi realizada a exsicatas da planta e encaminhadas as amostras para o Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - (HUESB-JQ) coordenado pela professora Dra. Guadalupe Edilma Licona de Macedo (Curadora) com o código de identificação 15126.

2.2.2 Extração dos Óleos Essenciais (OEs)

No protocolo utilizado para extração dos OEs, foi usada as folhas das espécies coletadas, *Varronia curassavica* Jacq., onde foram trituradas em um liquidificador industrial e pesadas conforme apresenta os resultados na **Tabela 1** e submetidas a hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger, num balão de fundo redondo contido de aproximadamente 500 mL de água, por uma duração de 2-3 horas. Foi utilizado sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para secagem do material (CAMPOS, et al., 2014). amostra foi coletada e armazenada e mantida em baixa temperatura (-2ºC), até análise química. Todo o protocolo de extração e armazenamento foram realizados no Laboratório de Óleos Essenciais (LOE-UESB) – Campus Jequié-BA, coordenado pela Professora Dra. Rosane Aguiar Santos.

2.2.3 Caracterização do óleo essencial

O óleo essencial das folhas da espécie *Varronia curassavica* Jacq. (OEVC) foi analisado usando um cromatógrafo a gás GC–MS QP2010 (Shimadzu) equipado com

um espectrômetro de massas e um cromatógrafo a gás GC-2014 (Shimadzu) equipado com um detector de ionização de chama (FID). As condições da cromatografia gasosa (GC) foram as seguintes: temperatura do injetor a 260 °C; temperatura do detector de ionização de chama (FID) a 290 °C; hélio como gás de arraste; taxa de fluxo de 1 ml/min e injeção dividida com razão dividida 1:40.

A temperatura do forno foi inicialmente de 60 °C e então aumentada para 290 °C a uma taxa de 3 °C/min. Um microlitro da amostra, dissolvido em diclorometano (1:100 mg/µl), foi injetado em uma coluna RTX-5 (0,25 mm ID, 30 m de comprimento, 0,25 µm e espessura do filme). A ionização eletrônica por espectrometria de massa (MS) foi de 70 eV e a taxa de varredura foi de 1 varredura/s. O índice aritmético (AI) foi calculado interpolando os tempos de retenção de uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos (C7-C40) analisados nas mesmas condições. As substâncias foram identificadas comparando seus índices de retenção e espectros de massa com os relatados na literatura. O padrão de fragmentação MS de compostos também foi comparado com bibliotecas de espectro de massa NIST. A abundância relativa dos constituintes químicos foi determinada por cromatografia gasosa de ionização de chama (GC-FID) sob as mesmas condições de GC-MS. O método de normalização da área dos picos FID obteve a análise e as porcentagens desses compostos. A quantificação de cada constituinte está contida na tabela 2 (ADAMS, 2017).

2.2.4 Bioensaios toxicológicos com adultos de *Drosophila suzukii*

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório Brasileiro de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados (BraIN&Phy) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob a supervisão do Professor Eugênio E. Oliveira. Para o experimento, foram utilizadas moscas adultas de *Drosophila suzukii* criadas em condições controladas de temperatura (i.e., 24 ± 2 ºC), umidade (60 %) e fotoperíodo (12:12) de acordo com os métodos descritos por Andreazza et al. (2018).

O bioensaio toxicológico foi realizado de acordo com o método adaptado do IRAC (2017) e utilizando um pavio dentário da Cremer S.A., Blumenau, Brasil (FONSECA et al., 2021) adicionado com óleo essencial em um frasco de vidro de 200 mL. A dose discriminatória de 2000 ppm (ou 2000 µL L^{-1}) foi usada nos primeiros bioensaios de susceptibilidade, que apresentou mortalidade superior a 80% nesta concentração, foram realizados testes em diferentes concentrações do OEVC, a fim de aferir as curvas de concentração-mortalidade.

Para determinar a seletividade do OEVC a organismos não-alvos, foram utilizadas as espécies de abelhas polinizadoras *Apis mellifera* e *Partamona helleri*, e duas joaninhas predadoras: *Coleomegilla maculata* e *Eriopis connexa*. O óleo essencial foi aplicado de duas formas: para as abelhas em uma solução açucarada com a CL_{95}, sendo a mortalidade e o consumo de xarope avaliados ao longo de 24 horas (i.e., 0 h, 1 h, 3 h, 5 h, 24 h). Já para as joaninhas, a exposição se deu por contato em papel filtro no fundo de placas de Petri, sendo seis joaninhas adultas maduras sexualmente (i.e., > 10 dias de idade) colocadas em cada placa de Petri por um período de exposição de 24 horas. Cinco réplicas foram utilizadas para cada concentração de óleos essenciais. O OE foi considerado seletivo se a mortalidade causada em cada grupo de organismos não-alvos não foi superior a 10% dos organismos testados (MARTINS et al., 2020). Além disso, teste dos efeitos subletais pelo bioensaio predatório devem ser realizados com a mesma concentração do OE, para efeitos de comparação para seletividade.

2.2.5 Ensaio de seletividade de *Apis mellifera* e *Partamona helleri*

O bioensaio de seletividade de abelhas *A. mellifera* e *P. helleri* foi realizado seguindo a metodologia proposta por Britto et al. (2021). Para o teste, foram utilizadas duas diferentes concentrações de óleos essenciais, o óleo essencial *Varronia curassavica* Jacq. a 0,195%, diluídos em uma solução de sacarose (50% [m/v]), Tween20 a 0,04875% e DMSO a 0,0975%. O xarope limpo foi utilizado como controle e continha a mesma concentração de Tween20 e DMSO descrita para a óleo essencial.

Para o experimento, cada recipiente plástico foi utilizado como uma unidade experimental, contendo dez abelhas e cinco repetições por tratamento (n = 50). Para cobrir os efeitos da variação entre colônias, foram coletadas abelhas de cinco colônias de forma aleatória. As abelhas foram mantidas em jejum por uma hora antes de acessar o alimento, visando equalizar o consumo durante o experimento. Após cinco horas de exposição, todas as abelhas receberam uma dieta não contaminada (solução de sacarose). A mortalidade e o consumo de dieta foram registrados após uma, três, cinco, e vinte e quatro horas de exposição desde o início do bioensaio (BRITTO et al., 2021).

2.2.6 Bioensaios predatórios

Os bioensaios predatórios realizados nesse estudo envolveram a coleta de pulgões sem asas da espécie *Rhopalosiphum padi* em plantas de milho *Zea mays L.* livres de

aplicação de inseticidas. Os indivíduos coletados foram utilizados para estabelecer uma colônia mantida em plantas de cevada *Hordeum vulgare L.* em condições de semicampo, dentro de túneis de estufa feitos sob medida (1 m de largura × 4 m de comprimento × 1 m de altura). Com o objetivo de manter um suprimento constante de hospedeiros para a população de pulgões, novas sementes de cevada foram periodicamente semeadas a cada 30 dias. Isso permitiu o fornecimento de alimento para a colônia estabelecida e a manutenção das condições necessárias para a realização dos bioensaios predatórios.

Para avaliar a capacidade de predar adultos de *Rhopalosiphum padi*, metade das joaninhas (n = 15) que sobreviveram às exposições ao óleo essencial, foram utilizadas como predadores. Cada predador recebeu 20 adultos sem asas da espécie correspondente, e o número de pulgões comidos foi registrado em diferentes momentos após a liberação da presa. As avaliações foram realizadas utilizando o número de pulgões consumidos em diferentes intervalos de tempo (2ª, 4ª, 6ª, 8ª e 24ª horas após a liberação da presa). A densidade de pulgões foi reestabelecida após cada avaliação.

2.2.8 Análises de dados e estatística

Os resultados obtidos nos experimentos que avaliaram a concentração-letalidade para a mosca *Drosophila suzukii* foram analisados por meio do método estatístico denominado análise Probit (Finney, 1971) utilizando o software SAS (SAS Institute, 2008). Para avaliar os efeitos letais e subletais do óleo essencial de *Varronia curassavica* Jacq., em organismos não alvo, como sobrevivência, consumo de alimento em *Apis mellifera e Partamona helleri*, bem como analisar seu efeito letal e no comportamento predatório de *Coleomegilla maculata* e *Eriopis connexa*, foram realizadas análises comparativas com grupos controle utilizando testes t pareados (SigmaPlot) e ANOVA de medidas repetidas (SAS). Para garantir a validade dos resultados, a normalidade e homogeneidade da variância dos dados foram verificadas por meio do procedimento UNIVARIATE (SAS Institute, 2008), sem a necessidade de transformação dos dados.

Para avaliar o número de pulgões consumidos por joaninhas ao longo do tempo, levando em consideração a exposição prévia ao óleo essencial, foi utilizado o método de análise de variância de medidas repetidas (ANOVA) (SAS Institute, 2008). A fim de evitar problemas de repetições temporais, os números de pulgões consumidos em cada intervalo de tempo foram usados como medidas repetidas dentro da amostra (Ende,

1993; Paine, 1996). Para assegurar a confiabilidade dos resultados, foi realizado o processo de verificação de normalidade e homogeneidade da variância dos dados por meio do método UNIVARIATE (SAS Institute, 2008), sem a necessidade de efetuar qualquer transformação dos dados.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Óleo essencial e quantificação dos constituintes

A constituição genética das plantas exerce uma influência significativa sobre a biossíntese de metabólitos específicos, incluindo os óleos essenciais. Diferentes variedades de espécies vegetais medicinais podem apresentar diferenças notáveis não apenas na concentração total de óleo essencial, mas também em sua composição química (MOGHADDAM, MEHDIZADEH, 2017).

Neste estudo, foi avaliado o óleo essencial da espécie *Varronia curassavica* Jaqc., utilizando técnicas de análise por CG-EM e CG-FID. O óleo essencial apresentou um rendimento de aproximadamente 0,42%, um valor significativo, em linha com outros estudos, como o de Tonial et al. (2020), que reportou um rendimento de 0,418%.O rendimento de óleo essencial foi calculado utilizando a equação (1), sendo que as massas das folhas da espécie e do óleo essencial são exibidas na tabela 1.

$$(1)\quad R\% = \frac{MO_{(g)}}{MV_{(g)}} x\,100$$

Tabela 1. Rendimento médio de óleos essencial das folhas frescas da espécie *Varronia curassavica Jaqc.*

Espécie Vegetal	Massa vegetal (Mv)	Massa do OE (Mo)	Rendimento (%)
V. curassavica Jaqc.	208,361 g	0,87270 g	0,418 (1)

(1) equação utilizada para calcular o rendimento de OEs.

Os resultados da análise da composição química do OEVC demonstrou os constituintes majoritários como Shyobunol (21,79-23,61%) e α-Cadinol (6,87-7,29%), todos os constituintes estão descritos na tabela 2. Foram identificados 19 compostos, correspondendo a 66,63-70,4% do perfil do óleo essencial. O óleo essencial de *V.*

curassavica Jaqc. apresentou composição química predominantemente de sesquiterpenos (correspondendo a 100% dos constituintes identificados). De Oiveira et al., (2019) demonstrou o composto majoritário (*E*)-cariofileno (6,14-22,30%) de uma espécie de *V. curassavica* Jaqc. coletada no estado do Sergipe, demonstrando uma diferença no composto majoritário.

Além disso, quando há variações de região, estação do ano, temperatura, radiação solar, altitude, vento, nutrientes minerais, entre outros fatores, alteram o conteúdo de óleo essencial, apresentando diferentes composições química, como relatada em diferentes estudos (MARQUES et al., 2019; TONIAL et al., 2020; ZOTTI-SPEROTTO et al.,2020).

Tabela 2. Caracterização química do óleo essencial de (PL2) por CG-EM e CG-FID

	TR A1	**TR A2**	**AIexp**	**AI**	**Substâncias**	**A1 %**	**A2 %**
1	24.339	24.342	1389	1389	Elemeno	1.46673	1.3892
2	25.091	25.090	1397	1409	α-Gurjuneno	0.70295	0.65922
3	25.589	25.587	1409	1417	β-Cariofileno	6.06377	5.82039
4	26.226	26.228	1425	1437	α-Guaieno	0.67172	0.64349
5	27.043	27.043	1446	1452	α-Humuleno	1.88086	1.80635
6	27.249	27.249	1451	1464	9-epi-(E)- Cariofileno	2.86703	2.73747
7	27.844	27.841	1466	1478	γ-Muuroleno	0.62038	0.6018
8	28.090	28.087	1472	1480	Germacreno D	0.74905	0.70728
9	28.687	28.684	1487	1500	Biciclogermacreno	6.00393	5.74853
10	28.809	28.810	1490	1500	α-Muuroleno	0.49551	0.47553
11	29.377	29.376	1505	1513	γ-Cadineno	2.02071	1.93933
12	29.620	29.618	1511	-	-	8.61286	7.89541
13	29.823	29.822	1516	-	-	3.21571	2.87747
14	30.760	30.760	1541	1548	Elemol	3.0104	2.8289
15	31.863	31.858	1570	-	-	8.81242	11.7463
16	32.207	32.201	1579	-	-	0.87133	0.83544
17	32.556	32.552	1588	1600	Guaiol	3.01092	2.84077
18	32.949	32.948	1598	1602	Ledol	3.57261	3.42283
19	33.976	33.977	1627	1630	γ-Eudesmol	0.23285	0.2057
20	34.418	34.416	1639	1640	epi-α-Muurolol	5.63052	5.38934
21	34.845	34.843	1651	1652	α-Cadinol	7.29245	6.87202
22	36.355	36.337	1692	1688	**Shyobunol**	23.61038	21.78865
23	38.919	38.920	1766	1792	β-Eudesmol acetato	0.74354	0.75454
24	40.381	40.386	1806			7.84135	9.40851
				TOTAL IDENTIFICADO		70.41346	66.63134

TR A1: Tempo de retenção da amostra 1

TR A2: Tempo de retenção da amostra 2

A1: Amostra 1

A2: Amostra 2

AI: Índice Aritmético calculado

AI_{exp}: Índice Aritmético experimental

2.3.2 Bioensaios toxicicológicos

Primeiro, para determinar o potencial dos óleos essencial para o controle de *D. suzukii* avaliou a toxicidade por contato. O OEVC foi eficaz no controle das moscas, como demonstrado na Figura 1. Apresentou uma concentração letal (CL_{95} = 19,9 (17,2 – 24,0) nL /cm^2).

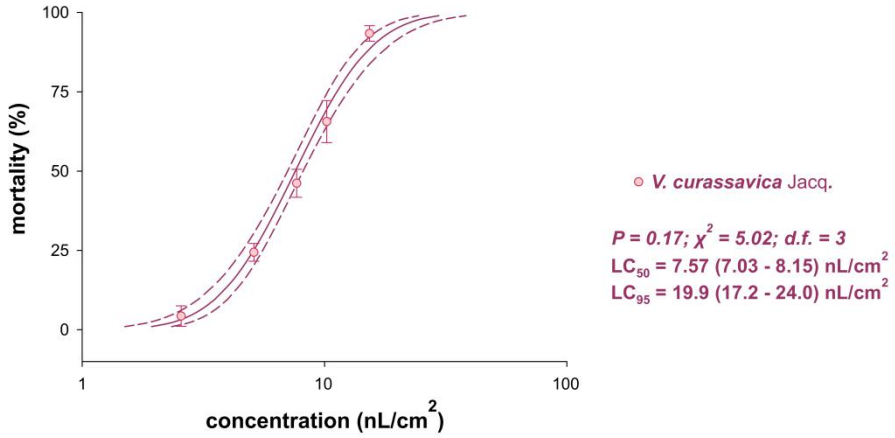

Fig 1. Curva concentração-resposta para *Drosophila suzukii* para a espécie *V. curassavica* Jacq.

