

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL APLICADAS

Validação de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para estudos relacionados à ingestão de óleos essenciais de lavanda (*Lavandula angustifolia*), gengibre (*Zingiber officinale*) e copaíba (*Copaifera reticulata, officinalis, coriacea e langsdorffii*)

Lucas Matos Martins Bernardes

Uberlândia – MG

Janeiro – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL APLICADAS

Validação de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para estudos relacionados à ingestão de óleos essenciais de lavanda (*Lavandula angustifolia*), gengibre (*Zingiber officinale*) e copaíba (*Copaifera reticulata, officinalis, coriacea e langsdorffii*)

Lucas Matos Martins Bernardes

Prof. Dr. Murilo Vieira da Silva

Orientador

Dissertação apresentada à coordenação do curso de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Uberlândia – MG

Janeiro – 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B522v
2022 Bernardes, Lucas Matos Martins, 1995-
Validação de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para estudos relacionados à ingestão de óleos essenciais de lavanda (*Lavandula angustifolia*), gengibre (*Zingiber officinale*) e copaíba (*Copaifera reticulata, officinalis, coriacea* e *langsdorffii*) [recurso eletrônico] / Lucas Matos Martins Bernardes. - 2022.

Orientador: Murilo Vieira da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.8053>

Inclui bibliografia.

1. Microbiologia. I. Silva, Murilo Vieira da, 1988-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
 Aplicadas

Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico , número 01/2022, do PPGBC				
Data:	28/01/2022	Hora de início:	09:09h	Hora de encerramento:	11:10h
Matrícula do Discente:	11922BCE004				
Nome do Discente:	Lucas Matos Martins Bernardes				
Título do Trabalho:	Toxicidade de óleos essenciais de lavanda (<i>Lavandula angustifolia</i>), gengibre (<i>Zingiber officinale</i>) e copaíba (<i>Copaifera reticulata</i> , <i>C. officinalis</i> , <i>C. coriacea</i> e <i>C.langsdorffii</i>) em modelo de <i>Drosophila melanogaster</i>				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biologia Celular de Doenças Infecciosas e Degenerativas				
Projeto de Pesquisa de vinculação:					

Reuniu-se, de forma Virtual, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, da Universidade Federal de Uberlândia, assim composta: **Dr. Jéssica Regina da Costa Silva – UFU; Profa. Dra. Yris Maria Fonseca Bazzo – UnB e Prof. Dr. Murilo Vieira da Silva;** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, **Prof. Dr. Murilo Vieira da Silva**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Yris Maria Fonseca Bazzo, Usuário Externo**, em 28/01/2022, às 16:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jéssica Regina da Costa Silva, Usuário Externo**, em 28/01/2022, às 18:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Murilo Vieira da Silva, Médico(a) Veterinário(a)**, em 28/01/2022, às 18:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Romualdo Morandi Filho, Usuário Externo**, em 24/02/2022, às 10:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3330840** e o código CRC **338E42C3**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL APLICADAS

Validação de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para estudos relacionados à ingestão de óleos essenciais de lavanda (*Lavandula angustifolia*), gengibre (*Zingiber officinale*) e copaíba (*Copaifera reticulata, officinalis, coriacea e langsdorffii*)

Lucas Matos Martins Bernardes

Aprovação pela banca examinadora em: ___/___/____ Nota: _____

Assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, ___ de _____ de _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Núbia Regina Matos Bernardes** e **Mauricio Martins Bernardes**, à minha avó, **Dina Regina de Oliveira Matos**, tias, **Emerenciana Aparecida de Matos** e **Keila Regina Matos Ribeiro**, e irmãs, **Amanda Matos Martins Bernardes** e **Giovanna Matos Martins Bernardes**, por toda confiança depositada em mim, pelo amor e, principalmente, pelo apoio oferecidos durante toda essa etapa.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à **Universidade Federal de Uberlândia (UFU)**, por oferecer a infraestrutura necessária para a realização desse trabalho.

Agradeço também ao meu orientador, **Prof. Dr. Murilo Vieira da Silva**, por sempre me oferecer todo apoio e incentivos necessários para a conclusão desta etapa e por sempre acreditar no meu potencial. Foi um prazer imenso ter sido seu orientando, aprendi muita coisa com você. Obrigado por dividir sua experiência comigo.

À minha amiga de curso, de mestrado, de doutorado (eu espero!) e da vida, **Serena Mares Malta**, por ter sido a melhor companhia que eu poderia ter durante esses dois anos. Eu já disse isso, mas vou repetir: sem o seu apoio, eu provavelmente não teria conseguido. Em diversos momentos em que nem eu estava acreditando na minha capacidade, você me dava um dos seus tapas com luva de pelica e mostrava que eu era capaz sim. Você, mais do que amiga foi exemplo em muitos momentos, inspiração, como pessoa e como pesquisadora. Acho que se eu escrevesse 70 páginas de agradecimentos, ainda não seria o suficiente para descrever o quão importante você foi para mim nesse período. Sério, obrigado por tudo! Quando eu crescer, quero ser igual a você.

Aos **membros do Biotério e do Laboratório da Genética** da UFU, em especial ao **Prof. Carlos Ueira-Vieira**, por sempre me estenderem a mão quando eu precisei, sempre dividindo conhecimentos, experiências e até momentos de descontração, que numa época estressante como essa do mestrado, são muito importantes.

Por fim, um agradecimento aos meus **amigos de fora da UFU** (muitos para listar, desculpa!), principalmente à **Nicolle Mascarenhas Torres Mendes e Silva**. Vocês aguentaram inúmeros momentos de surto, de choro, de desespero e sempre me deram todo carinho e apoio do mundo. Amo vocês demais, obrigado por terem feito parte disso tudo.

*hey look ma, I made it
everything's comin' up aces
if it's a dream, don't wake me*

(Panic! at the Disco – Hey Look Ma, I Made It)

RESUMO

Com o aperfeiçoamento das técnicas de desenvolvimento de drogas ao longo dos anos, grandes empresas têm tido cada vez mais interesse na produção de fármacos a partir de produtos naturais. Os óleos essenciais – exemplos de produtos naturais – são misturas de diversos compostos que podem ser extraídos de diferentes partes das plantas (caule, folhas, flores etc.). Os óleos essenciais de copaíba, gengibre e lavanda possuem atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas que podem ser de interesse médico e, considerando que a composição destes óleos é muito variável, até mesmo dentro de uma mesma espécie de planta, são necessários mais estudos para entender qual a forma mais segura de utilização destes óleos e os riscos que a ingestão de uma superdosagem deles traria. Uma das formas de se conduzir esses estudos é através da utilização de um organismo modelo, neste caso, a *Drosophila melanogaster*. Neste estudo, moscas da linhagem *w¹¹¹⁸* foram expostas a doses seguras e tóxicas destes óleos essenciais com objetivo de avaliar possíveis alterações comportamentais e morfofisiológicas em seus cérebros e intestinos. Identificou-se que a exposição a doses seguras desses óleos não levou a alterações comportamentais ou no intestino e cérebro desses animais, enquanto uma intoxicação por estes óleos causou neurodegeneração e perda da estrutura do fígado, levando à debilitação no comportamento de escalada das moscas. Estes resultados indicam que a *D. melanogaster* é um bom organismo modelo para pesquisas relacionados à ingestão de óleos essenciais, sendo necessários mais testes para avaliar a atividade terapêutica destes óleos em doenças humanas ainda sem cura ou tratamento.

Palavras-chave: produtos naturais; óleos essenciais; *Drosophila melanogaster*

ABSTRACT

Throughout the years, techniques used for drug development were refined, increasing the interest of big pharmaceutical companies in the production of new drugs from natural products. Essential oils – examples of natural products – are mixtures of compounds that can be extracted from different parts of plants (stem, leaves, flowers etc.). Essential oils extracted from copaiba, ginger and lavender are known for their anti-inflammatory, antioxidant, and antibiotic activities and, considering the composition of essential oils can vary immensely, even between plants from the same species – there is a necessity to better understand what the better way is to use these essential oils through ingestion and the risks that an overdose could bring. A way of studying these effects is using a model organism, in this case, *Drosophila melanogaster*. In the present study, flies from the w^{1118} stock were exposed to safe doses and overdoses of these essential oils, to evaluate possible behavioral or morphophysiological changes in these animals' organs. Results indicate that, when exposed to safe doses of the essential oils, there were no alterations on behavior nor the structure of the brain and intestine of the animals. However, when they are exposed to overdoses of the oils, flies have a debilitated climbing behavior and presented signs of neurodegeneration and loss of structure of their intestine. These results indicate that *D. melanogaster* is a great model organism for research related to the use of essential oils through ingestion, with more studies being necessary to understand their possible therapeutic activities of these oils in human diseases that still does not have a cure or treatment.

Keywords: natural products; essential oils; *Drosophila melanogaster*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Teste de sobrevivência para diferentes concentrações dos óleos essenciais.	12
Figura 2. Resultados do teste de escalada para as concentrações seguras de OEs.	14
Figura 3. Resultados do teste de escalada para as concentrações tóxicas de OEs.	15
Figura 4. Análise histológica do cérebro de moscas <i>w¹¹¹⁸</i> expostas à dose segura de óleos essenciais de copaíba, gengibre e lavanda.	16
Figura 5. Análise histológica do intestino de moscas <i>w¹¹¹⁸</i> expostas à dose segura de óleos essenciais de copaíba, gengibre e lavanda.	16
Figura 6. Análise histológica do cérebro de moscas <i>w¹¹¹⁸</i> expostas à superdosagem de óleos essenciais de copaíba, gengibre e lavanda.	17
Figura 7. Seções histológicas do intestino de moscas <i>w¹¹¹⁸</i> expostas à superconcentração de OEs de copaíba, lavanda e gengibre.	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PNs	Produtos Naturais
OEs	Óleos Essenciais

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Produtos naturais.....	1
1.2 Óleos essenciais.....	2
1.3 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo para estudos de toxicidade.....	5
2. OBJETIVOS	6
3. METODOLOGIA	7
3.1 Linhagem de <i>Drosophila melanogaster</i> utilizada e manutenção dos animais.....	7
3.2 Óleos essenciais utilizados.....	8
3.3 Teste de toxicidade e determinação de dose para tratamento.....	8
3.4 Teste de escalada (<i>RING test</i>).....	9
3.5 Análise histológica.....	10
3.6 Análises estatísticas.....	10
4. RESULTADOS	11
4.1. A toxicidade dos óleos essenciais é diretamente relacionada à concentração destes no alimento.....	11
4.2. A ingestão de óleos essenciais em dose segura não altera o comportamento das moscas, enquanto, em dose tóxica, leva a uma escalada menor dos animais.....	12
4.3 A superdosagem de OEs pode levar a danos no cérebro e no intestino, enquanto a dose segura não provoca alterações nestes órgãos.....	15
5. DISCUSSÃO	18
6. CONCLUSÃO	21
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
8. APÊNDICES E ANEXOS	30
Anexo A - Perfil cromatográfico do óleo essencial de copaíba.....	30
Anexo B - Perfil cromatográfico do óleo essencial de gengibre.....	33
Anexo C - Perfil cromatográfico do óleo essencial de lavanda.....	35

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais

O homem já utiliza substâncias naturais para fins medicinais há bastante tempo. Em especial, produtos derivados de plantas têm um papel muito importante na medicina de diversas culturas diferentes. O avanço da química no começo do século 19 tornou possível examinar amostras de plantas com mais precisão, tornando possível a identificação e uso de constituintes bioativos presentes nelas. Um exemplo clássico deste uso é a descoberta da morfina por Sertürner, em 1804, isolada da papoula (BEUTLER, 2019).