Uma vez que determinamos as concentrações letais para a mosca-das-asas-manchadas, selecionamos a CL_{95} para serem utilizadas nos testes com as espécies de joaninhas, *C. maculata e E. connexa*. O OEVC na concentração de 19,9 nL /cm^2 ou 1,95 µL/ mL, o adultos recém-nascido (ou seja, aproximadamente 10 dias atrás) mostrou 100% de sobrevivência dentro das 24 horas. Em seguida, na investigação dos possíveis efeitos subletais dos compostos sobre a habilidade predatória de *C. maculata e E. connexa*, não foi observado nenhum efeito prejudicial (**Figuras 2 e 3**).

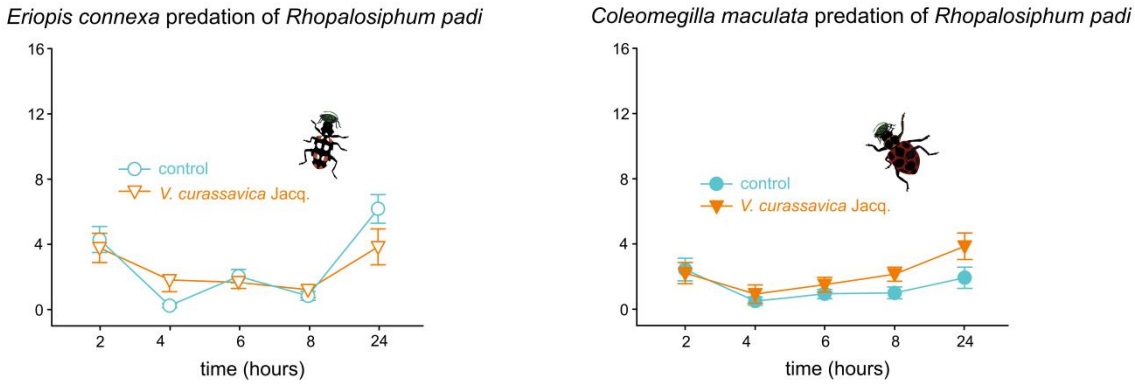

Fig 2. Números de pulgões predados durante um período de 24 h.

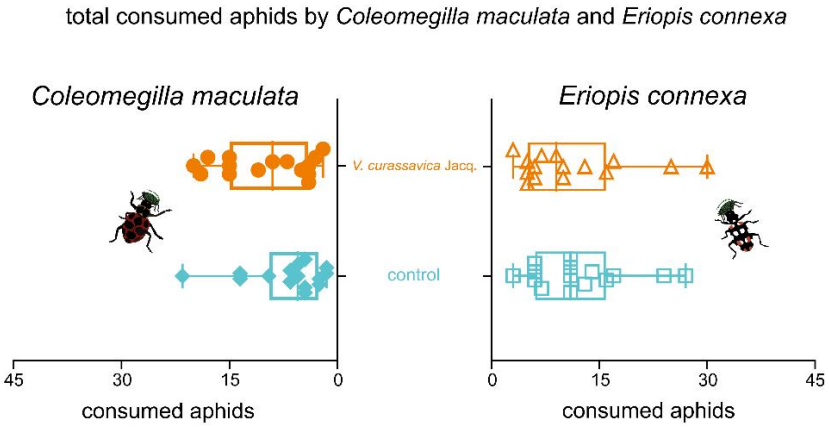

Fig 3. Total de Consumo das espécies de *C. maculata* e *E. connexa*.

Ao comparar a espécie *V. curassavica* com as joaninhas exposta e não exposta, somente o tempo predatórias (P < 0,0001) e a interação entre a espécie e o tempo (P = 0,037) tiveram influência nas habilidades predatórias., **Tabela 3**, confirmando a biossegurança do óleo essencial dessa espécie.

Tabela 3. Análise de variância com medidas repetidas ao longo do tempo durante 24 horas usando *V. curassavica* Jaqc. joaninhas expostas ao óleo essencial, *Coleomegilla maculata* e *Eriopis connexa*

Fontes de variação	*df*	*F*	*P*
Entre as amostras			
Óleo essencial (OE)	1	0.60	0.442
Espécies (E)	1	4.15	0.047*
OE x E	1	2.03	0.160
Erro	52	-	-
	df_{den}/df_{num}	*Wilks' lambda*	*F*	*P*
Dentro das amostras				
Tempo (T)	49/4	0.520	11.3	<0.0001*
T x OE	49/4	0.919	1.09	0.373
T x E	49/4	0.816	2.77	0.037*
T x OE x E	49/4	0.846	2.23	0.080

* Significância de $P < 0.05$.

Adicionalmente, para os bioensaios envolvendo a abelha *A. mellifera*, não apresentou diferença significativa (P= 0.0974) nos valores da mortalidade (**Fig. 4**). No bioensaio utilizando as abelhas sem ferrão *P. helleri*, não houve diferença significativa (P = 0,638) na mortalidade entre o controle (2,0 ± 2,0%) e *V. curassavica* (6,0 ± 4,0 %).

Durante a exposição das abelhas, nós também avaliamos as mudanças no consumo de xarope. Desta análise, somente o tempo ($P < 0.0001$), Tempo x Espécie (<0.0001) e Tempo x Espécie x OE ($P < 0.0151$) foram detectados (Tabela 4).

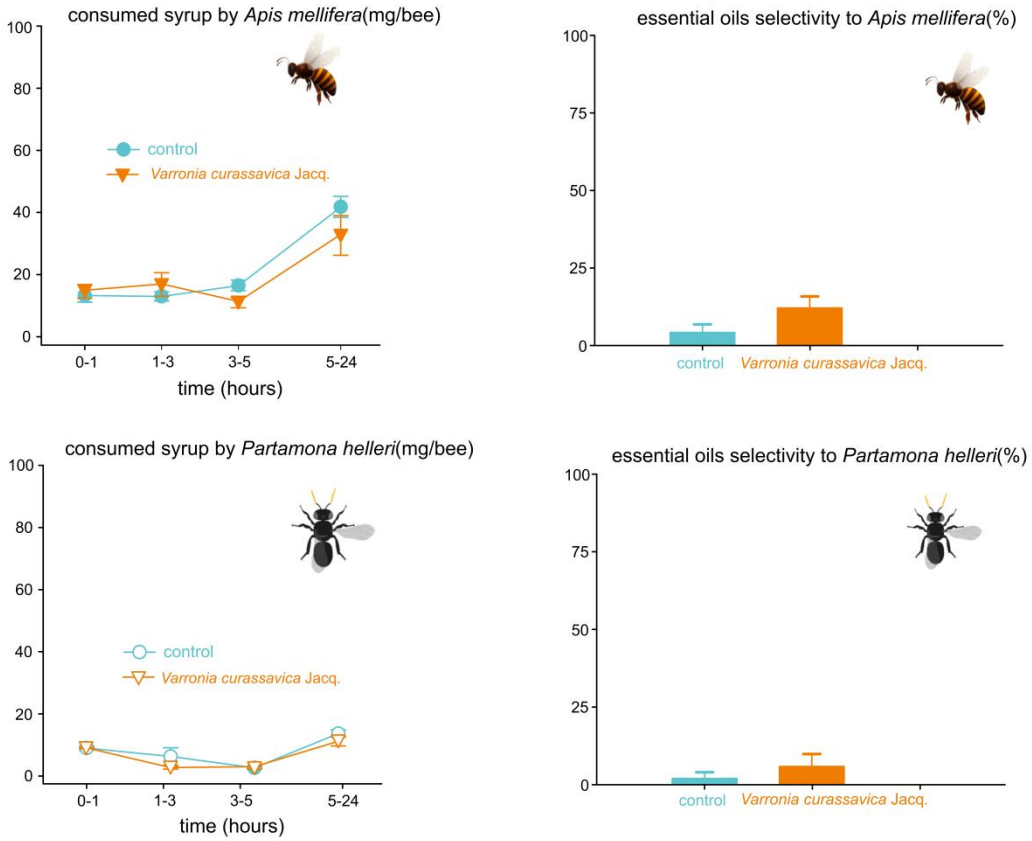

Fig 4. Consumo da dieta e seletividade do OE durante um período de 24 h.

Tabela 4. Análise de variância com medidas repetidas ao longo do tempo durante 24 horas, incluindo 5 horas de exposição ao xarope tratado com óleo essencial de *Varronia curassavica* Jacq., com abelhas neotropicais *Apis mellifera e Partamona* helleri.

Fontes de variação	*df*	*F*	*P*	
Entre amostras				
Óleo essencial (OE)	1	3.10	0.0974	
Espécies (E)	1	129.00	<0.0001*	
OE x E	1	0.22	0.6450	
Erro	16	-	-	
	df_{den}/df_{num}	*Wilks' lambda*	*F*	*P*
Dentro das amostras				
Tempo (T)	14/3	0.076	56.95	<0.0001*
T x OE	14/3	0.605	3.05	0.0638
T x E	14/3	0.218	16.78	<0.0001*
T x OE x E	14/3	0.486	4.94	0.0151*

* Significância de $P < 0,05$.

Sabe-se que inseticidas, pesticidas, entre outros compostos sintéticos vem causando danos à saúde humana e efeitos ao meio ambiente como dificuldade de degradação, poluição de solos, rios e lagos, além da atividade indesejada de afetar todo o ecossistema ao redor (organismos não-alvo). Dito isto, a utilização de produtos naturais como óleos essenciais vem ganhando força no combate e controle de pragas urbanas (OLADIPUPO et al., 2019) e agrícolas (ZIMMERMANN et al., 2021; EBADOLLAHI et al., 2020; PANG et al., 2020).

Nossos estudos revelaram que o OEVC demonstrou potencial no controle da praga *D. suzukii,* apresentando uma concentração letal de 95% (CL_{95}) de 19,9 nL/cm^2, e que nessa mesma concentração, não houve efeitos letais e subletais detectados nos organismos não-alvo, como *A. mellifera e P. helleri,* nem na atividade predatória e sobrevivência de *C. maculata e E. connexa.* Nossos resultados sugerem que os principais componentes identificados Shyobunol (21,79-23,61%) e α-Cadinol (6,87-7,29%), são provavelmente os responsáveis pela atividade inseticida contra *D. suzukii,* sendo necessário realizar um estudo *in silico*, para analisar as interações moleculares com alvos biológicos importantes para manutenção e fisiologia desses insetos. Entretanto, também não descartamos a ideia de sinergia dos demais constituintes do OE de *V. curassavica*, podendo ser importantes para a atividade pesticida.

O shyobunol foi encontrado em estudos anteriores realizados com a espécie *V. curassavica* (NIZZIO et al., 2018; DE CASTRO et al., 2020; GUZMÁN et al., 2022), considerados também o composto majoritário, demonstrando uma característica química dessa espécie. Guzmán et al., (2022) também encontrou o shyobunol como constituinte majoritário no OE de *Lepechinia mutica,* que apresentou atividade acaricidas contra *Rhipicephalus microplus*, indicando que esse composto pode ter ação contra insetos-pragas. Todavia, não foi encontrado nenhum outro estudo a respeito desses mesmos composto com ação contra *D. suzukii.* Para o OE da espécie *V. curassavica* já foi relatado atividade antimicrobiana (DA SILVA et al., 2020), acaricidas (ANDRADE et al., 2021; DE CASTRO et al., 2019), repelência e atividade locomotora comprometida (DE OLIVEIRA et al., 2019), antifúngica (DE CASTRO et al.,2020), entre outros. Este estudo é considerado pioneiro em busca de biopesticida à base de OE de *V. curassavica* Jaqc. contra *D. suzukii.*

Nos nossos bioensaios com as abelhas *A. mellifera* utilizamos a maior concentração CL_{95}, responsável por matar 95% da população de *D. suzukii*, e não foi

apresentado nenhum efeito subletal nesta espécie. Isso é de extrema importância pois, a *A. mellifera* é considerada uma polinizadora de diversas espécies vegetais frutíferas (RAMALHO et al., 1990; IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2003; YANG et al., 2017), principalmente de culturas de morango, local onde culturas de *D. suzukii* estão presentes. Manter a sobrevivência dessa abelha garante a proliferação das espécies vegetais importantes para manter a fertilidade das plantas, a diversidade genética e a sustentabilidade do ambiente natural. Além disso, utilizamos a abelha sem ferrão neotropical *P. helleri*, principalmente por sua sensibilidade à inseticidas sintéticos (TOMÉ et al., 2015; TOMÉ et al., 2017). Nestas mesmas condições, testamos os efeitos subletais e predação dos inimigos naturais de insetos, *C. maculata* e *E. connexa*, não demonstrando nenhuma mortalidade e efeitos na atividade predatória dos mesmos. Os resultados encontrados é comparado com os estudos de Toledo et al., (2024) que também não houve mortalidade nessas espécies com uma CL_{95}= 2,2 µL/ mL, do óleo essencial de *Ocotea indecora* onde apresentamos uma CL_{95}= 1,9 µL/ mL. Entretanto, estudos sobre os constituintes majoritários isolados e seus efeitos ainda é necessário para compreender suas características seletivas e ações subletais. Além disso, faz-se necessário avaliar condições controladas de campo para observar outros efeitos e comportamento do óleo essencial em condições reais.

3.4 Conclusão

As evidências obtidas neste estudo indicam que o OE da espécie *V. curassavica* Jacq. demonstraram ser um promissor pesticida biorracional contra *D. suzukii*, ao mesmo tempo em que exibem um perfil de biossegurança em relação a organismos não-alvos, como abelhas e joaninhas, importantes agentes de equilíbrio ecossistêmico. Além disso, os mesmos também não interferiram significativamente na atividade locomotora e predação das joaninhas, qualificando ainda mais esse OE como seletivo para o organismo alvo *D. suzukii*. A utilização desse OE pode, portanto, ser considerada uma abordagem viável e sustentável para o controle de pragas em ambientes agrícolas, contribuindo para a preservação dos polinizadores e predadores, bem como para a manutenção do equilíbrio ecológico. Entretanto, como não sabemos qual composto ou qual via metabólica foi responsável na resposta positiva ou negativa para atividade inseticida, devemos investigar quais mecanismos de ação esses óleos essenciais estão agindo e quais possíveis explicações determinam as diferenças entre as espécies.

3.5 Referências

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 8, p. 695-798, 1997.

ANDRADE, Fernanda Pereira et al. Toxicity of *Varronia curassavica* Jacq. essential oil to two arthropod pests and their natural enemy. **Neotropical Entomology**, v. 50, n. 5, p. 835-845, 2021.

ANDREAZZA, F. et al. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): an invasive pest of temperate fruits. **Florida Entomologist**, v. 99, n. 1, p. 1-7, 2016.

ANDREAZZA, F. et al. Susceptibility of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) to insecticides in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 4, p. 1828-1835, 2018.

ANDREAZZA, Felipe et al. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) arrives at Minas Gerais State, a main strawberry production region in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 99, n. 4, p. 796-798, 2016.

BERNARDI, D. et al. Susceptibility and interactions of *Drosophila suzukii* and Zaprionus indianus (Diptera: Drosophilidae) in damaging strawberry. **Neotropical Entomology**, v. 46, p. 1-7, 2017.

BRITTO, F. B. et al. Seletividade de abelhas sociais e africanizadas a óleos essenciais de plantas medicinais. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 2021.

BUENO, V. H. P. et al. Toxicidade de óleos essenciais a Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) e seletividade a organismos não alvos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 11, p. 1069-1077, 2017.

CAMPOS, A. C. T. et al. Atividade repelente e inseticida do óleo essencial de carqueja doce sobre o caruncho do feijão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 8, p. 861-865, 2014.

DA SILVA CARVALHO, Karine; DA CRUZ, Rômulo Carlos Dantas; DE SOUZA, Ivone Antônia. Plant species from Brazilian Caatinga: a control alternative for Aedes aegypti. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, p. 102051, 2023.

DA SILVA, Rafael Salomão et al. Synergistic effect of Cordia curassavica Jacq. essential oils association against the phytopathogen X anthomonas campestris pv. campestris. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 4376-4389, 2020.