Os produtos naturais (PNs) possuem diversas características diferentes das moléculas sintéticas, dando a estes tanto vantagens quanto desvantagens no sentido de descobrimento de novas drogas. Uma das vantagens é o fato de os PNs serem estruturalmente otimizados para servir funções biológicas específicas nas plantas, como mecanismos de defesa secundários e a interação com outros organismos, o que explicaria o seu interesse para tratamento de doenças como câncer ou infecções. Por outro lado, a complexidade estrutural desses compostos torna mais difícil a aplicação de algumas técnicas da área de descobrimento de drogas – por falta de compatibilidade entre as técnicas e o material – para isolar os compostos bioativos dos extratos dessas plantas (ATANASOV et al., 2021).

Esta dificuldade em isolar compostos bioativos dos PNs afastou por muito tempo as empresas farmacêuticas de pesquisas para desenvolvimento de drogas a partir deles. Alguns dos pontos que levaram a isso são a demora pra se isolar o composto bioativo a partir do extrato da planta de interesse, visto que são diversas etapas de separação e são necessários testes de atividade biológica para cada etapa; a dificuldade no reabastecimento da matéria-prima e, conseqüentemente, de se obter uma grande quantidade do material; a síntese dos compostos naturais é muito complicada devido à complexidade de suas estruturas; e, finalmente, alguns

países, como os Estados Unidos, não permitem a criação de uma patente originária de um produto natural (ATANASOV et al., 2021; BEUTLER, 2019).

Ao longo dos anos, com o avanço e aperfeiçoamento das técnicas utilizadas com finalidade de descobrir novas drogas, como inteligência artificial, o uso dos chamados “*organ-on-chip*” e tecnologia microfluídicas, a velocidade para isolamento de compostos, realização dos testes de avaliação de segurança, farmacocinética e eficácia, enquanto abre novas portas para o desenvolvimento de drogas a partir de produtos naturais, o que despertou novamente o interesse de grandes empresas no desenvolvimento de drogas a partir destes produtos (THOMFORD et al., 2018).

1.2 Óleos essenciais

Óleos essenciais (OEs) são misturas de hidrocarbonetos saturados e insaturados, álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, fenóis e terpenos, produzidos por plantas aromáticas como metabólitos secundários. Estão presentes em todos órgãos das plantas e apresentam como principal função a de defesa da planta contra bactérias, fungos, vírus e insetos, sendo usualmente extraídos a partir de partes das plantas (folhas, caules, flores) através de destilação à vapor (ALI et al., 2015; RAMSEY et al., 2020; SPISNI et al., 2020).

Apesar de os estudos acerca dos óleos essenciais terem se tornado mais frequente no século XX, quando o termo “aromaterapia” foi cunhada pelo químico francês René-Maurice Gattefossé, há registros do uso desses óleos como agentes medicinais no Egito antigo (KOYAMA; HEINBOCKEL, 2020).

A palavra “aromaterapia” se refere a qualquer tratamento que utiliza como principal terapêutico um óleo essencial, podendo ser dividida em quatro categorias: cosmética, médica, olfatória e psico-aromaterapia (ALI et al., 2015).

A aromaterapia cosmética descreve o uso de óleos essenciais em produtos utilizados na pele do corpo e do rosto e cabelo. Neste caso, os OEs têm função hidratante, tonificante, limpante e secante. Já a psico-aromaterapia é caracterizada pelo uso de fragrâncias em geral – sejam elas naturais, como os OEs, ou sintéticas – com intuito de prover sensações prazerosas às pessoas, como relaxamento, revigoramento ou através de uma lembrança positiva (ALI et al., 2015).

Para o presente estudo, as áreas de interesse da aromaterapia são a aromaterapia olfatória e a aromaterapia médica. A aromaterapia olfatória, ou olfativa, descreve o uso dos óleos essenciais através da sua inalação, levando em uma melhora emocional, variando de acordo com o OE utilizado. Estudos utilizando diferentes óleos essenciais pela via da inalação, com uso de difusores, mostraram que o OE de lavanda (*Lavandula angustifolia*) reduziu a memória de trabalho e tempo de reação dos indivíduos, enquanto o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) gerou um resultado oposto, melhorando a performance do grupo (MOSS et al., 2003).

Resultados similares foram observados em um estudo comparativo dos óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e ylang-ylang (*Cananga odorata*). Enquanto o primeiro deixou o grupo testado mais alerta, o segundo melhorou o sentimento de calma e aumentou o tempo de reação dos indivíduos. Estes resultados sugerem que óleos como o de ylang-ylang e de lavanda são mais indicados para relaxamento, enquanto os de alecrim e hortelã-pimenta seriam melhor utilizados em momentos em que é necessário um aumento de produtividade (MOSS et al., 2008).

Já a aromaterapia médica se refere ao uso dos óleos essenciais no tratamento de quadros clínicos, como inflamações (ABOUTALEB et al., 2019; CSIKÓS et al., 2020; QU et al., 2020) e distúrbios psicológicos (DONELLI et al., 2019; KARIMZADEH et al., 2021; ZAMANIFAR

et al., 2020), por exemplo, podendo este ser feito por inalação ou através de outras vias de uso. No entanto, é importante citar os OEs, dependendo do caso, nunca poderão ser substitutos dos medicamentos, apenas um tratamento auxiliar (ALI et al., 2015). Os óleos essenciais de gengibre (*Zingiber officinale*), copaíba (*Copaifera sp.*) e lavanda são potenciais agentes terapêuticos para uso na aromaterapia médica, tendo em vista recentes estudos que os testaram como possíveis agente medicinais para diferentes quadros clínicos devido as suas ações antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas (ABOUTALEB et al., 2019; AKINYEMI et al., 2018; CAPUTO et al., 2020; CARDIA et al., 2018; JUNIOR et al., 2018; RASHIDIAN et al., 2014).

Além da via inalatória, como exemplificada acima, os óleos essenciais podem ser utilizados por outras duas vias: tópica e através da ingestão. Independente da via, a ação dos OEs é baseada na interação entre suas moléculas e receptores do sistema olfatório, visto que já foram encontradas evidências da presença destes receptores em outros órgãos que não os do sistema respiratório, como a pele (BUSSE et al., 2014), o coração (KIM et al., 2015), os testículos (FUKUDA et al., 2004) e o intestino (FLEISCHER et al., 2015). Nestes casos, os receptores não atuam na sensibilidade a odores, mas sim na quimiotaxia dos órgãos, no ajuste de pressão sanguínea e no estímulo para secreção de hormônios e enzimas (KOYAMA; HEINBOCKEL, 2020).

Considerando que a composição destes óleos é muito variável – pode ser diferente dentro de uma mesma espécie de planta, dependendo das condições em que cresceu (latitude, estação do ano, tipo de solo e condições agrícolas) – ainda são necessários muitos estudos com objetivo de entender melhor as suas composições químicas, mecanismos de ação e suas rotas de ação, visando compreender como estes OEs poderiam atuar na cura ou diminuição do progresso de doenças (KOYAMA; HEINBOCKEL, 2020; SPISNI et al., 2020).

Tendo isto em mente e sabendo que alguns óleos essenciais podem apresentar efeitos tóxicos dependentes de dose, além do fato de haver pouca informação quanto à toxicidade deles, se faz necessária uma investigação mais a fundo do quanto esses óleos podem ser prejudiciais, quais seriam os efeitos colaterais de uma superdosagem e, conseqüentemente, para prover uma base de informações para futuros estudos que os utilizem como possíveis agente terapêuticos no tratamento de quadros clínicos. Para isso, podemos fazer uso de organismos modelos como o utilizado nesse projeto, a *Drosophila melanogaster* (KALYVIANAKI et al., 2020).

1.3 *Drosophila melanogaster* como modelo para estudos de toxicidade

Na era moderna, a mosca-da-fruta (*D. melanogaster*) foi o primeiro organismo complexo a ter o seu genoma completamente sequenciado, o que afetou imensamente o seu como organismo modelo. Isto teve um impacto ainda maior nos anos seguintes, com o sequenciamento do genoma humano, onde identificou-se que mais de 75% dos genes relacionados a doenças em humanos tinham ortólogos na mosca (PANDEY; NICHOLS, 2011).

São diversas as vantagens da utilização destes animais como modelo, além desta mencionada anteriormente. As moscas possuem um ciclo de vida muito rápido: um casal de moscas consegue gerar uma prole de mais de 100 indivíduos geneticamente idênticos em aproximadamente 10 a 12 dias. Os adultos desta espécie possuem estruturas que performam funções equivalentes aos humanos, como rins, coração, pulmões, trato reprodutivo e cérebro. Este último possui mais de 100 mil neurônios que mediam comportamentos mais complexos como ciclo circadiano, sono, aprendizado e memória (PANDEY; NICHOLS, 2011).

Devido a essas características, em especial à similaridade da função dos órgãos entre moscas e humanos, e a capacidade de realizar testes identifiquem mudanças comportamentais nos animais, a *D. melanogaster* já vem sendo utilizada como organismo modelo para estudos relacionada a toxicidade de compostos, como metais essenciais e não-essenciais (SLOBODIAN

et al., 2021), metilmercúrio (GUNDERSON et al., 2020) e ditiotreitól (WANG et al., 2021), por exemplo, fazendo deste um bom modelo para estudo da toxicidade de óleos essenciais.