DE CARVALHO CASTRO, Karina Neoob et al. Acaricidal activity of cashew nut shell liquid associated with essential oils from Cordia verbenacea and Psidium guajava on Rhipicephalus microplus. **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, n. 4, p. 297-304, 2019.

DE CASTRO NIZIO, Daniela Aparecida et al. A comparative study of the antifungal activity of essential oils of *Varronia curassavica* jacq. obtained by different distillation methods. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 6, 2020.

DE OLIVEIRA, Bruna MS et al. Essential oils from *Varronia curassavica* (Cordiaceae) accessions and their compounds (E)-caryophyllene and α-humulene as an alternative to control Dorymyrmex thoracius (Formicidae: Dolichoderinae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 6602-6612, 2019.

DIEPENBROCK, L. M.; BURRACK, H. J. Variation of within-crop microhabitat use by *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in blackberry. **Journal of Applied Entomology**, v. 141, n. 1-2, p. 1-7, 2017.

EBADOLLAHI, Asgar; ZIAEE, Masumeh; PALLA, Franco. Essential oils extracted from different species of the Lamiaceae plant family as prospective bioagents against several detrimental pests. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1556, 2020.

ENDE, A. R. Pseudo-replication revisited. **Ecological Applications**, v. 3, n. 3, p. 545-547, 1993.

FINNEY, D. J. Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. **Cambridge University Press**, 1971.

FONSECA, G. M. et al. Eucalyptus spp. oil toxicity and fumigation effects on Sitophilus zeamais (Coleoptera: Curculionidae) and Oryzaephilus surinamensis (Coleoptera: Silvanidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 3, p. e20190456, 2021.

GUZMÁN, Lucía et al. Acaricidal Efficacy of Plants from Ecuador, Ambrosia peruviana (Asteraceae) and Lepechinia mutica (Lamiaceae) against Larvae and

Engorged Adult Females of the Common Cattle Tick, Rhipicephalus microplus. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 1, p. 23, 2022.

IMPERATRIZ-FONSECA, Vera Lúcia et al. Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices. Proceedings of the Workshop on São Paulo Declaration on Pollinators plus 5 Forum, São Paulo, Brazil, 27-31 October 2003. In: Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices. Proceedings of the Workshop on São Paulo Declaration on Pollinators plus 5 Forum, São Paulo, Brazil, 27-31 October 2003. Holos, Editora, 2006.

IRAC - Insecticide Resistance Action Committee. IRAC MoA Classification: Insecticides and acaricides. 2017. Disponível em: https://irac-online.org/modes-of-action/insecticides-and-acaricides/. Acesso em: 20 fev. 2023.

KNAPP, Ladina; MAZZI, Dominique; FINGER, Robert. The economic impact of *Drosophila suzukii*: perceived costs and revenue losses of Swiss cherry, plum and grape growers. **Pest management science**, v. 77, n. 2, p. 978-1000, 2021.

MARQUES, A. P. S. et al. Chemical composition of essential oil from *Varronia curassavica* Jacq. accessions in different seasons of the year. **Industrial crops and products**, v. 140, p. 111656, 2019.

MARTINS, G. F. et al. Toxicidade seletiva do óleo essencial de *Varronia curassavica* Jacq. a organismos não-alvos. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 38, e021904336, 2020.

MAZZI, Dominique et al. Economic impact of the introduction and establishment of *Drosophila suzukii* on sweet cherry production in Switzerland. **Insects**, v. 8, n. 1, p. 18, 2017.

MOGHADDAM, Mohammad; MEHDIZADEH, Leila. Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. In: Soft chemistry and food fermentation. **Academic Press**, 2017. p. 379-419.

NIZIO, DA de C. et al. Distillation methods affect the chemical composition of *Varronia curassavica* Jacq. essential oil?. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 3, p. 629-639, 2018.

NUNES, R. S. et al. Susceptibility of Aphis gossypii Glover (Hemiptera: Aphididae) to essential oils and their selectivity to Coccinellidae. **Chemosphere**, v. 263, p. 127983, 2021. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127983.

OLADIPUPO, Seun Olaitan et al. Variation in the susceptibility of Anopheles gambiae to botanicals across a metropolitan region of Nigeria. **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0210440, 2019.

OLIVEIRA, J. E.; PIRES, E. M. Ocorrência de joaninhas (Coleoptera: Coccinellidae) em cultivos agrícolas em Viçosa, MG. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 12, n. 1, p. 48-56, 2017.

OLIVEIRA, M. S. et al. Chemical composition and biological activity of the essential oil from *Varronia curassavica* Jacq. leaves. **Journal of Essential Oil Research**, v. 30, n. 5, p. 351-358, 2018.

PAINE, R. T. The case for top-down control of invertebrate populations. **Ecological Entomology**, v. 21, n. 3, p. 290-292, 1996

PANG, Xue et al. Toxicity and repellent activity of essential oil from Mentha piperita Linn. leaves and its major monoterpenoids against three stored product insects. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 7618-7627, 2020.

PINTO, Z. V. et al. Evaluation of essential oils for control of the tomato leafminer Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) and their compatibility with natural enemies. **Journal of Pest Science**, v. 93, n. 4, p. 1255-1267, 2020.

PIRES, E. M. et al. Potencial de óleos essenciais na proteção de cultivos agrícolas e seus efeitos na fauna benéfica: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 21, n. 1, p. 17-32, 2019.

RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, Vera Lúcia. Important bee plants for stingless bees (Melipona and Trigonini) and Africanized honeybees (*Apis mellifera*) in neotropical habitats: a review. **Apidologie**, v. 21, n. 5, p. 469-488, 1990.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT 9.2 user's guide. **SAS Institute,** 2008.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology,** v. 7, n. 1, p. 539, 2011.

SILVA, J. A. et al. Critérios para escolha de espécies vegetais na obtenção de óleos essenciais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 22, n. 2, p. 273-278, 2020.

SOUZA, C. P. et al. Larvicidal and repellent activity of essential oils from Lippia sidoides and *Varronia curassavica* against Aedes aegypti. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 5, p. 371-378, 2017.

TOLEDO, Pedro FS et al. Potential of Ocotea indecora essential oil for controlling *Drosophila suzukii*: molecular predictions for toxicity and selectivity to beneficial arthropods. **Neotropical Entomology**, p. 1-11, 2024.

TOMÉ, Hudson Vaner V. et al. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. **Annals of Applied Biology**, v. 167, n. 2, p. 186-196, 2015.

TOMÉ, Hudson VV et al. Agrochemical synergism imposes higher risk to Neotropical bees than to honeybees. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 1, p. 160866, 2017.

TONIAL, Carolina H. et al. Technical and economic evaluation of cultivation and obtaining of *Varronia curassavica* Jacq. essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 154, p. 112650, 2020.

TROMBIN DE SOUZA, Michele et al. Physicochemical characteristics and superficial damage modulate persimmon infestation by *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) and Zaprionus indianus. **Environmental Entomology**, v. 49, n. 6, p. 1290-1299, 2020.

VASCONCELOS, J. F. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Varronia curassavica*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p. 1106-1110, 2012.

VILAR, J. C. et al. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Varronia curassavica* against the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus. **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1247-1251, 2013.

ZIMMERMANN, Rubens Candido et al. Insecticide activity and toxicity of essential oils against two stored-product insects. **Crop Protection**, v. 144, p. 105575, 2021.

ZOTTI-SPEROTTO, Naiara C. et al. Effect of drying with ultrasonic pretreatment on the yield and quality of the essential oil of *Varronia curassavica* Jacq. and Ocimum gratissimum Linn. **Industrial Crops and Products**, v. 147, p. 112211, 2020.

CAPÍTULO 3. Estudos *in silico* dos receptores de *Drosophila suzukii* e dos organismos não-alvos *Coleomegilla maculata* e *Apis mellifera*

Resumo

A *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) é considerada uma praga invasora economicamente importante devido sua ação contra culturas frutíferas. Sua facilidade de dispersão entre cidades, estados e países demonstram seu poder de adaptação. Esse fato, causa uma dificuldade na ação de inimigos naturais da região, consequentemente levando a um crescimento na população da praga exótica. Assim, uma estratégia ecologicamente correta é o planejamento racional de biopesticidas à base de plantas e o estudo das interações moleculares assistida por computador. Portanto, o objetivo deste artigo consistiu em realizar uma análise *in silico* para avaliar o potencial bioinseticida dos constituintes químicos presentes no óleo essencial extraído das folhas da espécie *Varronia curassavica* Jaqc. contra *D. suzukii*, com o intuito de investigar as interações com alvos potenciais que possam resultar na mortalidade dessa praga. Além disso, foi conduzido um teste em organismos não-alvo, como *Apis mellifera* e *H. axyridis* (espécie filogeneticamente próxima da *C. maculata*), a fim de determinar as possíveis explicações para a seletividade desses óleos essenciais. Nestes estudos sugerimos que os Receptores de octopamina são alvos promissores responsáveis pela atividade bioinseticida para os constituintes shyobunol e α-cadinol do óleo essencial de *V. curassavica* Jacq. Nossos resultados *in silico* para esse receptor de *D. suzukii* demonstraram as menores energias de interação no procedimento de *docking* molecular, os menores RMSD e RMSF entre os organismos não-alvo, e por fim, as menores energias de ligação ΔG_{bind} nas análises de MMPBSA.

Palavras-chaves: *D. suzukii*, *In silico*, Óleos essenciais, *V. curassavica* Jacq., *Docking* molecular, Dinâmica Molecular.

CHAPTER 3. In silico studies of *Drosophila suzukii* receptors and non-target organisms *Coleomegilla maculata* and *Apis mellifera*

Summary

Drosophila suzukii (Matsumura, 1931) is an economically crucial invasive pest due to its action against fruit crops. Its ease of dispersion between cities, states and countries demonstrates its power of adaptation. This fact causes difficulties in the action of natural enemies in the region, consequently increasing the population of the exotic pest.Thus, an environmentally friendly strategy is the rational design of plant-based biopesticides and the computer-assisted study of molecular interactions. Therefore, the objective of this article was to carry out an in silico analysis to evaluate the bioinsecticide potential of the constituents of the species V. curassavica Jaqc. against D. suzukii, to investigate interactions with potential targets that could result in the mortality of this pest. Furthermore, a test was conducted on non-target organisms, such as A. mellifera and H. axyridis (a species phylogenetically close to C. maculata), to determine possible explanations for the selectivity of these essential oils. In these studies, we suggest that octopamine receptors are promising targets for bioinsecticide activity for the constituents shyobunol and α-cadinol of the essential oil of V. curassavica Jacq. Our in silico results for this D. suzukii receptor demonstrated the lowest interaction energies in the molecular docking procedure, the lowest RMSD and RMSF among non-target organisms, and finally, the lowest ΔGbind binding energies in MMPBSA analyses.

Keywords: *D. suzukii*, In silico, Essential oils, *V. curassavica* Jacq., Molecular docking, Molecular Dynamics.

3.1 Introdução

A *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) é considerada uma praga invasora economicamente importante devido sua ação contra culturas frutíferas. Sua facilidade de dispersão entre cidades, estados e países demonstram seu poder de adaptação (KHATER et al., 2012). Esse fato, causa uma dificuldade na ação de inimigos naturais da região, consequentemente levando a um crescimento na população da praga exótica. Assim, é necessário apresentar uma estratégia racional para compreender os tipos de interação que ocorre em insetos pragas e insetos não-alvo (BARUA, WILLIANS ROSS, 2021).

Os agrotóxicos que são utilizados no controle e manejo da espécie *D. suzukii* apresentam uma gama de complicações para os demais seres naquele ecossistema, como poluição do meio ambiente, neurotoxicidade e doenças (COSTA et al., 2008; KALYABINA et al., 2021; JAYAPRAKAS et al., 2023). Assim, uma estratégia ecologicamente correta é o planejamento racional de biopesticidas à base de plantas e o estudo das interações moleculares assistida por computador (PARK et al., 2016). Essa estratégia permite selecionar alvos moleculares, principalmente receptores neuronais para compreender o efeito causado pelos constituintes químicos dessas plantas (CORREA et al., 2023).

A espécie vegetal *Varronia curassavica* Jacq é conhecida popularmente por erva-baleeira (pertencente à família Boraginaceae), nativa do território brasileiro, é uma espécie encontrada em diversas regiões do Brasil (GASPARINO et al., 2006; RAMOS et al., 2023). Suas atividades biológicas são amplamente conhecidas, principalmente por suas ações medicinal, antifúngica, anti-inflamatória e pesticida (BRISTOT et al., 2021; DE CASTRO NIZIO et al., 2015; RAMOS MELO et al., 2023; ANDRADE et al., 2021).

Portanto, o objetivo deste artigo consistiu em realizar uma análise *in silico* para avaliar o potencial bioinseticida dos constituintes da espécie *V. curassavica* Jaqc. contra *D. suzukii*, com o intuito de investigar as interações com alvos potenciais que possam resultar na mortalidade dessa praga. Além disso, foi conduzido um teste em organismos não-alvo, como *Apis mellifera* e *H. axyridis* (espécie filogeneticamente próxima da *C. maculata*), a fim de determinar as possíveis explicações para a seletividade desses óleos

essenciais. Para alcançar esse objetivo, foram empregadas técnicas de modelagem comparativa, docking e dinâmica molecular.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Modelagem do Receptor GABA da mosca-da-asa-manchada (*Drosophila suzukii*)

A sequência de aminoácidos do receptor GABA de *D. suzukii* (taxid:28584) foi identificada por meio de um alinhamento realizado na ferramenta *BLASTp* utilizando o organismo filogeneticamente mais próximo e mais estudado, a *Drosophila melanogaster* (CHEN et al., 1994), presente no sistema do NCBI (código acesso GenBank: AAA19249.1). Para construir a estrutura tridimensional do receptor GABA (taxid:28584), utilizamos o *Swiss Model Workspace* (https://swissmodel.expasy.org/). Como os receptores GABA são pentaméricos, construímos uma estrutura oligomérica, adicionando a sequência FASTA da *D. suzukii* e a sequência FASTA de um receptor GABAa humano (PDB ID: 6HJY) na sessão "ADD HETERO TARGET".

A fim de validar a estrutura tridimensional, foi realizado a avaliação de torções dos aminoácidos pelo servidor PROCHECK (https://saves.nmbi.ucla.edu), verificando o gráfico de Ramachandran com filtros de 80% de regiões energeticamente favorecidas para ângulos diédricos [φ, ψ] dos resíduos de aminoácidos. Além disso, também avaliamos a estrutura tridimensional com o parâmetro QMEANDisco do *Swiss Model Workspac*e, que é uma métrica de qualidade de modelos. Modelos com pontuações acima de 0,5 são considerados de boa qualidade, enquanto aqueles abaixo de 0,5 apresentam qualidade não favorável.

3.2.2. Receptores GABA dos organismos não-alvos *A. mellifera* e *H. axyridis*

As sequências de aminoácidos dos receptores GABA de organismos não-alvos como as espécies *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) e *Coleomegilla maculata* (DeGeer) (Coleoptera: Coccinelidae) foram também obtidas do banco de dados NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). No entanto, como não haviam dados de genoma depositados para a espécie *C. maculata*, uma busca foi realizada por um organismo filogeneticamente mais próximo e com dados suficientes para a construção dos receptores e enzimas necessárias para a comparação com o organismo alvo deste estudo.

Portanto, foi utilizado o organismo *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae), que pertence à mesma família da espécie *C. maculata*. A sequência (XP_006565158.1) foi obtida para *A. mellifera*, considerada uma isoforma beta subunidade X1, e para *H. axyridis* (XP_045465866.1), também como uma isoforma beta subunidade X1.

Para construir as estruturas tridimensionais dos receptores GABA de *A. mellifera* e *H. axyridis*, foi repetido o mesmo protocolo utilizado para construir a estrutura 3D de *D. suzukii*. Além disso, foi utilizado os mesmos protocolos de validação da estrutura tridimensional citado acima. O mesmo template ID PDB: 6HJY foi utilizado, com resolução de 2,78Å, que apresentou melhor similaridade (> 20%) e cobertura (> 60%), respectivamente.

3.2.3 Enzima acetilcolinesterase (AChE) e Receptor de Octopamina de *D. suzukii*

Foi utilizado os mesmos protocolos de construção da estrutura tridimensional citados acima para a modelagem molecular do receptor de Octopamina e da enzima acetilcolinesterase de *D. suzukii,* sendo as sequências XP_036672951.1 e XP_036673707.1, respectivamente, obtidas do banco de dados do NCBI. Entretanto, todas as sequências não apresentaram boa qualidade para realizar a modelagem. Por conta disso, foi utilizado as sequências de aminoácidos de *D. melanogaster*, que apresentam uma boa relação com a sequência da *D. suzukii* (com valores >90% de cobertura e >50 % de identidade). Na ferramenta do Swiss Model, foi utilizado a estrutura cristalográfica do cristal ID PDB (7XT8) do receptor de octopamina e para a enzima acetilcolinesterase (AChE) o template ID PDB (5HQ3), com resoluções de cristalografia de 3,10Å e 2,60Å, respectivamente. Adicionalmente, foi realizado a validação da estrutura tridimensional, como mencionado acima.

3.2.4 Enzima acetilcolinesterase (AChE) e Receptor de Octopamina dos organismos não-alvo *A. mellifera e H. axyridis*

Para construir as estruturas tridimensionais do receptor de Octopamina e AChE de *A. melífera* e *H. axyridis* foi utilizado os mesmos protocolos para a construção da estrutura 3D de *D. suzukii.* Para os parâmetros de validação das estruturas tridimensionais foi utilizado as ferramentas do PROCHECK SAVES (https://saves.nmbi.ucla.edu), gráfico de Ramachandran e o QMEANDisco.

3.2.5 Estudos de acoplamento molecular

3.2.5.1 Preparação dos ligantes

Primeiramente, as estruturas dos constituintes majoritários do OE de *V. curassavica Jaqc.* foram desenhados utilizando a ferramenta Marvin Sketch 19.25. Essas estruturas foram representadas de maneira detalhada, incluindo todos os átomos e ligações, a fim de garantir uma modelagem molecular precisa. Posteriormente, todas as estruturas moleculares foram salvas no formato mol2, o que permitiu a preservação de informações essenciais sobre as coordenadas tridimensionais e as características químicas dos compostos. Na etapa subsequente, foi realizada a preparação das estruturas moleculares para a realização dos estudos de ancoragem molecular. Isso envolveu o uso da ferramenta AutoDock Tools 1.5.6.

Durante o processo de preparação, todos os hidrogênios polares foram adicionados às estruturas, replicando de forma precisa as condições biológicas. Além disso, as cargas de Gasteiger foram calculadas e atribuídas às moléculas. Esse procedimento é fundamental para a determinação das interações entre os compostos dos OEs e os sítios ativos dos receptores, e por fim salvo no formato PDBQT.

3.2.5.2 Estudos de *Docking* Molecular

Neste estudo, o AutoDockTools 1.5.6 (ADT) foi utilizado para preparar os arquivos de entrada no formato PDBQT e criar grades de ancoragem para todos os receptores modelados, conforme mencionado anteriormente. As grades de ancoragem foram definidas em torno do sítio ativo, com coordenadas específicas (x, y e z) e um espaçamento de grade de 0,375 Å. Adicionalmente, todos os hidrogênios polares foram adicionados, e as cargas de Kollman foram atribuídas, conforme indicado pelo protocolo do AutoDock 4. Essas informações foram salvas no formato PDBQT.

Para a busca conformacional, o algoritmo genético Lamarckiano (LGA) foi empregado. Cada execução do algoritmo envolveu 10 interações. Os valores padrão foram mantidos para os demais parâmetros. Após a conclusão das simulações, as estruturas finais foram agrupadas e classificadas com base na energia de ligação mais favorável (em kcal/mol). Através da análise da energia de ligação, é possível também realizar uma estimativa da constante de inibição (Ki) (Eq. 1) de cada composto. Para isso, o AutoDock 4 realiza à aplicação da equação de Gibbs-Helmholtz para a relação

linear, que é expressa (1). Aqui, ΔH representa a variação na entalpia da interação entre as moléculas envolvidas.

$$\text{Eq. (1)} \quad \ln(Ki) = \frac{-(\Delta G + \Delta H)}{RT}$$

Essa abordagem permite compreender também a contribuição da entalpia na interação molecular, além da energia de ligação. Sendo fundamental para avaliar a afinidade entre as moléculas, especialmente em estudos de ligação de ligantes a proteínas alvo. Esse procedimento foi aplicado igualmente a todos os compostos selecionados. Foram gerados os mapas de interação (Mapas 2D) com a ferramenta do Discovery Studio v17.2.0 para fins de comparação das interações dos resíduos do sítio ativo. Os resultados obtidos estão detalhados na **Tabela 2** e podem ser visualizados (**Fig 5, 6 e 7)**.

3.2.6 Simulação de Dinâmica Molecular (DM)

Foi conduzido uma série de simulações de Dinâmica Molecular (MD) utilizando o software de código aberto GROMACS 2023 e 2024. Primeiramente, foi utilizado o servidor CHARMI-GUI (JUMIN LEE et al., 2016) para preparar os arquivos de entrada para o GROMACS. Os arquivos de topologia foram preparados com o campo de força CHARMM36 (VANOMMESLAEGHE et al., 2009), onde foram gerados os parâmetros de topologias (top) das proteínas pelo protocolo *gmx grommp*. Foram selecionados os complexos com os componentes principais do OE de *V. curassavica* (e.g.: Shyobunol e α-cadinol). Em seguida, a parametrização dos ligantes foi utilizado o webserver CGenFF (https://cgenff.silcsbio.com/). O CGenFF permite que as moléculas sejam representadas por um campo de força geral, associando atributos aos átomos e ligações, onde o mesmo realiza a digitação de átomos e atribuição de parâmetros e cargas por analogia de forma totalmente automatizada. Todos os ligantes foram utilizados nesse servidor.

Para os receptores de membrana (e.g.: Receptores GABAa e Octopamina) foram submetidos a construção da camada bilipídica pelo servidor CHARMI-GUI (JUMIN LEE et al., 2016), onde foram adicionadas 60 moléculas de POPC (e.g.: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), 41 K^+ e 51 Cl^- íons e solvente do tipo TIP3P, numa caixa retangular de dimensões em X= 73,21 Å, Y=73,21 Å e Z= 135,87Å.

Já os complexos de AChE foram imersos em uma caixa cúbica contendo moléculas de água do tipo *Transferable Intermolecular Potentials with 3 Points* (TIP3P). O sistema solvatado, foi neutralizado pela adição de íons Na+ e Cl^-. Para uma minimização de erros por choques estéricos e geometria inadequada da estrutura, realizou uma etapa de minimização de energia com restrições de posição, com uma tolerância de 1000 KJ mol^{-1} nm^{-2}, com uma etapa de 10.000 passos utilizando o algoritmo de descida mais acentuada e 10.000 passos com o algoritmo de gradiente conjungado. O equilíbrio dos sistemas fora submetido pelo método PME com um cuttof de 1.2 nm e um espaçamento de Fourier de 0.16 nm, em duas etapas (NVT e NPT) a 300 K por 1000 ps, respectivamente. Por fim, todos os sistemas foram submetidos a uma simulação de produção de MD com duração de 100 ns (100.000 ps), mantendo a temperatura a 300 K e a pressão a 1 bar, sendo registrada as coordenadas estruturais a cada 2 ps.

3.2.6.1 Mecânica Molecular/Área de Superfície de Poisson-Boltzmann (MMPBSA)

O protocolo MM/PBSA também foi utilizado para todo o tempo de simulação de 100 ns. A energia de ligação foi calculada para o sistema receptor/ligante (ΔG_{bind}) (TONELLI et al., 2010). Esse cálculo (1) e (2) permitiu determinar a afinidade dos constituintes com seus respectivos receptores e observar as contribuições energéticas envolvidas (e.g.: energia de solvatação; entropia; entalpia; contribuição de gás, entre outras).

$$\Delta G_{bind} = \Delta H_{bind} - T \,.\, \Delta S_{bind} \qquad (1)$$

$$\Delta H_{bind} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{solv} \qquad (2)$$

Para as análises dos resultados das simulações dos complexos foram utilizadas as ferramentas fornecidas pelo pacote GROMACS, como RMSD (rms) da espinha dorsal das proteínas e RMSF (rmsf), do carbono-alfa..

3.3 Resultados e Discussões

Neste estudo, iremos analisar as interações intermoleculares entre os constituintes do óleo essencial da espécie vegetal *Varronia curassavica* Jacq. e alvos moleculares responsáveis pela atividade inseticida frente a praga *D. suzukii* e comparar com as interações que ocorrem em um organismo não-alvo (*A. melífera e H. axyridis*). Essa comparação nos permitirá avaliar tanto a possível seletividade do OE e ação bioinseticida.

3.3.1 Modelagem Molecular das Proteínas

O *Blastp* realizado para busca da sequência do receptor GABAa de *D. suzukii* demonstrou 100% de cobertura e 96,74% de identidade com o receptor GABA de *D. melanogaster*. O receptor GABA de *A. mellifera* exibiu uma cobertura de 92% e de identidade 68,26%. Para o receptor GABA de *H. axyridis* obteve um valor de 74% de cobertura e 72,79% de identidade.

As enzimas AChEs (acetilcolinesterases) de *D. suzukii, A. mellifera e H. axyridis* apresentaram uma cobertura de 100%, 81% e 97% e uma identidade de 98,63%, 61,52% e 58,49%, respectivamente. Os receptores de Octopamina dos mesmos organismos, apresentaram uma cobertura de 81%, 84% e 81% e uma identidade de 51,77%, 31,88% e 31,12%, respectivamente.

A avaliação da qualidade das estruturas realizados pelos servidores do SWISSModel e PROCHECK, exibiram informações que estão inseridas na **tabela 1**. Os gráficos de Ramachandran de todos os modelos construídos exibiram valores favoráveis (< 97% dos resíduos em região permitidas) (**Figura 1, 2 e 3**).

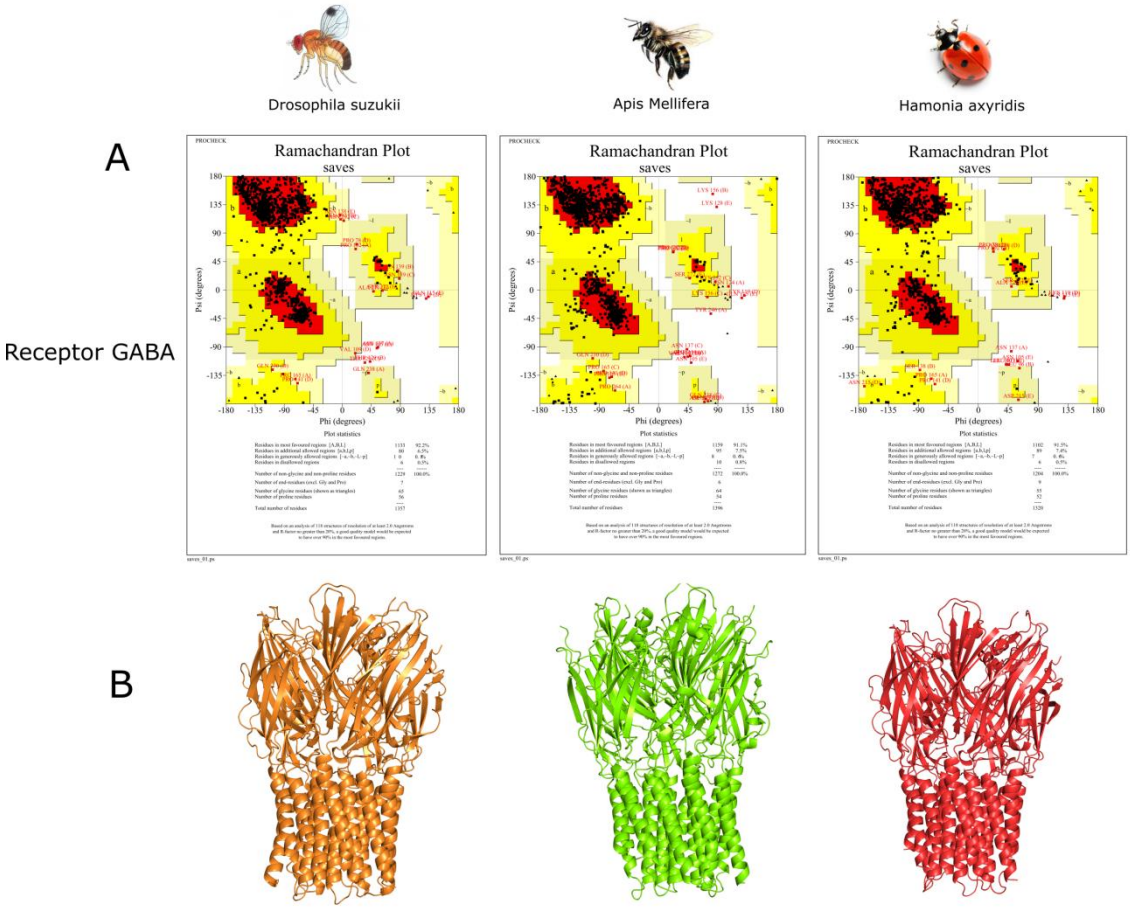

Fig 1. Imagem dos gráficos de Ramachandran para os receptores GABA dos organismos alvo e não-alvo.***A.*** *Graficos de Ramachandran dos receptores GABA dos organismos D. suzukii, A. mellifera e H. axyridis.* ***B.*** *Estruturas tridimensionais dos receptores GABA (verde) Receptor GABA A. mellifera; (laranja) Receptor GABA D. suzukii; (vermelho) Receptor GABA H. axyridis.*

Segundo os dados dos gráficos de Ramanchadran, a maioria dos aminoácidos dos receptores GABA, de Octopamina e as enzimas acetilcolinesterase de todos os organismos alvo e não-alvo, possuem ângulos diedros phi e psi dentro dos valores esperados para estruturas proteicas estáveis. Isso indica uma boa relação em dobramento e função da proteína (HOOFT et al., 1997; SHEIK et al., 2002).

A métrica QMEANDisCo, em sua totalidade, é uma média calculada por resíduo. A previsão de erro que acompanha é derivada das estimativas de QMEANDisCo globais para uma ampla gama de modelos. Esta previsão representa a média do quadrado da diferença (em outras palavras, o desvio padrão) entre a métrica QMEANDisCo global e o lDDT (que é a verdade de base). Nisso, ele combina potenciais estatísticos e termos de concordância com uma pontuação de restrições de distância (DisCo).