Dentre as diversas linhagens de *D. melanogaster*, a w^{1118} (White), uma linhagem selvagem, é uma das opções que pode ser utilizada para testes de toxicidade (KASOZI et al., 2018, 2019; NGUYEN et al., 2021) e também em estudos relacionados a alterações na dieta dos animais e os seus impactos (RIVERA et al., 2019; STAATS et al., 2018).

Sabendo da importância dos produtos naturais, como os óleos essenciais, na medicina e da atual busca por novas formas de tratamentos e cura para doenças degenerativas (ESKANDARI-ROOZBAHANI; SHOMALI; TAHERIANFARD, 2019; KUMAR et al., 2016; POSTU et al., 2020), câncer (AHANI et al., 2020; ATHAMNEH et al., 2020; BOUKHATEM et al., 2020; RUTTANAPATTANAKUL et al., 2021) ou infecções (ASIF et al., 2020; DA SILVA et al., 2020; HUANG et al., 2018), e tendo em vista uma possível toxicidade associada ao uso dos óleos essenciais, é importante entender mais profundamente qual seria essa toxicidade, os efeitos colaterais do uso dos OEs e qual seria a melhor forma de administrar esses compostos em *D. melanogaster*, organismo modelo para inúmeras doenças humanas ainda sem tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidades e os efeitos colaterais do uso a médio prazo dos óleos essenciais através da ingestão em *Drosophila melanogaster*.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a toxicidade destes óleos essenciais em linhagem w^{1118} de *Drosophila melanogaster* durante 15 dias de exposição através da alimentação;

- Realizar testes de escalada para avaliação comportamental dos animais nos dias 5, 10 e 15 de tratamento;
- Realizar uma avaliação histológica do cérebro e do intestino dos animais para identificar possíveis efeitos colaterais do uso dos óleos essenciais.

3. METODOLOGIA

3.1 Linhagem de *Drosophila melanogaster* utilizada e manutenção dos animais

Para o desenvolvimento deste trabalho, a linhagem w^{1118} (White) (BL#3605) de *D. melanogaster* foi utilizada. Os animais foram mantidos em uma incubadora BOD com temperatura controlada de 25 °C e ciclo de claro-escuro 12h/12h. Para todos os testes, foram utilizados animais com idade variando de 0 a 3 dias pós-eclosão, sendo que, para a manipulação destes – preparação de cruzamentos e análises –, foi utilizado éter etílico.

Durante a expansão e manutenção da linhagem, os animais foram alimentados utilizando meio padrão de fubá. Já durante os testes, foi utilizado o meio de purê enriquecido para uma melhor entrega dos óleos essenciais. A receita para produção de ambos os meios se encontra na **Tabela 1**.

Meio Instantâneo (1000 g)	Quantidade	Meio de Fubá (1000 g)	Quantidade
Purê de Batata em Pó (Yoki®)	750 g	Água	1000 mL
Extrato de Levedura	150 g	Ágar	6 g
Glicose	93 g	Farinha de Soja	10 g
Nipagin	7 g	Fubá	73 g
		Levedura	18 g

		Xarope de Glicose	154 g
		Solução Ácida	5 mL
		Solução de Nipagin	6 mL

Tabela 1. Receitas para preparo do meio instantâneo a base de purê de batata e para preparo do meio de fubá. Proporção de ingredientes utilizados para preparar a mistura para o meio instantâneo à base de purê de batata usado no experimento. À cada 2g da mistura são adicionados 5 mL de água ou água + OE para o preparo do meio.

3.2 Óleos essenciais utilizados

Foram utilizados os óleos essenciais de copaíba (*Copaifera reticulata, officinalis, coriacea e langsdorffii*), gengibre (*Zingiber officinale*) e lavanda (*Lavandula angustifolia*) (döTerra, Utah, EUA). O perfil cromatográfico dos óleos utilizados, demonstrando seu nível de pureza e composição, encontram-se em anexo.

Os óleos e as soluções preparadas com eles foram mantidos a temperatura ambiente e em abrigo de luz, para evitar possíveis alterações em suas composições químicas.

3.3 Teste de toxicidade e determinação de dose para tratamento

Antes de realizar o tratamento dos animais, foi necessário determinar uma dose segura de ingestão dos óleos essenciais. Para isto, moscas de 0 a 3 dias pós-eclosão foram coletadas e separadas em grupos de 30 animais (15 machos e 15 fêmeas), em triplicata. Estes animais foram transferidos para vials contendo meio de purê enriquecido preparado com uma mistura de água e cada um dos óleos essenciais – 2g de meio para 5mL de solução – nas seguintes concentrações: 0,5%, 0,25%, 0,125% e 0,0625% v/v. Para uma homogeneização ideal dessas soluções, elas foram misturadas por 10 segundos, com auxílio de um vórtex, a cada pipetagem. Os animais se alimentaram *ad libitum* desses meios por um período de 15 dias, sendo transferidos para vials com novos meios a cada 2-3 dias.

Após análise dos resultados, determinou-se que as concentrações a serem utilizadas no tratamento das moscas seria de 0,0625% para os óleos de copaíba e gengibre e 0,125% para o óleo de lavanda, ocorrendo pelo período pré-determinado de 15 dias. Além disso, determinou-se que também seria feito um tratamento com os três óleos essenciais na concentração de 0,25% com objetivo de entender melhor quais seriam as consequências de uma superdosagem deles.

3.4 Teste de escalada (RING test)

Durante o tratamento com os óleos essenciais, machos da linhagem *w¹¹¹⁸* com idade de 0 a 3 dias pós-eclosão passaram pelo teste de escalada – 30 animais por vial, em triplicata, para cada óleo essencial—, para avaliação de possíveis alterações comportamentais e de capacidade neuromotora. Estes testes ocorreram nos dias 5, 10 e 15 de tratamento, seguindo uma adaptação de um protocolo estabelecida anteriormente (GARGANO et al., 2005).

Antes do início do teste, as moscas foram transferidas para vials vazios, posicionados em um equipamento próprio para a sua realização. Os animais foram aclimatados no ambiente em que o teste ocorreria por 20 minutos, à temperatura ambiente, iluminados por uma luz branca fluorescente (18W, 220V, 6500K e 112mA) posicionada diretamente sobre eles. Durante o período de aclimação e o teste em si, fez-se o menor nível de barulho possível.

Passada a aclimação dos animais, o teste era iniciado. O equipamento contendo os vials foi batido contra a bancada rapidamente três vezes, fazendo com que as moscas fossem ao fundo dos vials. Em seguida, o equipamento era novamente posicionado sobre a bancada e, então, foi registrado o número de moscas que atravessaram a marca de 5 cm de altura dez segundos após a terceira batida.

3.5 Análise histológica

Com intuito de analisar alterações morfológicas no intestino e cérebro das drosófilas em decorrência da ingestão dos óleos essenciais, 10 machos de cada grupo experimental foram coletados, anestesiados com gelo e conservados em solução de Carnoy (6:3:1 de 99% etanol, clorofórmio e ácido acético glacial) por 24 horas.

Em seguidas, as moscas foram decapitadas, para que fossem preparadas lâminas a partir de suas cabeças e seus corpos. As amostras foram desidratadas através de banhos em álcool etílico em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e 100%) por 15 minutos cada e diafanizadas em dois banhos de xilol, também por 15 minutos em cada. Finalmente, blocos de parafina foram montados com as amostras através de um banho em parafina (57 °C a 60 °C) por 30 minutos. Os blocos foram cortados com auxílio de um micrótomo e preparados em lâminas.

As lâminas foram, então, desparafinizadas, coradas com hematoxilina e eosina e reidratadas com banhos em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 90%, 80% e 70%), por 15 minutos cada, e, finalmente, em água.

As análises foram feitas através de um microscópio de luz acoplado a uma câmera digital, sendo registradas imagens dos cérebros e dos intestinos dos animais.

3.6 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.4.3. Nos testes de toxicidade dos óleos essenciais e do corante azul, utilizou-se o teste Log-rank (Mantel-Cox). Nos testes de escaladas, verificou-se a normalidade dos dados utilizando o teste Shapiro-Wilk e ANOVA unilateral para avaliar a presença de diferenças estatísticas entre os dados obtidos.

4. RESULTADOS

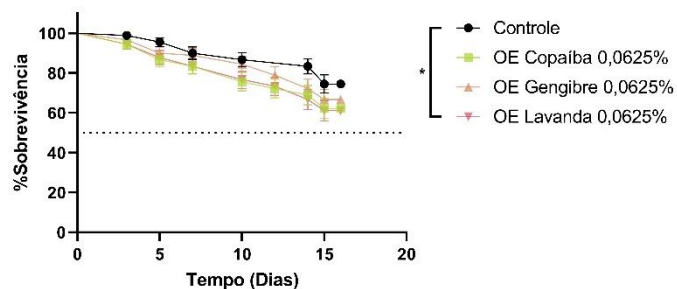
4.1. A toxicidade dos óleos essenciais é diretamente relacionada à concentração destes no alimento

A análise do teste de toxicidade das diferentes concentrações de OEs revela que as concentrações de 0,25% e 0,5% são tóxicas para os animais, havendo diferença estatística significativa entre a mortalidade do grupo controle para os demais grupos experimentais (**Fig. 1C e 1D**).

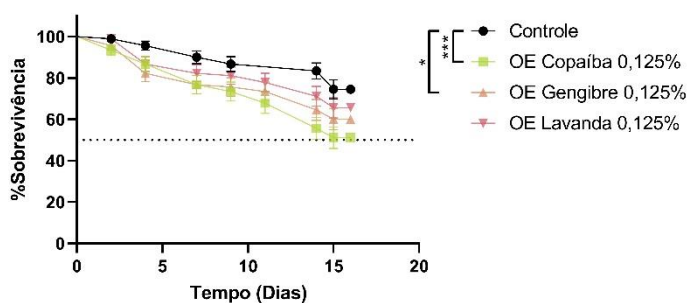
Para a concentração de 0,125%, apenas os óleos de copaíba e gengibre se apresentaram como tóxicos quando comparados ao grupo controle, existindo diferença estatística significativa entre estes grupos. No entanto, não foi identificada diferença estatística na mortalidade dos animais do grupo que recebeu o óleo essencial de lavanda e o grupo controle (**Fig. 1B**), indicativo de que, nesta concentração, este OE não é tóxico para os animais. Sendo assim, determinou-se que essa seria a concentração utilizada para este óleo no tratamento das drosófilas.

Finalmente, na concentração de 0,0625% (**Fig. 1A**), a mortalidade dos grupos que receberam os óleos essenciais de gengibre e copaíba não teve diferença estatística significativa em comparação ao grupo controle, ou seja, não foram tóxicos aos animais. Foi definido, então, que o tratamento dos animais com estes óleos essenciais seria feito utilizando essa concentração. O óleo essencial de lavanda, nesta concentração, apresentou diferença significativa na taxa de mortalidade em comparação com o grupo controle, se mostrando tóxico aos animais.