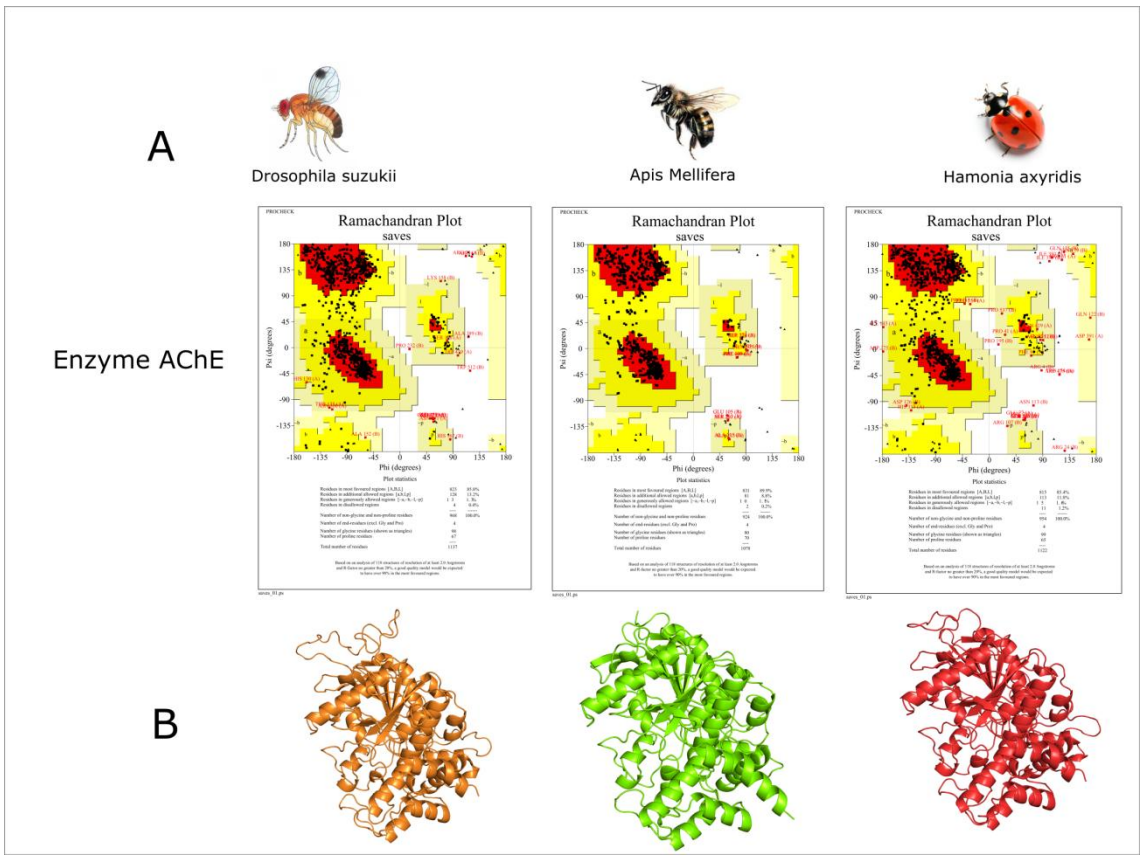

Fig 2. Imagem dos gráficos de Ramachandran para as enzimas acetilcolinesterase (AChE) dos organismos alvo e não-alvo. A. Graficos de Ramachandran das AChE dos organismos *D. suzukii*, *Apis mellifera* e *H. axyridis*. B. Estruturas tridimensionais das enzimas AChE *D. suzukii* (laranja); AChE *A. mellifera*; (verde) AChE *H. axyridis* (vermelho).

As estruturas dos receptores GABA, Octopamina e a enzima AChE de *D. suzukii* demonstrou valores de QMEANDisco de 0,60 ± 0,05, 0,73 ± 0,05 e 0,58 ± 0,05, respectivamente. Esses valores são estimados como bons, sugerindo que a qualidade estrutural global do modelo é relativamente alta (STUDER et al., 2020).

Tabela 1. QMEANDisco Global (Análise de energia do modelo qualitativo)

‘	**QMEANDisCo**		
Organismo	GABA	AChE	Octopamina
Drosophila suzukii	0,60 ± 0,05	0,73 ± 0,05	0,58 ± 0,05
Apis Melifera	0,58 ± 0,05	0,89 ± 0,05	0,53 ± 0,05
Harmonia axyridis	0,58 ± 0,05	0,74 ± 0,05	0,46 ± 0,05

QMEANDisCo : Qualitative Model Energy ANalysis with a Distance Constraints. (±) desvio-padrão.

Para o organismo não-alvo *A. mellifera*, os receptores GABA, Octopamina e a enzima AChE exibiram os valores de 0,58 ± 0,05, 0,53 ± 0,05 e 0,89 ± 0,05 respectivamente. Também estimados como bons. Para o organismo *H. axyridis*, os receptores exibiram um QMEANDisco de 0,58 ± 0,05, 0,46 ± 0,05 e 0,74 ± 0,05, respectivamente. Apresentam uma qualidade estrutural global boa, somente o receptor de Octopamina exibiu valor abaixo (QMEANDisco < 0,5), considerado um valor moderado.

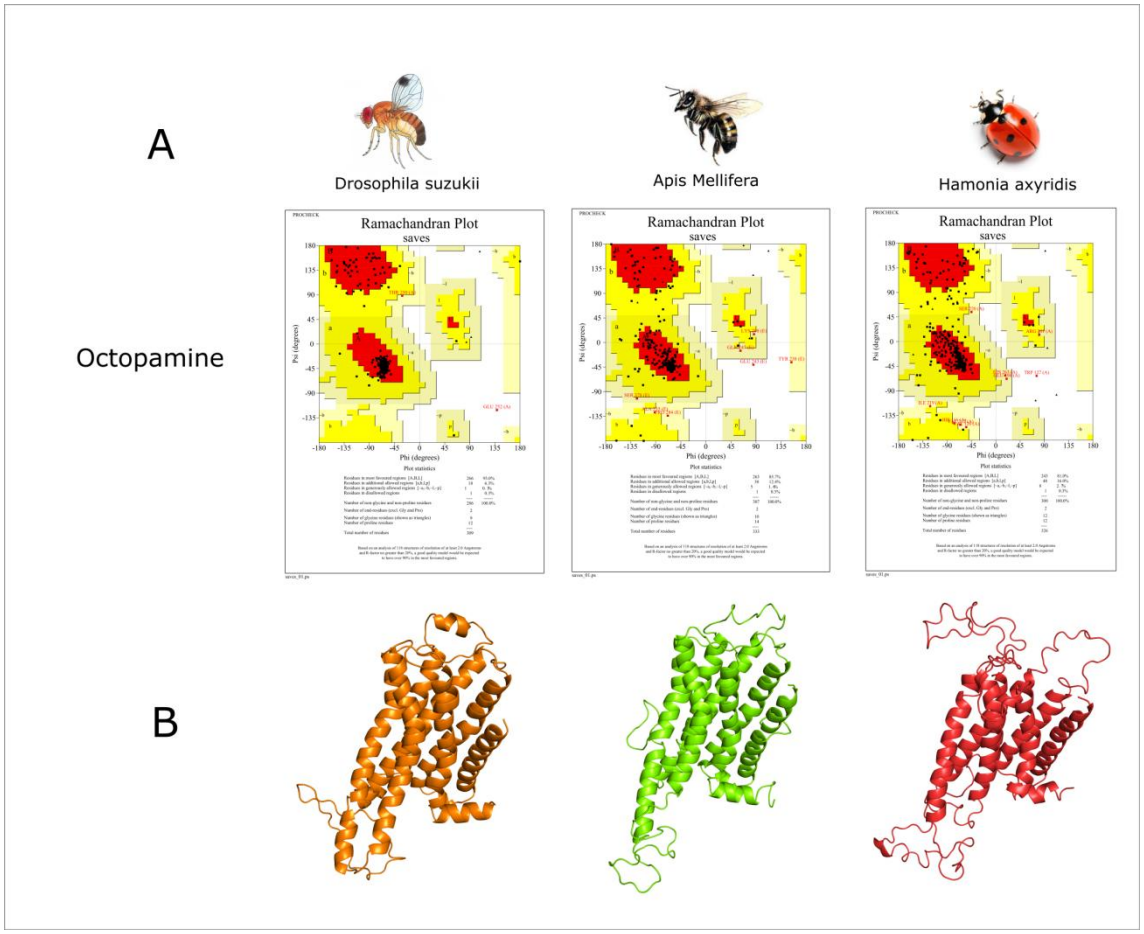

Fig 3. Imagem dos gráficos de Ramachandran para os receptores de Octopamina dos organismos alvo e não-alvo. A. Graficos de Ramachandran dos receptores de Octopamina dos organismos *D. suzukii*, *Apis mellifera* e *H. axyridis*. B. Estruturas tridimensionais do Receptor de Octopamina *D. suzukii* (laranja); Receptor de Octopamina *A. mellifera*; (verde) Receptor de Octopamina *H. axyridis* (vermelho).

A precisão da previsão da qualidade dos modelos está fortemente influenciada pelo tamanho do modelo, portanto, a previsão de erro fornecida é computada com base em modelos cujo tamanho é comparável ao do modelo de entrada, além da qualidade dos modelos que são disponíveis para a modelagem, que podem influenciar na pontuação do modelo construído (STUDER et al., 2020; YU et al., 2023).

3.3.2 *Docking* molecular

Nos estudos de *docking* molecular, foram analisados os constituintes majoritários do óleo essencial das folhas da espécie *V. curassaciva Jaqc.,* principalmente devido suas energias de afinidades de ligação (Kcal/mol) e constante de inibição (Ki)(**Fig 4**).

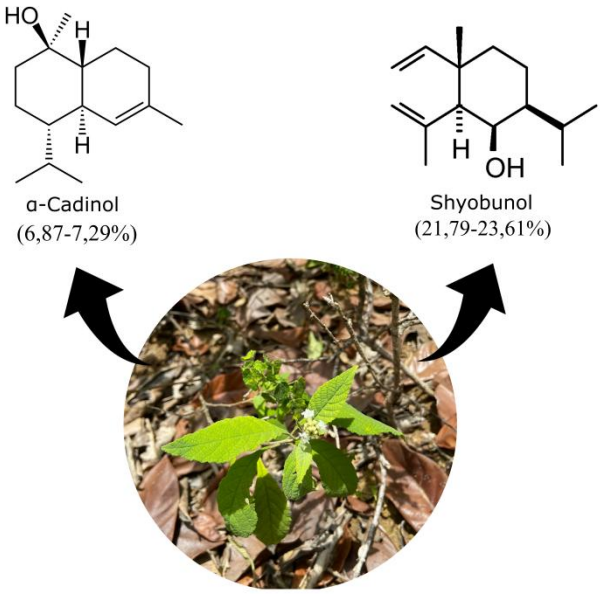

Fig 4. Estrutura química dos constituintes majoritários do OE da espécie *V. curassavica* Jacq

Na tabela 2 contém as informações com as energias de afinidades de ligação com os seguintes alvos descritos: AChE (acetilcolinesterase), Receptor Octopamina e Receptor GABAa. Além disso, empregamos a técnica de ancoragem molecular com os mesmos alvos moleculares mencionados anteriormente, porém agora direcionados a organismos não alvos, tais como *Apis mellifera* e *H. axyridis (C. maculata)*, seguindo a mesma estratégia previamente descrita.

3.3.2.1 Enzimas Acetilcolinesterase (AChE)

No *Docking* molecular com a enzima acetilcolinesterase os resultados sugerem que o constituinte shyobunol apresentou maior estabilidade de ligação (-7,24 Kcal/mol) referente a AChE de *D. suzukii* em comparação com os organismos não-alvo *A. mellifera* (-6,13 Kcal/mol) e *H. axyridis* (-6,21 Kcal/mol). Em comparação, o composto α-cadinol não apresentou uma diferença energética entre os organismos alvo (*D. suzukii* -6,59Kcal/mol) e não-alvo (*A. mellifera* -6,24 e *H. axyridis* -6,6 Kcal/mol).

Tabela 2. Docking Molecular dos constituintes α-Cadinol e shyobunol da espécie *V. curassavica Jaqc.* frente aos alvos moleculares das espécies alvo e não-alvo

	GABA	Ki	AChE	Ki	Octopamina	Ki
	Kcal/mol	µM	Kcal/mol	µM	Kcal/mol	µM
			Shyobunol			
A. mellifera	-7,0*	7,4	-6,13	32,02	-5,95	43,31
H. axyridis	-6,1	33,75	-6,21	27,82	-6,29	24,45
D. suzukii	-5,88	49,22	-7,24*	4,92	-7,35*	7,24
			α-Cadinol			
A. mellifera	-7,59*	2,71	-6,24	26,58	-8,67	0,439
H. axyridis	-6,58	14,95	-6,6*	14,47	-6,43	19,34
D. suzukii	-6,65	13,36	-6,59	14,65	-8,86*	0,323

* Representa a menor energia de ligação entre os receptores e enzima das espécies alvo e não-alvo.

As interações dos constituintes com os resíduos de aminoácidos da tríade da enzima AChE de *D. suzukii* foram SER^{280}, GLU^{367} e HIS^{480}. A interação do tipo ligação de hidrogênio ocorre em dois resíduos GLU^{237} e SER^{238} predominantemente para o composto shyobunol (figura 5.D), em comparação ao composto α-cadinol, que interage com o resíduo SER^{238} do tipo van der Waals. Além disso, ambos constituintes realizam interações do tipo π-sigma com os resíduos TRP^{83} e PHE^{330}. Somente o α-Cadinol interage com o TYR^{71} do tipo π-sigma. As demais interações são do tipo van der Waals.

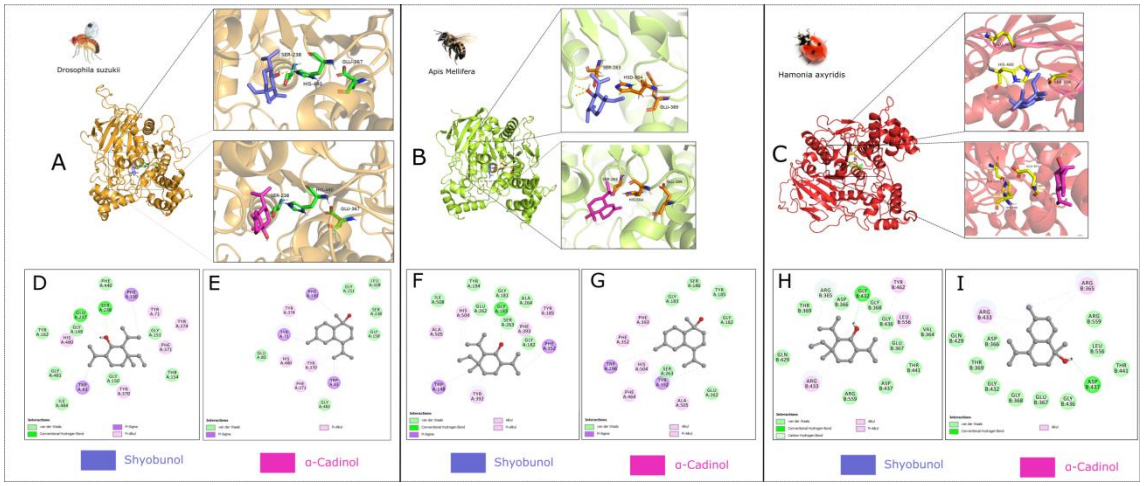

Fig 5. Mapa de interação da ligação dos constituintes da espécie *V. curassavica Jacq* as enzimas acetilcolinesterase (AChE) relacionados com *D. suzukii* e as espécies não-alvo *A. mellifera e H. axyridis*. ***A.*** Estruturas dos sítios ativos da enzima AChE *D. suzukii* (AChE, painel esquerdo) interagindo com os constituintes Shyobunol e α-Cadinol. **B.** Estruturas dos sítios ativos da enzima AChE *A. mellifera* (AChE, centralizado) interagindo com os constituintes Shyobunol e α-Cadinol. **C.** Estruturas dos sítios ativos da enzima AChE *H. axyridis* (AChE,painel direito) interagindo com os constituintes Shyobunol e α-Cadinol. **D e E**. Mapa 2D da interação entre o Shyobunol e α-Cadinol com o sítio ativo AChE *D. suzukii*. ***F e G.***

Mapa 2D da interação entre o Shyobunol e α-Cadinol com o sítio ativo AChE *A. mellifera.* ***H e I***. Mapa 2D da interação entre o Shyobunol e α-Cadinol com o sítio ativo AChE *H. axyridis.*

Os principais resíduos do sítio da AChE de *A. mellifera* são SER^{263}, GLU^{389}, HIS^{504}. Os constituintes shyobunol e α-cadinol interagiram do tipo π-alquil com o resíduo HIS^{404} e do tipo van der Waals com o resíduo SER^{263}. Já para AChE de *H. axyridis* interagiu com dois resíduos da tríade, HIS480 e SER238 do tipo π-alquil e van der Waals, respectivamente. Além disso, ambos os constituintes realizam uma interação do tipo π-sigma com o resíduo TRP^{83}. O shyobunol apresentou uma ligação de hidrogênio com uma TYR^{370} e o α-Cadinol com o resíduo GLY^{150}, que também apresenta uma interação a mais do tipo π-sigma com o resíduo TYR^{370}.

3.3.2.2 Receptores de Octopamina

Em relação aos receptores de octopamina com os constituintes principais do OEVC, o shyobunol exibiu maior estabilidade de ligação com o receptor de *D. suzukii* (-7,35 Kcal/mol), comparado aos organismos não-alvo *A. mellifera* (-5,95Kcal/mol) e *H. axyridis* (-6,29 Kcal/mol). O composto α-cadinol demonstrou ser estável em dois receptores, de *D. suzukii* (-8,86 Kcal/mol) e *A. mellifera* (-8,67Kcal/mol), todavia, exibiu uma energia de interação mais fraca para o receptor de *H. axyridis* (-6,43Kcal/mol).

O shyobunol exibiu interação com o receptor de octopamina de *D. suzukii* do tipo, ligação de hidrogênio com ASP^{187} e π-alquil com os resíduos PHE^{266}, PHE^{366}, PHE^{390} e VAL^{386}, considerados os principais aminoácidos do sítio ativo desse receptor. O composto α-cadinol com o mesmo receptor interagiu do tipo ligação de hidrogênio com o mesmo resíduo ASP^{187} e π-alquil com os resíduos PHE^{266}, PHE^{366} e VAL^{386} e uma interação π-sigma com o resíduo PHE^{390} que proporcionou uma maior afinidade estabilizando o composto no receptor. Nesse viés, o composto α-cadinol também exibiu a mesma interação com o receptor de octopamina de *A. mellifera* com o resíduo PHE^{347} (interação π-sigma), confirmando a estabilidade dessa interação. Ambos os compostos não foram tão efetivos nas interações com o receptor de octopamina de *H. axyridis*, demonstrou interações consideradas mais fracas (e.g.: alquil e van der Waals). Os mapas de interação de cada receptor estão inseridos na **Fig 6**.

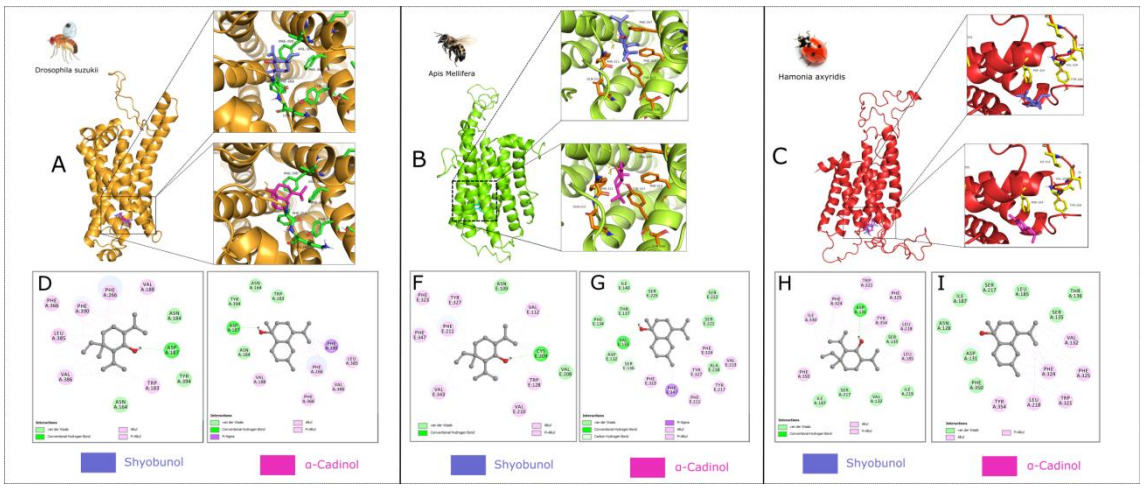

Fig 6. *Mapa de interação da ligação dos constituintes da espécie V. curassavica Jacq os receptores de Octopamina relacionados com D. suzukii e as espécies não-alvo A. mellifera e H. axyridis.* ***A.*** *Estruturas dos sítios ativos do receptor de octopamina D. suzukii (painel esquerdo) interagindo com os constituintes Shyobunol e α-Cadinol.* ***B.*** *Estruturas dos sítios ativos do receptor de octopamina de A. mellifera (centralizado) interagindo com os constituintes Shyobunol e α-Cadinol.* ***C.*** *Estruturas dos sítios ativos do receptor de octopamina de H. axyridis (painel direito) interagindo com os constituintes Shyobunol e α-Cadinol.* ***D e E****. Mapa 2D da interação entre o Shyobunol e α-Cadinol com o sítio ativo do receptor de octopamina de D. suzukii.* ***F e G****. Mapa 2D da interação entre o Shyobunol e α-Cadinol com o sítio ativo do receptor de octopamina de A. mellifera.* ***H e I.*** *Mapa 2D da interação entre o Shyobunol e α-Cadinol com o sítio ativo do receptor de octopamina de H. axyridis.*

Desta forma, nossos resultados indicam que as energias de ligação e as análises das interações intermoleculares com os compostos shyobunol e α-cadinol são promissores para o receptor de octopamina de *D. suzukii*. Guo et al. (2021) demonstra que os receptores de octopamina beta 2 (Octβ2R) desempenham um papel crucial na resistência frente a inseticidas, comumente usados para ácaros *Varroa*. Além disso, o estudo destaca que os receptores de octopamina, principalmente de abelhas (*A. mellifera*) são essenciais para a seletividade do inseticida amitraz entre as abelhas e os ácaros. Desta forma, podemos destacar que os receptores de octopamina de *A. mellifera* também podem apresentar algum tipo de resistência aos constituintes do OE da espécie *V. curassavica,* principalmente com o constituintes shyobunol, devido a sua menor energia de interação (E=-5,95 Kcal/mol).

3.3.2.3 Receptores GABA

O receptor GABA (ácido-gama-aminoburítico) de *A. mellifera* demonstrou a energia de ligação com maior estabilidade para ambos os constituintes do OE de *V. curassavica* Jacq. (-7,0 shyobunol e -7,59 Kcal/mol α-cadinol, respectivamente). Os receptores GABA de *D. suzukii* (-5,88 Kcal/mol, -6,65 Kcal/mol) e *H. axyridis* (-6,1 Kcal/mol, -6,58 Kcal/mol) não apresentaram diferenças significativas nas energias de ligação para os constituintes shyobunol e α-cadinol, respectivamente.

Os estudos de análises de interação estão inseridos na **Fig 7**. O composto shyobunol exibiu com o receptor GABA de *A. mellifera* (**Fig 7.F**) duas interações do tipo π-sigma com os resíduos TYR^{96} e PHE^{115}, são considerados aminoácidos importantes para esse receptor. Além disso, uma ligação de hidrogênio ocorreu com o resíduo ARG^{152}. Interações do tipo π-alquil ocorreram com os resíduos TYR^{210} e TYR^{258}. As demais sete interações são do tipo van der Waals. O composto α-cadinol (**Fig 7.G**) exibiu uma interação π-sigma com a PHE^{96} e uma ligação de hidrogênio com TYR^{210}. As interações hidrofóbicas (π-alquil) prevaleceram para os resíduos PHE^{115} e TYR^{258}. Nove interações do tipo van der Waals foram exibidas para esse composto, contribuindo para uma energia de ligação mais favorável.

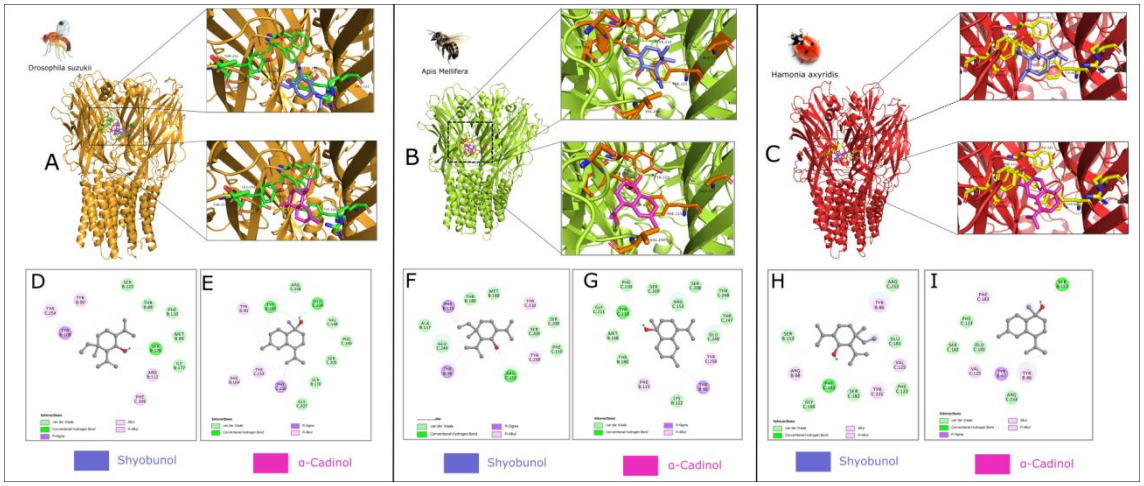

Fig 7. Mapa de interação da ligação dos constituintes da espécie V. curassavica Jacq os receptores GABA selacionados com D. suzukii e as espécies não-alvo A. mellifera e H. axyridis. ***A.*** *Estruturas dos sítios ativos do receptor de GABA de D. suzukii (painel esquerdo) interagindo com os constituintes Shyobunol e α-Cadinol.* ***B.*** *Estruturas dos sítios ativos do receptor GABA de A. mellifera (centralizado) interagindo com os constituintes Shyobunol e α-Cadinol.* ***C.*** *Estruturas dos sítios ativos do receptor GABA de H. axyridis (painel direito) interagindo com os constituintes Shyobunol e α-Cadinol.* ***D, E.*** *Mapa 2D da interação entre o Shyobunol e α-Cadinol com o sítio ativo do receptor GABA de D. suzukii.* ***F, G.*** *Mapa 2D da interação entre o Shyobunol e α-Cadinol com o sítio ativo do receptor GABA de A. mellifera.* ***H, I.*** *Mapa 2D da interação entre o Shyobunol e α-Cadinol com o sítio ativo do receptor GABA de H. axyridis.*

O complexo formado pelo Receptor GABA *D. suzukii* e o composto shyobunol (Figura 7.D) mostrou uma ligação de hidrogênio com SER^{176}, uma interação π-sigma com TYR^{109} e quatro interações hidrofóbicas (π-alquil e alquil) com TYR^{90}, ARG^{111}, PHE^{206} e TYR^{254}. Somente cinco interações de van der Waals foram exibidas. O complexo com o composto α-cadinol (**Fig 7.E**) exibiu duas ligações de hidrogênio com TYR^{109} e GLU^{204}, uma interação π-sigma com PHE^{206}, três interações hidrofóbicas e seis interações de van der Waals.

Por fim, o receptor GABA de *H. axyridis* demonstrou com o composto shyobunol (Figura 7.H) uma ligação de hidrogênio com PHE^{183}, quatro interações

hidrofóbicas com TYR^{86}, ARG^{88}, VAL^{125} e TYR^{231} e 6 interações de van der Waals. O complexo GABA-α-cadinol (**Fig 7.I**) exibiu uma ligação de hidrogênio com SER^{153}, uma interação π-sigma com TYR^{67} e três interações hidrofóbicas com TYR^{86}, VAL^{125} e PHE^{183}. Somente quatro interações de van der Waals foram exibidas.

Outros estudos *in silico,* demonstraram que o receptor GABA é um alvo promissor para *D. suzukii* (MANTILLA AFANADOR, et al., 2023). Entretanto, nossos resultados *in silico* demonstraram que os constituintes shyobunol e α-cadinol apresentaram maior estabilidade de ligação com o receptor GABA de *A. mellifera*. Aqui, descobrimos que as interações hidrofóbicas e de van der Waals foram primordiais na diferença significativa entre as energias de ligação, podendo ser as interações chave para a atividade desse receptor. Além disso, analisamos as divergências dos aminoácidos do sítio ativo entre os receptores comparados ao receptor GABA de *D. suzukii,* e detectamos que na subunidade α1 (cadeia B) do receptor GABA de *A. mellifera* apresenta duas variações nos aminoácidos (TYR^{109} PRO^{115}) e (ARG^{111} ALA^{117}) isso muda totalmente a forma de interagir dos compostos, beneficiando a interação para a *A. mellifera.* Para a subunidade β2 (cadeia C) houve quatro divergências GLU^{204} SER^{208}, PHE^{206} TYR^{210}, TYR^{254} SER^{255} e THR^{251} TYR^{250}.

GAO et al., (2020) menciona sobre a mutação na região do sítio ativo dos receptores GABA de insetos, de como esse receptor pode interferir no modo de ligação, e ser um ponto chave para a atividade antagonista. Portanto, sabendo-se que os receptores GABA estão localizados no sistema nervoso de insetos, esse receptor pode causar de alguma forma as abelhas, interferência nas suas transmissões sinápticas inibitórias. Além disso, Pavela e Benelli (2016) menciona que constituintes de OEs tem a capacidade de manifestar atividades neurotóxicas em insetos através de modulações dos receptores GABA, regulação das sinapses de receptores octopaminérgicos e inibição de enzimas acetilcolinesterases, considerados alvos importantes para atividade biopesticidas.

3.3.3 Dinâmica Molecular

Após as análises de *docking* molecular foram investigados os complexos proteínas-ligantes dos organismos alvo e não-alvo utilizando simulações de dinâmica molecular (DM) para examinar o comportamento dos constituintes em cada sistema, na escala de nanossegundos. A partir da execução de produção de DM foram analisados

todos os complexos em um tempo de 100 nanossegundos (ns). As análises foram selecionadas a partir dos gráficos de RMSD (*Root-Mean Square Desviation*), RMSF (*Root-Mean Square Fluctuation*), HBonds (ligação de hidrogênio) e MMPBSA (energia de ligação ΔG).

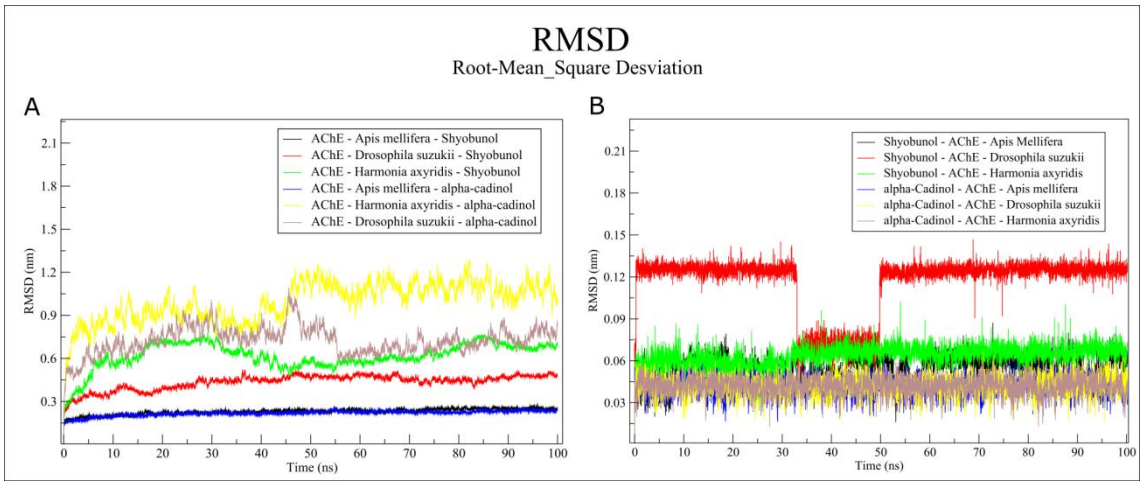

Fig 8. O desvio quadrático médio (RMSD) em nanômetros (nm) das enzimas AChE. **A.** RMSD das estruturas das enzimas AChE de *D. suzukii* (shyobunol e α-cadinol em vermelho e marron, respectivamente) de *A. mellifera* (shyobunol e α-cadinol em preto e azul, respectivamente) e de *H. axyridis* (shyobunol e α-cadinol em verde e amarelo, respectivamente) em função do tempo em nanossegundos. **B.** RMSD dos ligantes shyobunol e α-cadinol para as enzimas AChE de *D. suzukii* (vermelho e amarelo), *A. mellifera* (preto e azul) e para *H. axyridis* (verde e marrom).