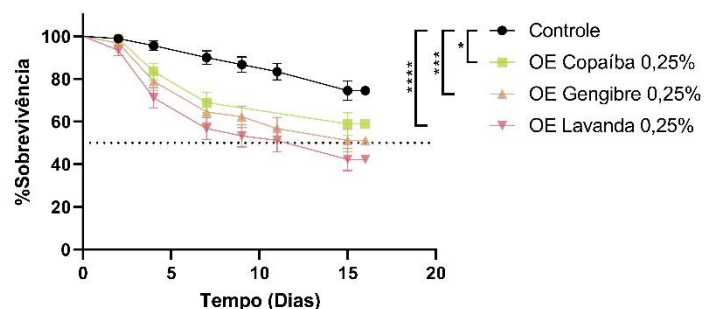
A Teste de Sobrevivência OEs 0,0625%



B Teste de Sobrevivência OEs 0,125%



C Teste de Sobrevivência OEs 0,25%



D Teste de Sobrevivência OEs 0,5%

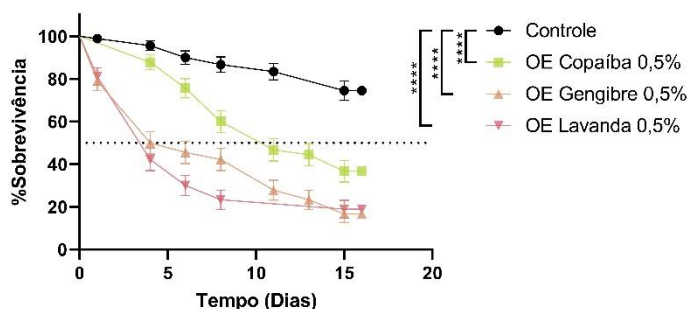


Figura 1. Teste de sobrevivência para diferentes concentrações dos óleos essenciais. Os óleos essenciais de copaíba e gengibre não foram tóxicos aos animais ($n = 30$) na concentração de 0,0625%, não apresentando diferença estatística com o grupo controle (A). O óleo essencial de lavanda apresentou diferença significativa com o controle. Na concentração de 0,125% v/v, apenas o OE de lavanda não se mostrou tóxico, não havendo diferença estatística entre este grupo e o grupo controle (B). Nas concentrações 0,25% e 0,5% (C e D), todos os óleos essenciais foram tóxicos aos animais, visível pela diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle. Os dados são apresentados como porcentagem de sobrevivência + desvio padrão. Diferenças significativas da análise estatística são representadas por * para $p < 0,5$, *** para $p < 0,001$ e **** para $p < 0,0001$. A estatística foi realizada utilizando o teste de sobrevivência Mantel-Cox.

4.2. A ingestão de óleos essenciais em dose segura não altera o comportamento das moscas, enquanto, em dose tóxica, leva a uma escalada menor dos animais

Utilizando-se doses seguras dos óleos essenciais, no quinto dia de tratamento, quando foi realizado o primeiro teste de escalada, observou-se que houve um aumento na taxa de escalada dos animais que foram expostos aos óleos essenciais de gengibre e lavanda – um aumento de aproximadamente 10%, em relação ao grupo controle. Por outro lado, o grupo de

animais que recebeu junto com a sua alimentação o óleo essencial de copaíba não apresentou diferença estatística na escalada, em comparação ao grupo controle (**Fig. 2A**).

Passados 10 dias de tratamento, a análise do teste de escalada indica uma diferença estatisticamente significativa entre a escalada do grupo controle e do grupo de animais que recebeu OE de lavanda junto a sua alimentação; aproximadamente 10% de aumento na taxa de escalada em relação ao controle. Não foram detectadas diferenças significativas entre a escalada dos animais dos grupos expostos aos óleos essenciais de copaíba e gengibre, quando comparados ao grupo controle (**Fig. 2B**). Por fim, no décimo quinto dia de tratamento, não houve diferença estatística entre a escalada das moscas de nenhum dos grupos testados (**Fig. 2C**). Em nenhuma análise as moscas dos grupos experimentais apresentaram escalada inferior ao grupo controle. Como o teste de escalada avalia o comportamento de geotaxia negativa dos animais – quando expostos a algum estresse, as moscas tendem a voar em direção contrária à gravidade – podemos observar que o tratamento com os três óleos essenciais testados em concentrações seguras não levou à alteração de comportamento.

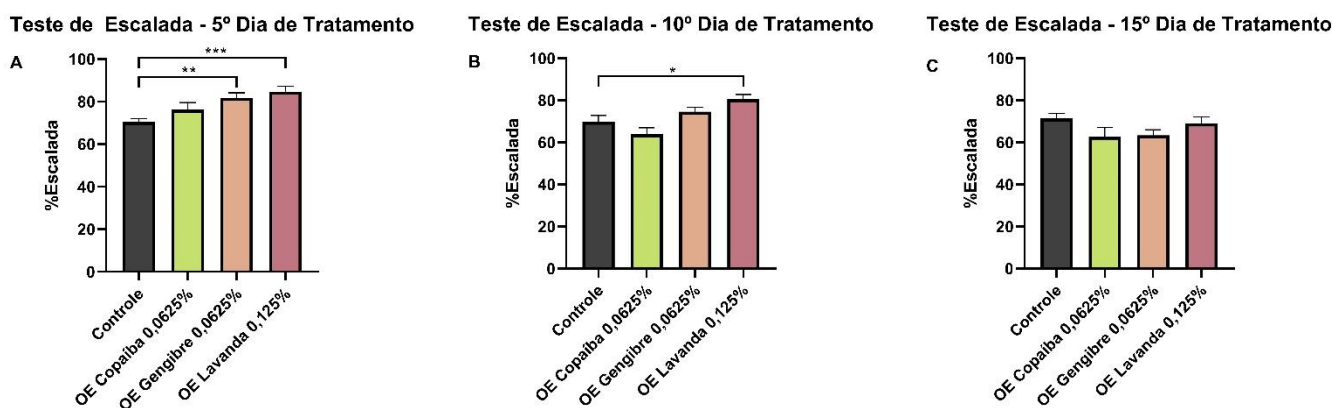


Figura 2. Resultados do teste de escalada para as concentrações seguras de OEs. No quinto dia de tratamento (A), apenas as moscas dos grupos expostos aos OEs de gengibre e lavanda apresentaram uma escalada superior ao grupo controle. Já no décimo dia de tratamento (B), apenas as moscas que receberam óleo essencial de lavanda apresentaram escalada estatisticamente superior ao grupo controle. Finalmente, no décimo quinto dia de tratamento, não foi detectada diferença significativa entre a escalada de nenhum dos grupos experimentais quando comparados ao grupo controle (C). Os dados são apresentados como porcentagem de escalada + desvio padrão. Diferenças significativas da análise estatística são representadas por * para $p < 0,5$, ** para $0,01$ *** para $p < 0,001$. Os testes estatísticos utilizados foram Shapiro-Wilk, para avaliar a normalidade dos dados, e ANOVA unilateral para verificar as diferenças estatísticas entre os grupos ($n = 30$).

Em contrapartida, quando fornecida às moscas uma superdosagem dos óleos – concentração de 0,25% – é possível identificar quedas na escalada dos animais expostos aos óleos essenciais, em comparação aos do grupo controle. No quinto dia de tratamento (**Fig. 3A**), as moscas que ingeriram óleo de copaíba apresentaram uma diminuição de aproximadamente 10% na escalada em relação aos animais do grupo controle. Por sua vez, no décimo dia de tratamento, as moscas expostas ao óleo essencial de gengibre apresentaram queda na escalada quando comparadas ao grupo controle (**Fig. 3B**).

No décimo quinto dia de tratamento, os animais de todos os grupos experimentais escalaram menos que os do grupo controle. Neste caso, a queda da escalada foi maior que as identificados nos testes anteriores, chegando a aproximadamente 20% de diferença entre os grupos experimentais e o grupo controle (**Fig. 3C**). Esta queda pode estar relacionada com algum tipo de toxicidade dos óleos essenciais para as moscas, quando utilizados em concentrações mais altas.

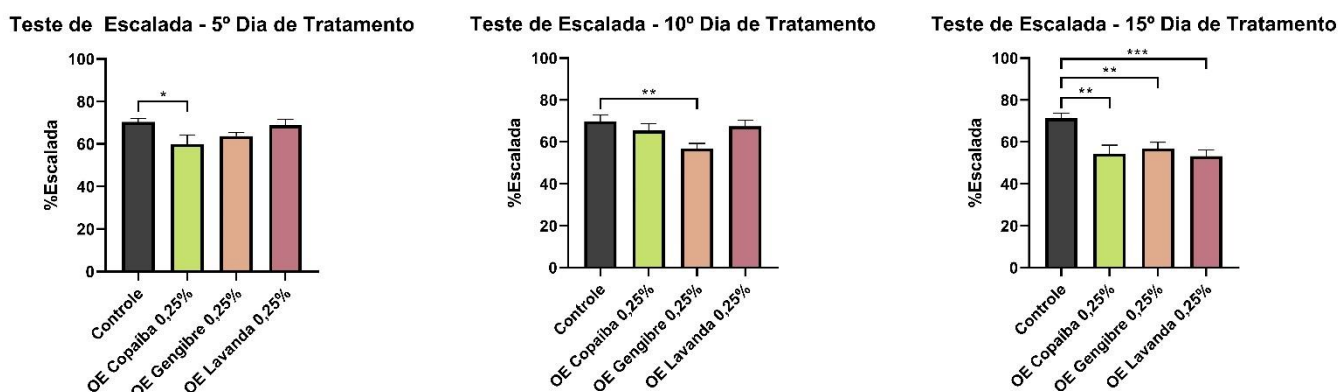


Figura 3. Resultados do teste de escalada para as concentrações tóxicas de OEs. No quinto dia de tratamento, apenas as moscas do grupo que recebeu OE de copaíba apresentaram queda na escalada (A), enquanto no décimo dia de tratamento, somente as moscas expostas ao OE de gengibre apresentaram queda (B). No décimo quinto dia de tratamento, os animais de todos os grupos experimentais apresentaram queda na escalada em comparação ao grupo controle, uma queda de aproximadamente 20%. Os dados são apresentados como porcentagem de escalada + desvio padrão. Diferenças significativas da análise estatística são representadas por * para $p < 0,5$, ** para $0,01$ e *** para $p < 0,001$. Os testes estatísticos utilizados foram Shapiro-Wilk, para avaliar a normalidade dos dados, e ANOVA unilateral para verificar as diferenças estatísticas entre os grupos ($n = 30$).