Os gráficos de RMSD (**Fig 8.A**) para o receptor de AChE demonstrou que as enzimas AChE de *A. mellifera (para shyobunol e α-cadinol) e D. suzukii (shyobunol)* apresentaram o menor valor de RMSD 0,2-0,3 nm. O valor de RMSD do complexo AChE-shyobunol e AChE-α-cadinol de *A. mellifera* foi o menor entre os demais (±0,15 nm) equilibrando nos primeiros nanossegundos até o final da simulação, demonstrando estabilidade conformacional e convergência da estrutura. O complexo AChE-shyobunol de *D. suzukii* também demonstrou um valor de RMSD baixo (±0,3nm), convergindo a partir dos 10 ns. Os demais complexos (AChE-shyobunol de *H. axyridis* e AChE-α-cadinol de *H. axyridis e D. suzukii)* apresentaram um valor de RMSD muito elevado (>0,6 nm), demonstrando uma instabilidade conformacional e não convergência desses complexos. O RMSD (± 0,05-0,06 nm) do constituinte shyobunol (**Fig 8. B**) não demonstram diferença significativa para as enzimas AChE de *A. mellifera* e *H. axyridis,* entretanto, o shyobunol do complexo AChE de *D. suzukii,* apresentou um RMSD ±0,12 nm até 30 ns, diminuiu até ± 0,07nm e retornou a aumentar em 50 ns, considerado o maior RMSD entre todos os demais complexos. Já os complexos AChE-α-cadinol não exibiu diferença significativa entre os organismos (±0,05 nm).

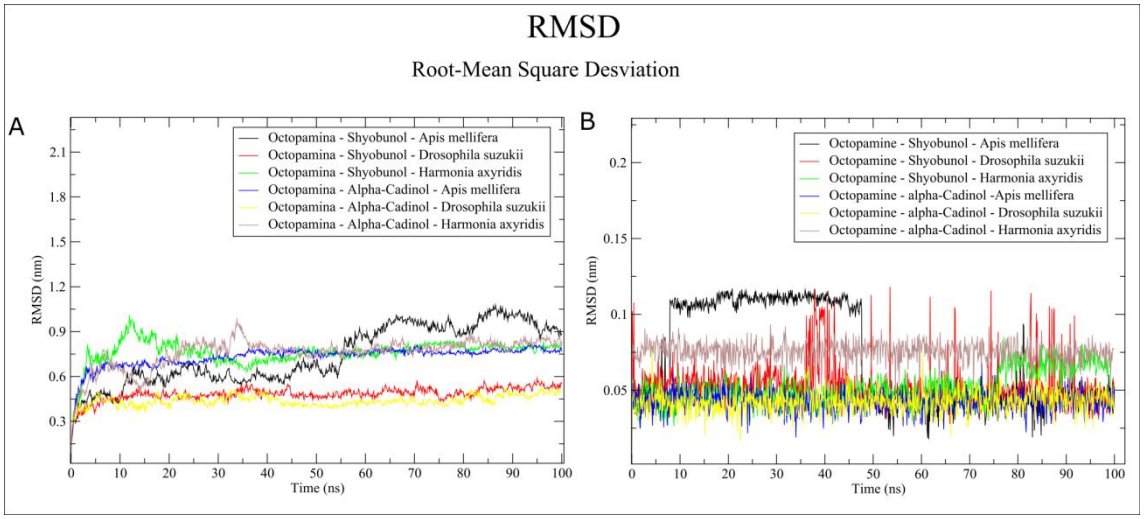

Fig 9. O desvio quadrático médio (RMSD) em nanômetros (nm) dos receptores de octopamina **A.** RMSD das estruturas dos receptores de octopamina de *D. suzukii* (shyobunol e α-cadinol em vermelho e amarelo, respectivamente) de *A. mellifera* (shyobunol e α-cadinol em preto e azul, respectivamente) e de *H. axyridis* (shyobunol e α-cadinol em verde e marrom, respectivamente) em função do tempo em nanossegundos. **B.** RMSD dos ligantes shyobunol e α-cadinol para os receptores de octopamina de *D. suzukii* (vermelho e amarelo), *A. mellifera* (preto e azul) e para *H. axyridis* (verde e marrom).

Os receptores de octopamina de *D. suzukii* exibiram os menores valores de RMSD (±0,45 nm) por todo o tempo de simulação (100 ns), tanto para o shyobunol quanto para o α-cadinol. Os complexos Octopamina-shyobunol de *H. axyridis* e *A. mellifera* exibiram um RMSD instável, demonstrando um desvio elevado ±0,75 e ±0,90 nm, respectivamente. E os complexos octopamina-α-cadinol dos mesmos organismos também apresentaram um RMSD acima de ±0,75 nm. Neste contexto, os receptores de octopamina de *D. suzukii* foram considerados as estruturas mais estáveis para os constituintes do OE.

Na **Fig 9.B** os RMSD do shyobunol demonstrou estável para o *H. axyridis* (±0,05 nm) em todo tempo de simulação. Para a *D. suzukii e A. mellifera* apresentou instabilidade durante os 100 ns variando muito seu desvio médio quadrático (0,05-0,1 nm e 0,05-0,12 nm, respectivamente). Esses resultados sugerem que o receptor de Octopamina de *D. suzukii* é um promissor alvo molecular para ação biopesticida de OEVC, demonstrando estabilidade conformacional e afinidade de ligação.

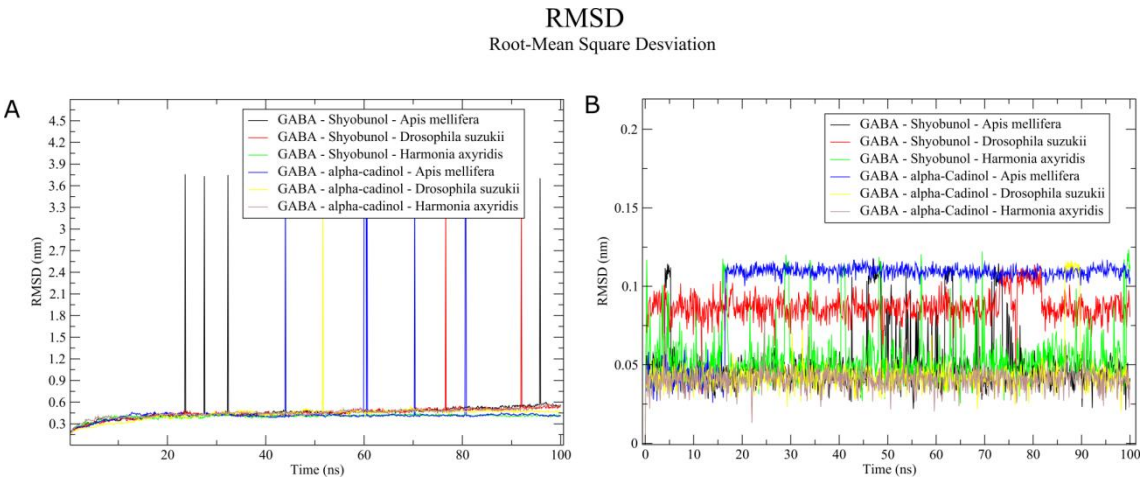

Fig 10. O desvio quadrático médio (RMSD) em nanômetros (nm) dos Receptores GABA **A.** RMSD das estruturas dos receptores GABA de *D. suzukii* (shyobunol e α-cadinol em vermelho e amarelo, respectivamente) de *A. mellifera* (shyobunol e α-cadinol em preto e azul, respectivamente) e de *H. axyridis* (shyobunol e α-cadinol em verde e marrom, respectivamente) em função do tempo em nanossegundos. **B.** RMSD dos ligantes shyobunol e α-cadinol para os receptores GABA de *D. suzukii* (vermelho e amarelo), *A. mellifera* (preto e azul) e para *H. axyridis* (verde e marrom).

Os receptores GABA exibiram um fenômeno conhecido como "*Pitfalls*" na dinâmica molecular. Esse fenômeno é conhecido pela condição periódica de contorno (PBC), que em uma simulação é criada várias caixas/células ao redor do sistema para aproximar um sistema infinitamente grande, evitando perda quando uma molécula atravessa as dimensões da caixa/célula. Portanto, os receptores GABA de *D. suzukii* (complexo GABA-shyobunol e α-cadinol) e *A. mellifera* (complexos GABA-shyobunol e α-cadinol) (**Fig 10.A**) sofreram desse fenômeno, resultando na interação das moléculas do receptor com sua imagem periódica (AMADEI et al., 2000; SHARMA et al., 2019; WASSENAAR e MARK, 2006) gerando esses picos extensos com mais de 3,6 nm de RMSD. Entretando o tempo que ocorre esse fenômeno é bem estreito, retornando ao seu desvio anterior, isso indica refazer a dinâmica desses complexos, com uma caixa de simulação maior, para evitar esse contato da imagem periódica que é considerada uma dinâmica não fisicamente restrita. Os complexos GABA-shyobunol e α-cadinol de *H. axyridis* (**Fig 10.A** cor verde e marrom) não sofreram desse fenômeno, apresentando um RMSD de ± 0,3 nm e ±0,5 nm, respectivamente. Não apresentando grande variações demonstrando uma estabilidade conformacional desses receptores.

O RMSD dos constituintes (**Fig 10.B**) com os receptores demonstram que os complexos GABA-α-cadinol de *D. suzukii* e *H. axyridis* foram mais estáveis (variando ± 0,05 nm). O complexo GABA-shyobunol de *D. suzukii* apresentou um RMSD maior, contudo constante durante a simulação (±0,09 nm). Além desse, o complexo GABA-shyobunol de *A. mellifera* e *H. axyridis* apresentaram um RMSD instável, variando

muito ao longo da simulação (± 0,05-0,12 nm). Desta forma, o complexo GABA-α-cadinol de *H. axyridis* exibiu maior estabilidade conformacional e de afinidade de interação.

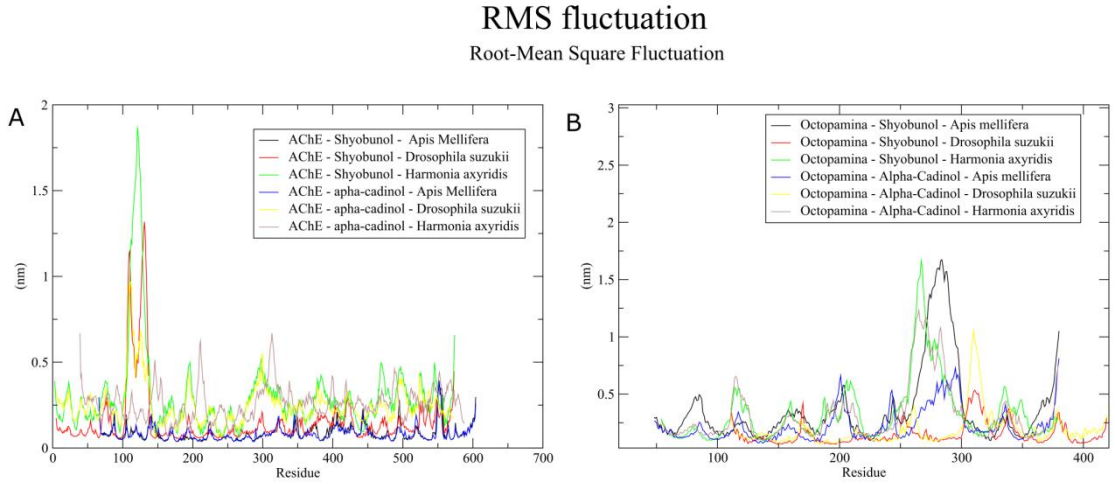

Fig 11. Desvio médio quadrático de flutuação dos resíduos da enzima AChE e receptor de octopamina **A.** RMSF das estruturas das enzimas AChE de *D. suzukii* (shyobunol e α-cadinol em vermelho e amarelo, respectivamente) de *A. mellifera* (shyobunol e α-cadinol em preto e azul, respectivamente) e de *H. axyridis* (shyobunol e α-cadinol em verde e marrom, respectivamente). **B.** RMSF dos resíduos do receptor de octopamina de de *D. suzukii* (vermelho e amarelo), *A. mellifera* (preto e azul) e para *H. axyridis* (verde e marrom).

O RMSF (*Root-Mean Square Fluctuation*) visou observar as mudanças conformacionais relacionados aos resíduos de aminoácidos dos receptores e enzimas dos organismos alvo e não-alvo. As flutuações médias foram calculadas para compreender o deslocamento durante a trajetória e se os constituintes do OE interferiram nas oscilações desses resíduos. Assim, na **Fig 11. A**, observou os complexos AChE-shyobunol (linha vermelha) e α-cadinol (linha amarela) de *D. suzukii* que a tríade catalítica responsável pela atividade enzimática da AChE, resíduos SER^{238}, HIS^{480}, GLU^{367} exibiram um desvio abaixo de 0,10-0,15 nm, respectivamente, demonstrando oscilações leves com correlações significativas. Contudo, a partir do resíduo 108-137 apresentou o maior RMSF dos complexos, com valores superiores a 0,9 nm, assim como ocorreu com o complexo AChE-shyobunol (linha verde) de *H. axyridis* (> 1,5 nm), devido à sua configuração em forma de loop, a região é reconhecida por apresentar altas flutuações. De forma similar, os complexos AChE-shyobunol e α-cadinol (linha preta e azul, respectivamente) de *A. mellifera* a tríade SER^{263}, HIS^{504} e GLU^{389} também exibiram um RMSF abaixo de ± 0,08 nm. Por outro lado, a tríade SER^{238}, HIS^{480}, GLU^{367} dos complexos AChE- shyobunol e α-cadinol de *H. axyridis* exibiram um desvio de flutuação de 0,2-0,3 nm, respectivamente.

Na **Fig 11.B**, observou os complexos Octopamina-shyobunol e α-cadinol de *D. suzukii* e a flutuação dos resíduos do sítio ativo (PHE^{266}, LYS^{267}, PHE^{366}, TYR^{370}, SER^{373}, ILE^{380}, ARG^{383}, VAL^{386}, GLY^{387}, PHE^{390}), demonstraram um desvio médio de 0,1-0,2 nm, respectivamente. Além disso, o complexo Octopamina-shyobunol e α-cadinol de *A. mellifera* apresentou um desvio médio de 0,14-0,22 nm, respectivamente e seus resíduos são PHE^{211}, GLN^{212}, PHE^{323}, TYR^{327}, THR^{330}, SER^{341}, ALA^{344}, PHE^{347}. Por fim, os complexos Octopamina-shyobunol e α-cadinol de *H.axyridis* exibiram o maior RMSF dentre os complexos 0,25-0,38 nm, respectivamente.