4.3 A superdosagem de OEs pode levar a danos no cérebro e no intestino, enquanto a dose segura não provoca alterações nestes órgãos

Com intuito de observar se o baixo desempenho no teste de escalada observado em altas dosagens dos óleos essenciais foi provocado por alguma alteração a nível de sistema nervoso central, foi realizada a histologia do tecido cerebral das moscas. Além disso, como o tratamento dos OEs foi realizado via alimentação, fez-se também a histologia do tecido intestinal dos animais, pois este é um dos órgãos que poderia sofrer algum tipo de alteração morfológica por estar envolvido no processo de digestão.

A histologia dos tecidos cerebral e intestinal das moscas que receberam uma dose segura de OEs indica que não houve alterações na morfologia dos órgãos avaliados em nenhum dos grupos experimentais, quando comparados ao grupo controle, havendo conservação das células e estruturas dos tecidos avaliados, conforme pode ser observado nas micrografias ilustrativas abaixo (Fig. 4 e 5).

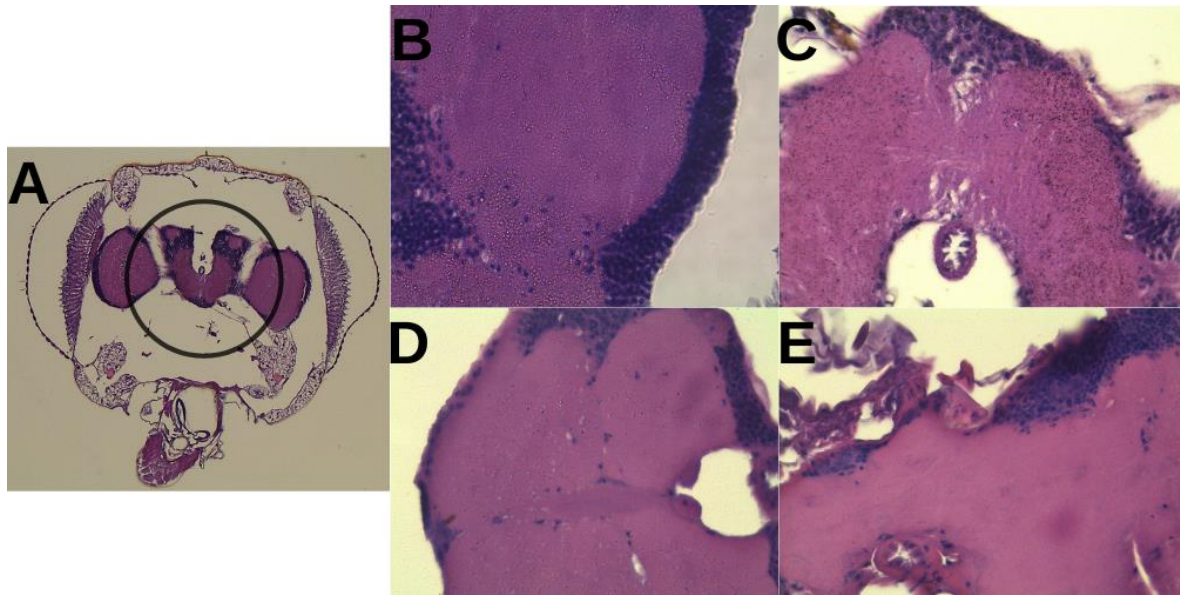


Figura 4. Análise histológica do cérebro de moscas *w1118* expostas à dose segura de óleos essenciais de copaíba, gengibre e lavanda. A imagem A mostra uma seção histológica completa da cabeça da mosca; o círculo indica a área do cérebro de onde as fotos seguintes foram tiradas. Após 15 dias de tratamento com os óleos essenciais, não houve alterações morfológicas no cérebro das moscas dos grupos que receberam OE de copaíba (C), gengibre (D) e lavanda (E), em comparação com o grupo controle (B). A foto A foi tirada com aumento de 10X, enquanto as fotos B, C, D e E foram tiradas com aumento de 100X.

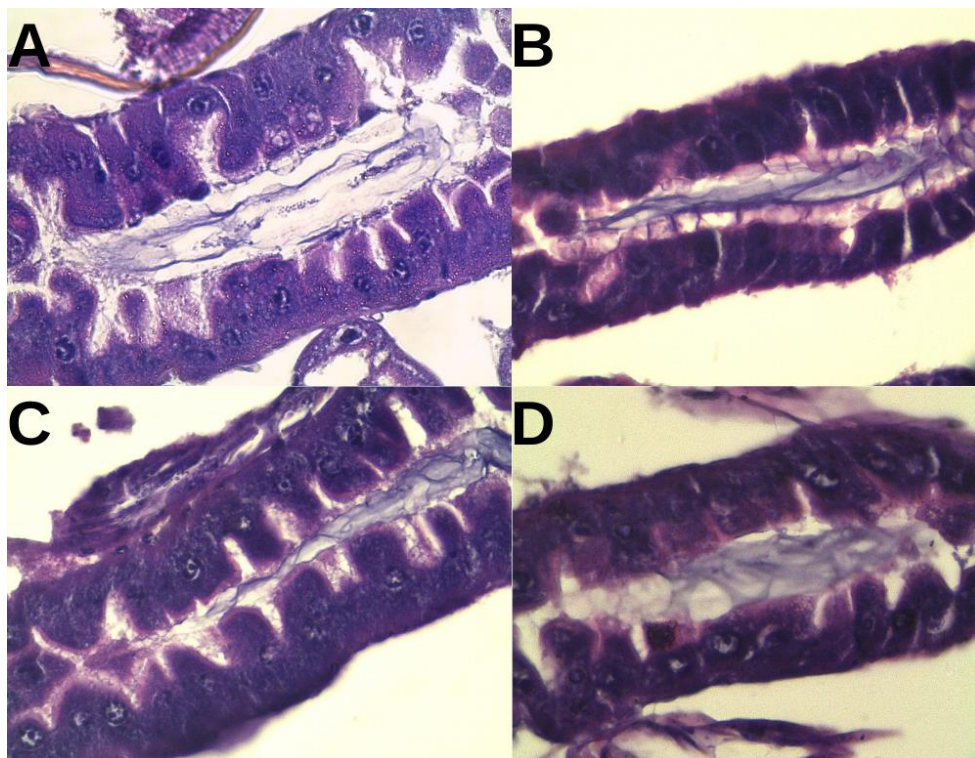


Figura 5. Análise histológica do intestino de moscas *w1118* expostas à dose segura de óleos essenciais de copaíba, gengibre e lavanda. A ingestão de óleos essenciais de copaíba (B), gengibre (C) e lavanda (D) não gerou alterações morfológicas no intestino dos animais após 15 dias de tratamento. As fotos foram tiradas com aumento de 100X.

Por outro lado, a avaliação histológica do tecido cerebral de moscas que foram expostas à superdosagem dos OEs indica a presença de vacúolos no tecido cerebral de todos os grupos experimentais (**Fig. 6B, 6C e 6D**). Estas falhas na morfologia do cérebro não foram encontradas na seção feita a partir do cérebro da mosca do grupo controle, assim inferimos que os óleos essenciais testados, quando utilizados em doses acima das doses seguras, são tóxicos para o sistema nervoso central das moscas (**Fig. 6A**).

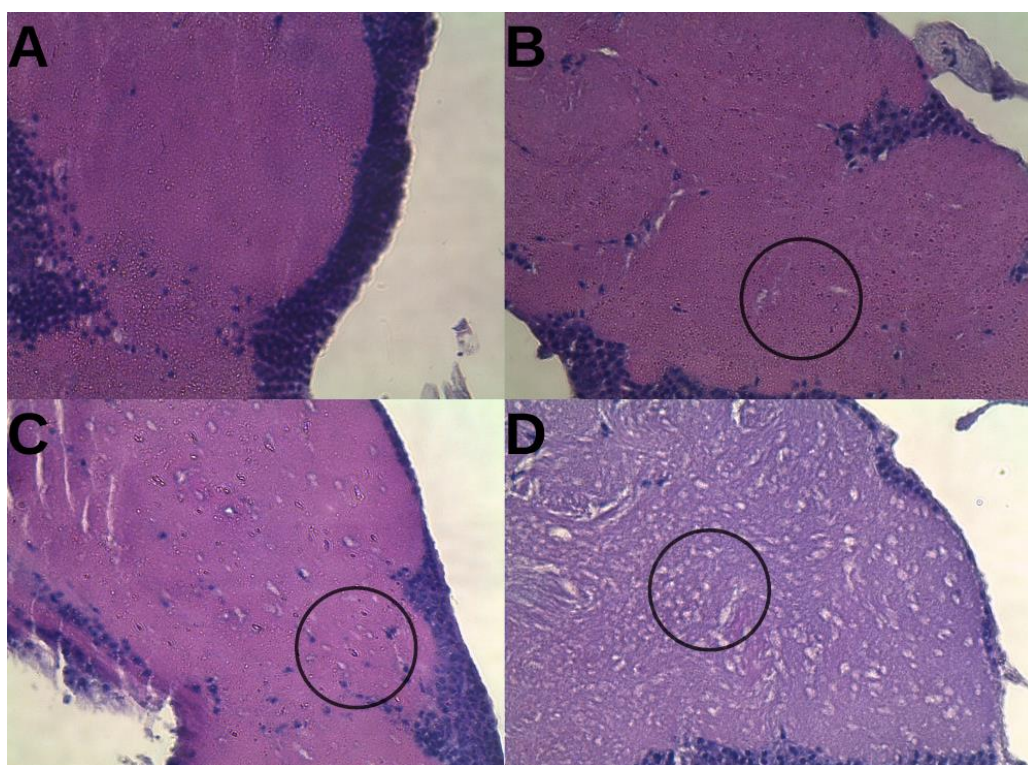


Figura 6. Análise histológica do cérebro de moscas *w¹¹¹⁸* expostas à superdosagem de óleos essenciais de copaíba, gengibre e lavanda. A análise histológica do cérebro destes animais indica a presença de “buracos” no tecido cerebral de todos os grupos experimentais (copaíba (B), gengibre (C) e lavanda (D)) expostos aos OEs – indicados pelos círculos –, não sendo visível esta característica no cérebro do animal do grupo controle (A). Todas as fotos foram tiradas em aumento de 100X.

Por sua vez, a avaliação do intestino destes animais também indica alterações morfológicas no tecido dos grupos experimentais (**Fig. 7B, 7C e 7D**) que não são visíveis no intestino do animal proveniente do grupo controle. Neste caso, as células do intestino perderam seu formato e o espaço entre as células se tornou maior, em comparação ao grupo controle (**Fig.**

7A), indicando que em altas concentrações, os óleos essenciais testados são tóxicos para este órgão.

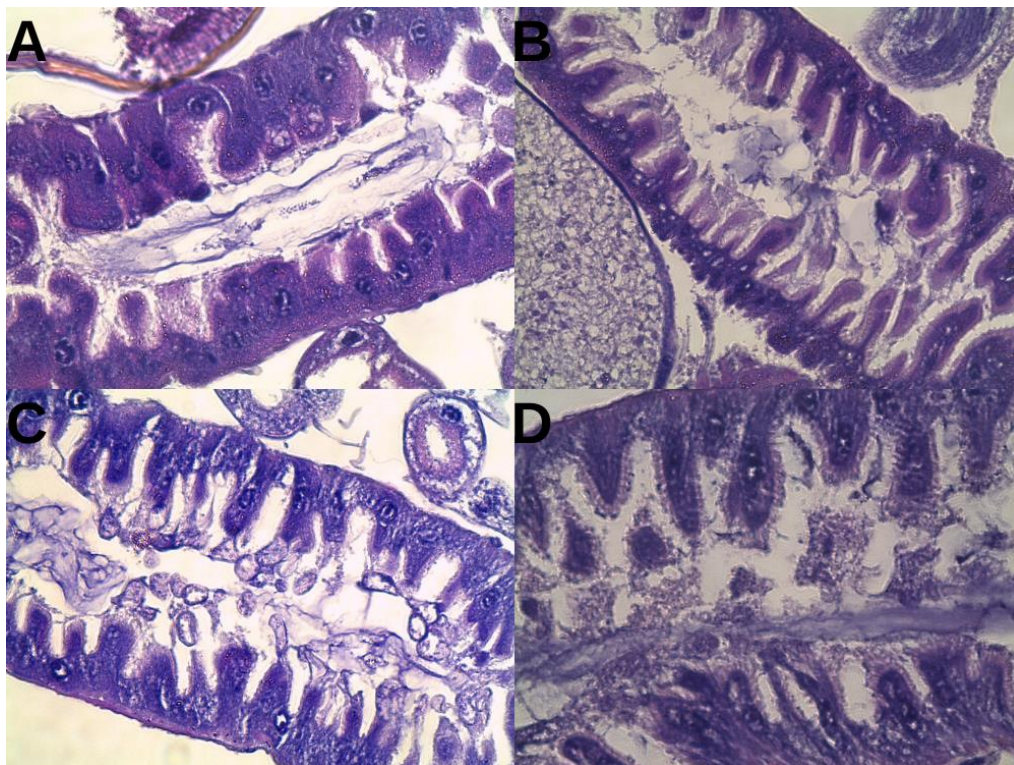


Figura 7. Seções histológicas do intestino de moscas *w¹¹⁸* expostas à superconcentração de OEs de copaíba, lavanda e gengibre. As imagens, tiradas com aumento de 100X, representam as células epiteliais do intestino de moscas submetidas a diferentes tratamentos (controle (A), OE de copaíba (B), OE de gengibre (C) e OE de lavanda (D)). Em comparação ao grupo controle, os animais dos grupos experimentais apresentaram danos morfológicos ao tecido intestinal, envolvendo a perda do formato das células do epitélio intestinal e aumento do espaço entre as células.

5. DISCUSSÃO

Avaliando os resultados obtidos a partir do teste de toxicidade, infere-se que os óleos essenciais utilizados apresentam toxicidade dose-dependente para os animais. A dose segura encontrada para o óleo essencial de lavanda foi de 0,125% v/v, concentração em que não houve um aumento no número de mortes dos animais expostos ao OE em relação ao grupo controle. Em um estudo anterior que avaliou a citotoxicidade do óleo essencial de lavanda *in vitro*, utilizando células epiteliais humanas, observou-se que este óleo se mostrava tóxico para as

células em doses acima de 0,125%, corroborando com o que foi observado nesta pesquisa (PRASHAR; LOCKE; EVANS, 2004).

Já para os óleos essenciais de gengibre e copaíba, a dose segura foi de 0,0625% v/v. Ainda são escassas as pesquisas referentes à toxicidade dos óleos essenciais de gengibre e copaíba, especialmente em *Drosophila melanogaster*. Entretanto, a administração de óleo essencial de gengibre em ratos Wistar por 13 semanas não se mostrou tóxica até uma concentração de 500 mg/kg, enquanto a administração de óleo essencial de copaíba (*Copaifera reticulata*) em camundongos, numa concentração de 1 ml/kg, durante 3 dias foi tóxica, levando à morte de todos animais do grupo experimental (BALDISSERA et al., 2014; JEENA; LIJU; KUTTAN, 2011).

O teste de escalada, muito utilizado em *Drosophila melanogaster*, reporta possíveis alterações na capacidade de escalada das moscas, que podem ter diversas explicações, desde debilitação neuromotora até estresse, por exemplo, se baseando no comportamento de geotaxia negativa das moscas, em que, quando expostas à algum estresse, estas tendem a voar na direção oposta à gravidade (GARGANO et al., 2005). Neste estudo, a ingestão dos óleos essenciais testados em dose segura não levou à queda na escalada dos animais, havendo apenas melhora ou manutenção da taxa de escalada, em comparação ao grupo controle, durante todo o tratamento. A linhagem utilizada, *w¹¹¹⁸*, apresenta degeneração em sua retina, tornando a escalada dos animais naturalmente mais baixa (FERREIRO et al., 2018). O aumento na escalada das moscas dos grupos de gengibre e lavanda, em doses seguras, pode estar relacionada com uma atenuação desta degeneração devido ao tratamento com os óleos.

No entanto, quando expostas à superdosagem dos óleos, as moscas apresentam queda na capacidade de escalada no décimo quinto dia de exposição, escalando em média 20% a menos que o grupo controle. Considerando o resultado observado na histologia desses animais,

todos os grupos experimentais apresentaram algum nível de neurodegeneração, indicado pela presença de vacúolos no tecido cerebral. Esta neurodegeneração pode ser responsável pela queda na taxa de escalada das moscas, visto que a capacidade neuromotora dos animais provavelmente estaria debilitada. Esta neurodegeneração não foi observada nos animais que receberam apenas a dose segura dos OEs.

Considerando que os óleos essenciais são misturas muito complexas e que podem conter mais de 80 diferentes compostos (SPISNI et al., 2020), essa neurodegeneração poderia ser resultado à superexposição dos animais a qualquer um desses compostos. São necessários mais estudos para compreender melhor a toxicidade de cada um dos componentes dos óleos essenciais testados.

Avaliando a histologia do intestino dos animais, os que foram expostos à dose segura dos OEs não apresentaram alterações morfológicas neste órgão, mantendo a estrutura do tecido e das células. Já quando as moscas receberam uma dose de OE acima da concentração segura, a histologia do intestino sugere que houve danos causados pela ingestão dos óleos, havendo um aumento do espaço entre as células da parede intestinal e perda do formato das células, o que, conseqüentemente, poderia trazer prejuízos para o funcionamento do órgão.

É importante ressaltar que, tanto com doses seguras quanto com doses tóxicas, pode haver alterações na microbiota intestinal dos animais, visto que todos os óleos essenciais testados apresentam algum nível de atividade antimicrobiana. Sabe-se hoje da importância da microbiota intestinal, não apenas para o bom funcionamento do intestino, mas até mesma a sua relação com desenvolvimento de diversas doenças, como doenças neurodegenerativas, e até transtornos psicológicos, como o autismo (MANGIOLA et al., 2016; QUIGLEY, 2017; SAMPSON et al., 2016). Sendo assim, pensando numa aplicação futura desses óleos na

medicina, são necessários mais estudos para entender de que forma estes OEs alteram a microbiota intestinal destes animais.

Em suma, os óleos essenciais testados possuem toxicidade dose-dependente, sendo que a dosagem segura para o óleo essencial de lavanda em *Drosophila melanogaster* – modelo utilizado neste estudo – é de 0,125% v/v, enquanto para os óleos de gengibre e copaíba, a dose é de 0,0625% v/v. Fornecer OEs nestas concentrações para as moscas não levou a alterações comportamentais e nem morfofisiológicas do cérebro e do intestino. No entanto, a exposição dos animais a doses maiores que essas levaram à neurodegeneração e perda de estrutura do intestino, o que resultou numa alteração comportamental, visível pela queda na taxa de escalada desses animais.

Ainda há uma escassez de pesquisas envolvendo a ingestão de óleos essenciais. Considerando que estes são produtos naturais já muito utilizados e difundidos, compreender melhor a segurança e toxicidade dos OEs é importante devido ao seu interesse como possíveis agentes terapêuticos para diversas doenças ainda sem tratamento, como o câncer ou a doença de Alzheimer, por exemplo. Uma das formas de se fazer estes estudos é através do uso de organismos modelo, como a *Drosophila melanogaster*, modelo para muitas dessas doenças (BOLUS et al., 2020; MIRZOYAN et al., 2019), sendo assim ter esta base de informações quanto à toxicidade dos OEs nestes animais abre portas para que pesquisas futuras sejam realizadas com objetivo de testar a atividade dos óleos essenciais de copaíba, gengibre e lavanda nessas doenças, seus mecanismos de ação e sua toxicidade.

6. CONCLUSÃO

- A dose segura para ingestão de óleo essencial de lavanda em *Drosophila melanogaster* através da alimentação é de 0,125% v/v. Já para os óleos essenciais de copaíba e gengibre, esta dose é de 0,0625% v/v.

- Animais que receberam a dose segura destes OEs não apresentam déficit na escalada, apenas melhora ou manutenção dos níveis exibidos pelo grupo controle, que receberam apenas água em seu alimento. Por outro lado, a ingestão de doses maiores que estas levou à queda na escalada dos animais após 15 dias de tratamento.

- A ingestão de uma dose segura dos OEs de copaíba, gengibre e lavanda não levou a alterações morfofisiológicas dos tecidos cerebral e intestinal dos animais, se mostrando atóxica para esses órgãos. Já a ingestão de doses superiores levou a danos em ambos tecidos, ocorrendo neurodegeneração no cérebro e perda de estrutura do tecido e das células do intestino.