Isso demonstra como o comportamento dinâmico dos complexos interferem nas oscilações dos aminoácidos dos receptores e das enzimas. Esses resultados sugerem que os complexos AChE-shyobunol e α-cadinol de *D. suzukii* e *A. mellifera* não apresentaram diferenças significativas em relação aos valores de flutuação dos resíduos da tríade, entretanto, são flutuações leves que demonstram estabilidade da ligação proteína-ligante, principalmente por estar inserido em um sistema em membrana. De forma similar, todos os complexos Octopamina e os constituintes do OE também demonstraram estabilidade de ligação com os resíduos do sítio ativo, oscilando abaixo de 0,3 nm.

3.3.4 Mecânica Molecular/Área de Superfície de Poisson-Boltzmann (MM/PBSA)

Foi realizado o cálculo de energia livre de ligação ΔG_{bind} utilizando o script do gmxMMPBSA para os complexos proteína-ligante dos organismos alvo e não-alvo. Os complexos do receptor de octopmaina de *D. suzukii* (**1**) e (**2**) exibiram o menor valor de ΔG_{bind} (-20,74 ± 2.53 e -20,45 ± 3.08 Kcal/mol, respectivamente), comparados com os complexos dos organismos não alvo (**3**)**,** (**4**)**,** (**5**) e (**6**) (Tabela 3). O valor negativo de ΔG indicou um processo espontâneo entre o receptor e o ligante. As contribuições dos componentes internos (energia ligada e não ligada = ΔG_{GAS} -34 Kcal/mol) foram fundamentais para a espontaneidade da energia de ligação dos complexos. As contribuições na entropia conformacional (-TΔS) indicou que os sistemas apresentaram um pequeno valor de desordem (6,37 e 7,11 Kcal/mol, respectivamente) indicando um processo de organização conformacional, comparado aos complexos dos organismos não alvo.

Tabela 3. Cálculos MM-PBSA da energia livre de ligação para os complexos dos organismos *alvo (D. suzukii)* e não alvos *(A. mellifera e H. axyridis).*

Ordem	Complexo	ΔG_{solv} (kcal/mol)	ΔG_{Gas} (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG_{bind} (kcal/mol)	Desvio padrão
	Receptor de Octopamina					
1	Octop/shyobunol *(D. suzukii)*	6.66	-34.51	7.11	-20.74*	± 2.53
2	Octop/α-Cadinol (*D. suzukii)*	7.51	-34.33	6.37	-20.45*	± 3.08
3	Octop/shyobunol *(A. mellifera)*	14.32	-26.48	9.13	-3.04	± 2.74
4	Octop/α-Cadinol (*A. mellifera)*	16.06	-36.04	6.03	13.95	± 2.21
5	Octop/shyobunol *(H. axyridis)*	5.64	-9.35	17.40	13.69	± 3.57
6	Octop/α-Cadinol (*H. axyridis)*	14.82	-34,16	6.81	-12.53	± 2.68
	AChE (Acetylcholinesterase)					
7	AChE/shyobunol *(D. suzukii)*	22.64	-36.56	14.93	1.01	± 3.57
8	AChE/α-Cadinol (***D. suzukii)***	19.95	-43.55	8.91	-14.70	± 3.96
9	AChE/shyobunol *(A. mellifera)*	35.11	-46.96	10.18	-1.68	± 2.41
10	AChE/α-Cadinol (***A. mellifera)***	14.79	-36,07	8.05	-13.23	± 2.14
11	AChE/shyobunol *(H. axyridis)*	21.11	-32.73	7.67	-3.95*	± 3.05
12	AChE/α-Cadinol (*H. axyridis)*	11.85	-36.57	7.59	-17.12*	± 2.63
	Receptor GABA					
13	GABA/shyobunol *(D. suzukii)*	11.55	-28.07	16.55	0.02	± 8.97
14	GABA/α-Cadinol (*D. suzukii)*	7.16	-25.04	22.81	4.93	± 4.66
15	GABA/shyobunol *(A. mellifera)*	11.29	-35.63	9.69	-14.65*	± 3.54
16	GABA/α-Cadinol (*A. mellifera)*	8.35	-31.20	24.99	2.14	± 4.27
17	GABA/shyobunol *(H. axyridis)*	5.68	-20.34	10.81	-3.84	± 2.27
18	GABA/α-Cadinol (*H. axyridis)*	8.00	-23.03	12.72	-2.30*	± 3.78

* Melhores ligantes (menor valor de energia de ligação em Kcal/mol)

O complexo do receptor GABA (**15**) de *A. mellifera* exibiu o menor valor de ΔG_{bind} = -14,65 ± 3.54 kcal/mol. Esse valor é indicativo de uma interação favorável entre o receptor e o shyobunol. Os valores de ΔG_{gas} demonstra que a energia que mais contribui para a interação, compensada parcialmente pela solvatação (ΔG_{solv}). A entropia ($-T\Delta S$= 9,69) demonstrou o menor valor entre os demais complexos (**13, 14, 16, 17** e **18**) atribuindo uma menor liberdade e movimento das moléculas. Os complexos GABA (**17**) e (**18)** demonstraram valores moderadamente negativos, sugerindo uma interação razoavelmente favorável, isso devido ao aumento dos valores de entropia. Entretanto, os complexos (**13**), (**14**) e (**16**) exibiram um valor ΔG_{bind} positivos, sugerindo uma interação desfavorável entre os receptores GABA e os ligantes das espécies analisadas nesses complexos. Essa contribuição energeticamente desfavorável

é causada pelo aumento da entropia conformacional, sugerindo que esses complexos apresentaram aumento significativo da liberdade das moléculas.

Os complexos para as enzimas AChE (**8**) (**10**) e (**12**) demonstraram um valor de ΔG_{bind} bastante negativo (-14,70 ± 3.96, -13,23 ± 2,14 e -17,12 ± 2,63, respectivamente), referente ao composto α-cadinol. Isso demonstra que o composto apresenta uma afinidade significativa com essa enzima. Além disso, as contribuições entrópicas também foram menores comparadas aos complexos (**7**), (**9**) e (**11**).

3.4 Conclusão

Nestes estudos sugerimos que os Receptores de octopamina são alvos promissores responsáveis pela atividade bioinseticida de *D. suzukii* para os constituintes shyobunol e α-cadinol do óleo essencial de *V. curassavica* Jacq. Nossos resultados *in silico* para esse receptor de *D. suzukii* demonstraram as menores energias de interação no procedimento de *docking* molecular, os menores RMSD e RMSF entre os organismos não-alvo, e por fim, as menores energias de ligação ΔG_{bind} nas análises de MMPBSA. Entretanto, os demais alvos proteicos não são totalmente descartados, devido a importância fisiológica dos insetos e de interação metabólica desses constituintes e também a contribuição sinérgica que podem realizar na prática. Estes resultados indicam que o OE de *V. curassavica* Jacq. é promissor para o desenvolvimento de novos biopesticidas, principalmente pela seletividade contra insetos praga e biossegurança para organismos não alvo, fornecendo informações para futuros trabalhos de modificações estruturais e manejo e controle sustentável de pragas agrícolas.

3.5 Referências

AMADEI, A. et al. Molecular dynamics simulations with constrained roto-translational motions: theoretical basis and statistical mechanical consistency. **The Journal of Chemical Physics**, v. 112, n. 1, p. 9-23, 2000.

ANDRADE, Fernanda Pereira et al. Toxicity of *Varronia curassavica* Jacq. essential oil to two arthropod pests and their natural enemy. **Neotropical Entomology**, v. 50, n. 5, p. 835-845, 2021.

BARUA, Archita; WILLIAMS, Christopher D.; ROSS, Jenna L. A literature review of biological and bio-rational control strategies for slugs: current research and future prospects. **Insects**, v. 12, n. 6, p. 541, 2021.

Bristot, S. F., Colle, M. P. D., Rossato, A. E., & Citadini-Zanette, V. (2021). Uso medicinal de *Varronia curassavica* Jacq. "erva-baleeira" (Boraginaceae): estudo de caso no sul do Brasil / Medicinal use of *Varronia curassavica* Jacq. "erva-baleeira" (Boraginaceae): case study in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, 4(1), 170–182.

CHEN, Runtian et al. Cloning and functional expression of a Drosophila gamma-aminobutyric acid receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 13, p. 6069-6073, 1994.

CORRÊA, Eduardo José Azevedo et al. Elucidating the molecular mechanisms of essential oils' insecticidal action using a novel cheminformatics protocol. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 4598, 2023.

COSTA, Lucio G. et al. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 13, n. 4, p. 1240-1249, 2008.

DE CASTRO NIZIO, Daniela Aparecida et al. Chemical diversity of native populations of *Varronia curassavica* Jacq. and antifungal activity against Lasiodoplodia theobromae. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 437-448, 2015.

EL-KHOLY, Samar Ezzat et al. Octopamine signaling via OctαR is essential for a well-orchestrated climbing performance of adult Drosophila melanogaster. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 14024, 2022.

ENDE, A. R. Pseudo-replication revisited. **Ecological Applications**, v. 3, n. 3, p. 545-547, 1993.

FELSZTYNA, Iván et al. Insect RDL Receptor Models for Virtual Screening: Impact of the Template Conformational State in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. **ACS omega**, 2022

FINNEY, D. J. Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. **Cambridge University Press**, 1971.

GAO, Ya et al. Exploring the interaction mechanism of desmethyl-broflanilide in insect GABA receptors and screening potential antagonists by in silico simulations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 50, p. 14768-14780, 2020.

GASPARINO, Eduardo Custódio; BARROS, Maria Amélia Vitorino da Cruz. Palinotaxonomia das espécies de Cordiaceae (Boraginales) ocorrentes no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Botany**, v. 32, p. 33-55, 2009.

GIRON, David et al. Promises and challenges in insect–plant interactions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 166, n. 5, p. 319-343, 2018.

GUO, Lei et al. An octopamine receptor confers selective toxicity of amitraz on honeybees and Varroa mites. **Elife**, v. 10, p. e68268, 2021.

HOOFT, Rob WW; SANDER, Chris; VRIEND, Gerrit. Objectively judging the quality of a protein structure from a Ramachandran plot. **Bioinformatics**, v. 13, n. 4, p. 425-430, 1997.

JANKOWSKA, Milena et al. Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system—A review. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 34, 2017.

JAYAPRAKAS, C. A.; TOM, Joseph; SREEJITH, S. Impact of Insecticides on Man and Environment. In: **Biomedical Applications and Toxicity of Nanomaterials**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. p. 751-768.

KALYABINA, Valeriya P. et al. Pesticides: formulants, distribution pathways and effects on human health–a review. **Toxicology reports**, v. 8, p. 1179-1192, 2021.

KHATER, Hanem Fathy. Ecosmart biorational insecticides: alternative insect control strategies. **Insecticides-Advances in Integrated Pest Management**, p. 17-60, 2012.

MANTILLA AFANADOR, Javier G. et al. Novel lactone-based insecticides and *Drosophila suzukii* management: synthesis, potential action Mechanisms and selectivity for non-target parasitoids. **Insects**, v. 14, n. 8, p. 697, 2023.

NAIR, KS Sadasivan. Tropical forest insect pests: ecology, impact, and management. **Cambridge University Press**, 2007.

PAINE, R. T. The case for top-down control of invertebrate populations. **Ecological Entomology**, v. 21, n. 3, p. 290-292, 1996.

PARK, Chung Goo et al. Insecticidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of Lamiaceae plant essential oils and their major components against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Industrial crops and products**, v. 89, p. 507-513, 2016.

PICKETT, Charles Hammond; BUGG, Robert Lyman (Ed.). Enhancing biological control: habitat management to promote natural enemies of agricultural pests. **Univ of California Press**, 1998.

POVEDA, J. A. et al. Lipid modulation of ion channels through specific binding sites. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1838, n. 6, p. 1560-1567, 2014.

QI, Yi-xiang et al. A new Drosophila octopamine receptor responds to serotonin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 90, p. 61-70, 2017.

RAMOS MELO, Elisa et al. In vivo elicitation is efficient in increasing essential oil yield with high anti-inflammatory sesquiterpene content in *Varronia curassavica* Jacq. **Chilean journal of agricultural research**, v. 83, n. 3, p. 369-379, 2023.

RAMOS MELO, Elisa et al. In vivo elicitation is efficient in increasing essential oil yield with high anti-inflammatory sesquiterpene content in *Varronia curassavica* Jacq. **Chil. j. agric. res.**, Chillán, v. 83, n. 3, p. 369-379, jun. 2023.

ROEDER, T. Octopamine in invertebrates. **Progress in neurobiology**, v. 59, n. 5, p. 533-561, 1999.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT 9.2 user's guide. **SAS Institute**, 2008.

SHARMA, S. et al. Overview of BIOVIA Materials Studio, LAMMPS, and GROMACS; Molecular Dynamics Simulation of Nanocomposites Using BIOVIA Materials Studio, LAMMPS and GROMACS. 2019.

SHEIK, S. S. et al. Ramachandran plot on the web. **Bioinformatics**, v. 18, n. 11, p. 1548-1549, 2002.

SOUZA, Michele Trombin de et al. Essential Oils as a Source of Ecofriendly Insecticides for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) and Their Potential Non-Target Effects. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6215, 2022.

STUDER, Gabriel et al. QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. **Bioinformatics**, v. 36, n. 6, p. 1765-1771, 2020.

TONELLI, Michele et al. Pharmacophore modeling, resistant mutant isolation, docking, and MM-PBSA analysis: combined experimental/computer-assisted approaches to identify new inhibitors of the bovine viral diarrhea virus (BVDV). **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 18, n. 6, p. 2304-2316, 2010.

TRAILL, Lochran W. et al. Mechanisms driving change: altered species interactions and ecosystem function through global warming. **Journal of Animal Ecology**, v. 79, n. 5, p. 937-947, 2010.

VERLINDEN, Heleen et al. The role of octopamine in locusts and other arthropods. **Journal of insect physiology**, v. 56, n. 8, p. 854-867, 2010.

WASSENAAR TA, MARK AE. The effect of box shape on the dynamic properties of proteins simulated under periodic boundary conditions. **J Comput Chem.** 2006 Feb;27(3):316-25.

YU, Liyang et al. Genome-wide identification, evolution and transcriptome analysis of GRAS gene family in Chinese chestnut (Castanea mollissima). **Frontiers in Genetics**, v. 13, p. 1080759, 2023.

CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho cooperou para a compreensão da atividade biopesticida dos óleos essenciais de *Varronia curassavica* Jacq. e seus possíveis mecanismos de ação por estudos *in silico* com alvos importantes para fisiologia do inseto-praga *Drosophila suzukii* e organismos não-alvo. Além disso, contribuiu para o desenvolvimento de uma revisão tratando sobre a utilização de ferramentas de bioinformática para o desenvolvimento biorracional de pesticidas contra *Drosophila suzukii.* A espécie *Varronia curassavica* Jacq. demonstrou dois compostos majoritários previamente descritos para a espécie, os constituintes shyobunol (± 23.61%, ± 21.79%) e α-cadinol (± 7.29%, ± 6.87%).

Os testes toxicológicos revelaram que esse OE apresentou um efeito letal contra a espécie praga *Drosophila suzukii*, matando mais de 95% da população, e não apresentou nenhum efeito subletal em organismos não-alvo como abelhas (i.e., *Apis mellifera* e *Partamona helerri*) e joaninhas (i.e., *Coleomegilla maculata* e *Eriopis connexa*). Este trabalho também apresentou estudos *in silico* demonstrando um potencial interação dos constituintes majoritários do OE com alvo molecular (i.e., Receptor de octopamina) importante para o inseto-praga, com melhor interação intermolecular e menor energia livre entre os alvos analisados.

Desta forma, podemos concluir que este trabalho contribuiu para o desenvolvimento de futuros novos pesticidas biorracionais seletivos contra *D. suzukii* e além disso, futuros teste *in vivo* com compostos isolados, síntese de compostos melhorados quimicamente que podem ser novos caminhos para essa área. Vale ressaltar, que as contribuições da espécie *Varronia curassavica* Jacq. coletada na caatinga/semiárido brasileiro destaca-se como fonte rica em potenciais metabólitos de interesse.