- Com base nos resultados encontrados, é possível inferir que a *Drosophila melanogaster* é um bom organismo modelo para pesquisas relacionadas à ingestão de óleos essenciais, neste caso, os de copaíba, gengibre e lavanda. Isto abre portas para que novos estudos sejam realizados com intuito de avaliar os efeitos terapêuticos destes produtos naturais em doenças humanas ainda sem cura, utilizando a mosca-da-fruta como modelo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUTALEB, N. et al. Lavender oil (*Lavandula angustifolia*) attenuates renal ischemia/reperfusion injury in rats through suppression of inflammation, oxidative stress and apoptosis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 110, n. November 2018, p. 9–19, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.045>

AHANI, N. et al. Zataria multiflora boiss. Essential oil induce apoptosis in two human colon cancer cell lines (HCT116 & SW48). **Iranian Journal of Public Health**, v. 49, n. 4, p. 753–762, 2020. <https://doi.org/10.18502/ijph.v49i4.3183>

AKINYEMI, A. J. et al. Nephroprotective effect of essential oils from ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*curcuma longa*) rhizomes against cadmium-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of Oleo Science**, v. 67, n. 10, p. 1339–1345, 2018. <https://doi.org/10.5650/jos.ess18115>

ALI, B. et al. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 8, p. 601–611, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>

ASIF, M. et al. COVID-19 and therapy with essential oils having antiviral, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 5, p. 1153–1161, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00744-0>

ATANASOV, A. G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>

ATHAMNEH, K. et al. Origanum majorana essential oil triggers p38 mapk-mediated protective autophagy, apoptosis, and caspase-dependent cleavage of P70S6K in colorectal cancer cells.

Biomolecules, v. 10, n. 3, p. 1–18, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10030412>

BALDISSERA, M. D. et al. Toxic effect of essential oils (*Copaifera* spp) in the treatment of mice experimentally infected with *trypanosoma evansi*. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 319–324, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2014.03.001>

BEUTLER, J. A. Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. **Current protocols in pharmacology**, v. 86, n. 1, p. e67, 2019. <https://doi.org/10.1002/cpph.67>

BOLUS, H. et al. Modeling neurodegenerative disorders in *Drosophila melanogaster*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21093055>

BOUKHATEM, M. N. et al. A New Eucalyptol-Rich Lavender (*Lavandula stoechas* L.) Essential Oil: Emerging. **Molecules**, v. 25, p. 1–17, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25163671>

BUSSE, D. et al. A synthetic sandalwood odorant induces wound-healing processes in human keratinocytes via the olfactory receptor OR2AT4. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 11, p. 2823–2832, 2014. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.273>

CAPUTO, L. S. et al. Copaiba oil suppresses inflammation in asthmatic lungs of BALB/c mice induced with ovalbumin. **International Immunopharmacology**, v. 80, n. October 2019, p. 106177, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106177>

CARDIA, G. F. E. et al. Effect of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Essential Oil on Acute Inflammatory Response. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 6–15, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1413940>

CSIKÓS, E. et al. Effects of *thymus vulgaris* L., *Cinnamomum verum* J.Presl and *cymbopogon nardus* (L.) rendle essential oils in the endotoxin-induced acute airway inflammation mouse

model. **Molecules**, v. 25, n. 15, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25153553>

DA SILVA, J. K. R. et al. Essential oils as antiviral agents. Potential of essential oils to treat sars-cov-2 infection: An in-silico investigation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21103426>

DONELLI, D. et al. Effects of lavender on anxiety: A systematic review and meta-analysis. **Phytomedicine**, v. 65, n. July, p. 153099, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153099>

ESKANDARI-ROOZBAHANI, N.; SHOMALI, T.; TAHERIANFARD, M. Neuroprotective effect of Zataria multiflora essential oil on rats with Alzheimer disease: A mechanistic study. **Basic and Clinical Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 85–97, 2019. <https://doi.org/10.32598/bcn.9.10.270>

FERREIRO, M. J. et al. Drosophila melanogaster white mutant w1118 undergo retinal degeneration. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. JAN, p. 1–12, 2018. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00732>

FLEISCHER, J. et al. Expression of odorant receptor Olfr78 in enteroendocrine cells of the colon. **Cell and Tissue Research**, v. 361, n. 3, p. 697–710, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2165-0>

FUKUDA, N. et al. Functional characterization of a mouse testicular olfactory receptor and its role in chemosensing and in regulation of sperm motility. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 24, p. 5835–5845, 2004. <https://doi.org/10.1242/jcs.01507>

GARGANO, J. W. et al. Rapid iterative negative geotaxis (RING): A new method for assessing age-related locomotor decline in Drosophila. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 5, p. 386–395, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.02.005>

GUNDERSON, J. et al. Tissue-specific Nrf2 signaling protects against methylmercury toxicity

in *Drosophila* neuromuscular development. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 12, p. 4007–4022, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02879-z>

HUANG, J. et al. Antibacterial activity of *Artemisia asiatica* essential oil against some common respiratory infection causing bacterial strains and its mechanism of action in *Haemophilus influenzae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, n. January, p. 470–475, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.032>

JEENA, K.; LIJU, V. B.; KUTTAN, R. A preliminary 13-week oral toxicity study of ginger oil in male and female wistar rats. **International Journal of Toxicology**, v. 30, n. 6, p. 662–670, 2011. <https://doi.org/10.1177/1091581811419023>

JUNIOR, D. J. S. F. et al. Effects of Copaiba oil in the healing process of urinary bladder in rats. **International Braz J Urol**, v. 44, n. 2, p. 384–389, 2018. <https://doi.org/10.1590/s1677-5538.ibju.2017.0143>

KALYVIANAKI, K. et al. Toxicity evaluation of an essential oil mixture from the Cretan herbs thyme, Greek sage and Cretan dittany. **Science of Food**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41538-020-00080-1>

KARIMZADEH, Z. et al. The Effects of Lavender and *Citrus aurantium* on Anxiety and Agitation of the Conscious Patients in Intensive Care Units: A Parallel Randomized Placebo-Controlled Trial. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5565956>

KASOZI, K. I. et al. Low concentrations of monosodium glutamate (MSG) are safe in male *Drosophila melanogaster*. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 1–5, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3775-x>

KASOZI, K. I. et al. Low concentrations of *Lactobacillus rhamnosus* GG (Yoba®) are safe in

male *Drosophila melanogaster*. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 1, p. 4–8, 2019.
<https://doi.org/10.1186/s13104-019-4297-x>

KIM, S. H. et al. Expression of human olfactory receptor 10J5 in heart aorta, coronary artery, and endothelial cells and its functional role in angiogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 460, n. 2, p. 404–408, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.046>

KOYAMA, S.; HEINBOCKEL, T. The effects of essential oils and terpenes in relation to their routes of intake and application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21051558>

KUMAR, A. et al. Possible neuroprotective mechanisms of clove oil against icv-colchicine induced cognitive dysfunction. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 4, p. 764–772, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.03.005>

MANGIOLA, F. et al. Gut microbiota in autism and mood disorders. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 1, p. 361–368, 2016. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i1.361>

MIRZOYAN, Z. et al. *Drosophila melanogaster*: A model organism to study cancer. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. March, p. 1–16, 2019. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00051>

MOSS, M. et al. Aromas of rosemary and lavender essential oils differentially affect cognition and mood in healthy adults. **International Journal of Neuroscience**, v. 113, n. 1, p. 15–38, 2003. <https://doi.org/10.1080/00207450390161903>

MOSS, M. et al. Modulation of Cognitive Performance and Mood by Aromas of Peppermint and Ylang-Ylang Human Cognitive Neuroscience Unit , Division of Psychology , University of Northumbria , Newcastle upon Tyne , Cognitive Drug Research Ltd ., CDR House , Gatehampton Road. **International Journal of Neuroscience**, v. 118, n. 1, p. 59–77, 2008.

<https://doi.org/10.1080/00207450601042094>

NGUYEN, U. et al. Exposure to bisphenol A differentially impacts neurodevelopment and behavior in *Drosophila melanogaster* from distinct genetic backgrounds. **Neurotoxicology**, v. 82, p. 146–157, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.12.007>

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human disease models in *drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 2, p. 411–436, 2011. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003293>

POSTU, P. A. et al. Memory-enhancing effects of *origanum majorana* essential oil in an alzheimer's amyloid beta1-42 rat model: A molecular and behavioral study. **Antioxidants**, v. 9, n. 10, p. 1–20, 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox9100919>

PRASHAR, A.; LOCKE, I. C.; EVANS, C. S. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. **Cell Proliferation**, v. 37, n. 3, p. 221–229, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2004.00307.x>

QU, P. et al. A new class of broadly neutralizing antibodies that target the glycan loop of Zika virus envelope protein. **Cell Discovery**, v. 6, n. 1, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41421-019-0140-8>

QUIGLEY, E. M. M. Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 17, n. 12, 2017.

RAMSEY, J. T. et al. Essential oils and health. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 93, n. 2, p. 291–305, 2020.

RASHIDIAN, A. et al. Protective effect of ginger volatile oil against acetic acid-induced colitis in rats: a light microscopic evaluation. **Journal of Integrative Medicine**, v. 12, n. 2, p. 115–120, 2014. [https://doi.org/10.1016/S2095-4964\(14\)60011-X](https://doi.org/10.1016/S2095-4964(14)60011-X)

RIVERA, O. et al. **A high fat diet impacts memory and gene expression of the head in mated female *Drosophila melanogaster*.** [s.l: s.n.]. v. 189. <https://doi.org/10.1007/s00360-019-01209-9>

RUTTANAPATTANAKUL, J. et al. Essential oil from zingiber ottensii induces human cervical cancer cell apoptosis and inhibits mapk and pi3k/akt signaling cascades. **Plants**, v. 10, n. 7, 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10071419>

SAMPSON, T. R. et al. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. **Cell**, v. 167, n. 6, p. 1469- 1480.e12, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018>

SLOBODIAN, M. R. et al. The effects of essential and non-essential metal toxicity in the drosophila melanogaster insect model: A review. **Toxics**, v. 9, n. 10, 2021. <https://doi.org/10.3390/toxics9100269>

SPISNI, E. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and microbial-modulating activities of essential oils: Implications in colonic pathophysiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 1–27, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21114152>

STAATS, S. et al. Dietary resveratrol does not affect life span, body composition, stress response, and longevity-related gene expression in *Drosophila melanogaster*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19010223>

THOMFORD, N. E. et al. Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19061578>

WANG, Y. et al. Toxicity of Dithiothreitol (DTT) to *Drosophila melanogaster*. **Toxicology Reports**, v. 8, n. February 2020, p. 124–130, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.12.014>

ZAMANIFAR, S. et al. The Effect of Music Therapy and Aromatherapy with Chamomile-Lavender Essential Oil on the Anxiety of Clinical Nurses: A Randomized and Double-Blind Clinical Trial. **Journal of Medicine and Life**, v. 13, n. 1, p. 87–93, 2020.

<https://doi.org/10.25122/jml-2019-0105>

APÊNDICES E ANEXOS

ANEXO A – PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE COPAÍBA

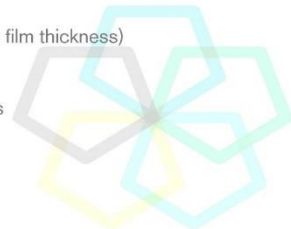


Aromatic Plant Research Center

We provide uncompromising
quality control for your products.

Customer : doTERRA International
Lot Number : 202615
Date Filled : 09/17/2020

Column : ZB5 (60 m length × 0.25 mm inner diameter × 0.25 µm film thickness)
Instrument : Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra
Carrier gas : Helium 80 psi
Temperature ramp : 2 degrees celsius per minute up to 260-degrees celsius
Split ratio : 30:1
Sample preparation : 5%w/v solution with Dichloromethane.



Comments:

The analysis of this Copaiba lot revealed no contaminants or adulteration.
The sample meets the expected chemical profile for authentic essential oils of *Copaifera* species.

Analysied by : Ambika Poudel
Reviewed by : Dr. Prabodh Satyal



© Copyright 2020 Aromatic Plant Research Center. All rights reserved. Any publishing, copying, use, dissemination, or distribution of this report, including online, without the express written permission of Aromatic Plant Research Center is strictly prohibited.

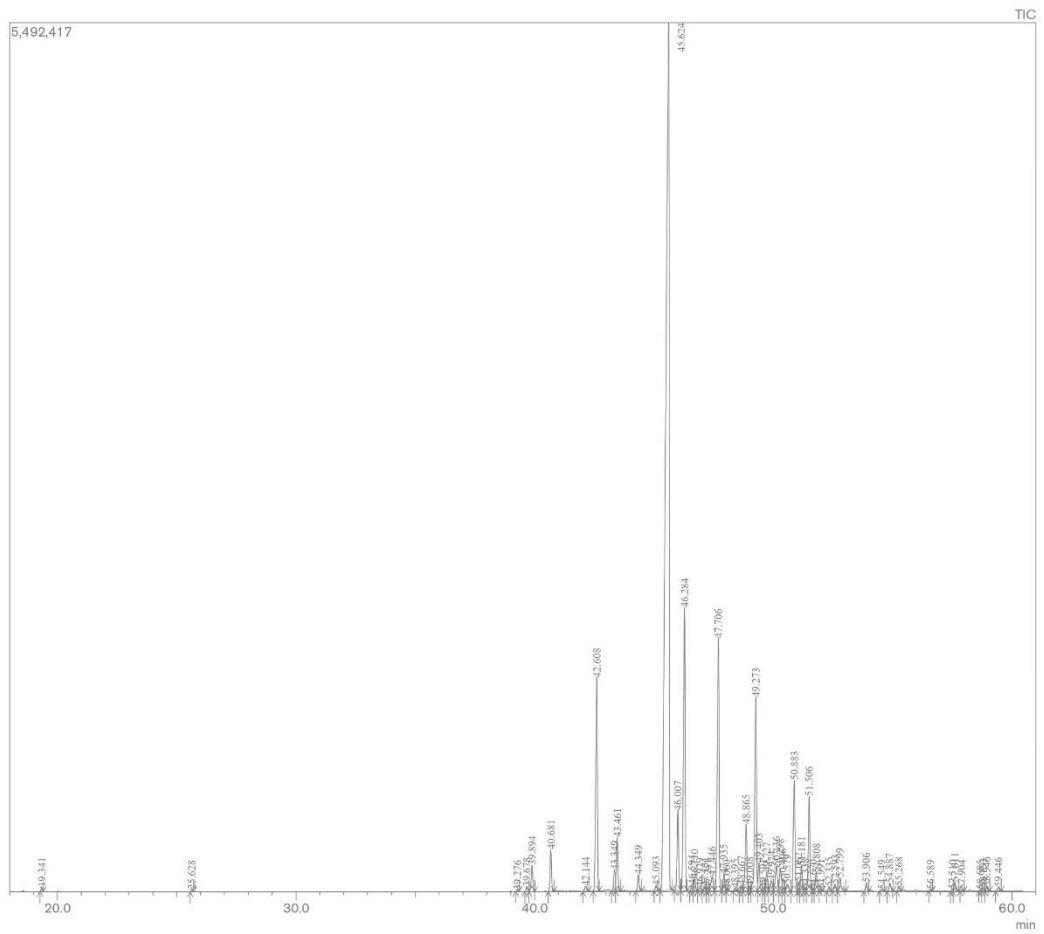
Copaiba Essential Oil

Customer : doTERRA International

Lot Number : 202615

Date Filled : 09/17/2020

Chromatogram



© Copyright 2020 Aromatic Plant Research Center. All rights reserved. Any publishing, copying, use, dissemination, or distribution of this report, including online, without the express written permission of Aromatic Plant Research Center is strictly prohibited.

Peak Report

Peak#	R.Time	Name	Area%
1	19.341	cis-beta-Ocimene	0.09
2	25.628	allo-Ocimene	0.04
3	39.276	Bicyclo nonane	0.03
4	39.678	Bicycloelemene	0.12
5	39.894	delta-Elemene	0.68
6	40.681	alpha-Cubebene	1.05
7	42.144	alpha-Ylangene	0.16
8	42.608	alpha-Copaene	5.77
9	43.349	beta-Cubebene	0.55
10	43.461	beta-Elemene	1.40
11	44.349	Cyperene	0.43
12	45.093	cis-alpha-Bergamotene	0.14
13	45.624	beta-Caryophyllene	49.24
14	46.007	gamma-Elemene	2.14
15	46.284	trans-alpha-Bergamotene	7.94
16	46.594	Aromadendrene	0.16
17	46.710	cis-beta-Farnesene	0.32
18	46.929	beta-Humulene	0.12
19	47.131	epi-beta-Santalene	0.14
20	47.251	trans-Muurolo-3,5-diene	0.06
21	47.446	trans-beta-Farnesene	0.56
22	47.706	alpha-Humulene	7.22
23	47.935	allo-Aromadendrene	0.45
24	48.060	cis-Muurolo-4(14),5-diene	0.03
25	48.395	Elemene isomer	0.06
26	48.667	cis-Cadina-1(6),4-diene	0.15
27	48.865	trans-Cadina-1(6),4-diene	1.89
28	49.008	gamma-Curcumene	0.13
29	49.273	Germacrene D	5.54
30	49.403	cis-cis-alpha-Farnesene	0.76
31	49.591	delta-Selinene	0.07
32	49.727	beta-Selinene	0.51
33	49.924	trans-Muurolo-4(14),5-diene	0.44
34	50.136	Bicyclogermacrene	0.93
35	50.298	alpha-Muurolo	0.69
36	50.406	cis-alpha-Bisabolene	0.32
37	50.579	beta-Cadinene	0.29
38	50.883	beta-Bisabolene	3.07
39	51.062	cis-gamma-Bisabolene	0.23
40	51.181	gamma-Cadinene	0.64
41	51.338	Copaiba Sesquiterpenoid 1	0.08
42	51.506	delta-Cadinene	2.49
43	51.670	trans-Calamenene	0.05
44	51.808	beta-Sesquiphellandrene	0.56
45	51.991	trans-gamma-Bisabolene	0.06
46	52.335	trans-Cadina-1,4-diene	0.12
47	52.593	alpha-Cadinene	0.19
48	52.799	trans-alpha-Bisabolene	0.44
49	53.906	Germacrene B	0.23
50	54.549	Maaliol	0.06
51	54.887	Caryophyllene alcohol	0.24
52	55.268	Caryophyllene oxide	0.12
53	56.589	Ledol	0.03
54	57.510	Widdrol isomer	0.04
55	57.611	Humulane-1,6-dien-3-ol	0.26
56	57.904	1-epi-Cubeno	0.04
57	58.685	alpha-Muurolo	0.04
58	58.793	epi-alpha-Muurolo	0.10
59	58.946	delta-Cadinol	0.12
60	59.446	alpha-Cadinol	0.12
			100.00



© Copyright 2020 Aromatic Plant Research Center. All rights reserved. Any publishing, copying, use, dissemination, or distribution of this report, including online, without the express written permission of Aromatic Plant Research Center is strictly prohibited.

ANEXO B – PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE



Aromatic Plant Research Center

We provide uncompromising
quality control for your products.

Customer: doTERRA International

Lot Number: 2183052

Date Filled: 43404

Column: ZB5 (60 m length × 0.25 mm inner diameter × 0.25 µm film thickness)

Instrument: Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra

Carrier gas: Helium 80 psi

Temperature ramp: 2 degrees celsius per minute up to 260-degrees celsius

Split ratio: 30:1

Sample preparation: 5%w/v solution with Dichloromethane.

Comments:

The analysis of this GINGER lot revealed no contaminants or adulteration.

The sample meets the expected chemical profile for authentic essential oils of *Zingiber officinale*.



© Copyright 2017 Aromatic Plant Research Center. All rights reserved.
Any publishing, copying, use, dissemination, or distribution of this report,
including online, without the express written permission of Aromatic Plant
Research Center is strictly prohibited.

© Copyright 2017 Aromatic Plant Research Center

aromaticplant.org

1 of 2

ANEXO C – PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA



Aromatic Plant Research Center

We provide uncompromising
quality control for your products.

Customer : doTERRA International
Lot Number : 2210191
Date Filled : 01/19/2021

Column : ZB5 (60 m length × 0.25 mm inner diameter × 0.25 µm film thickness)
Instrument : Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra
Carrier gas : Helium 80 psi
Temperature ramp : 2 degrees celsius per minute up to 260-degrees celsius
Split ratio : 30:1
Sample preparation : 5%w/v solution with Dichloromethane.



Comments:

The analysis of this Lavender lot revealed no contaminants or adulteration.
The sample meets the expected chemical profile for authentic essential oils of *Lavandula angustifolia*.

Analysied by : Ambika Poudel
Reviewed by : Dr. Prabodh Satyal



© Copyright 2021 Aromatic Plant Research Center. All rights reserved. Any publishing, copying, use, dissemination, or distribution of this report, including online, without the express written permission of Aromatic Plant Research Center is strictly prohibited.

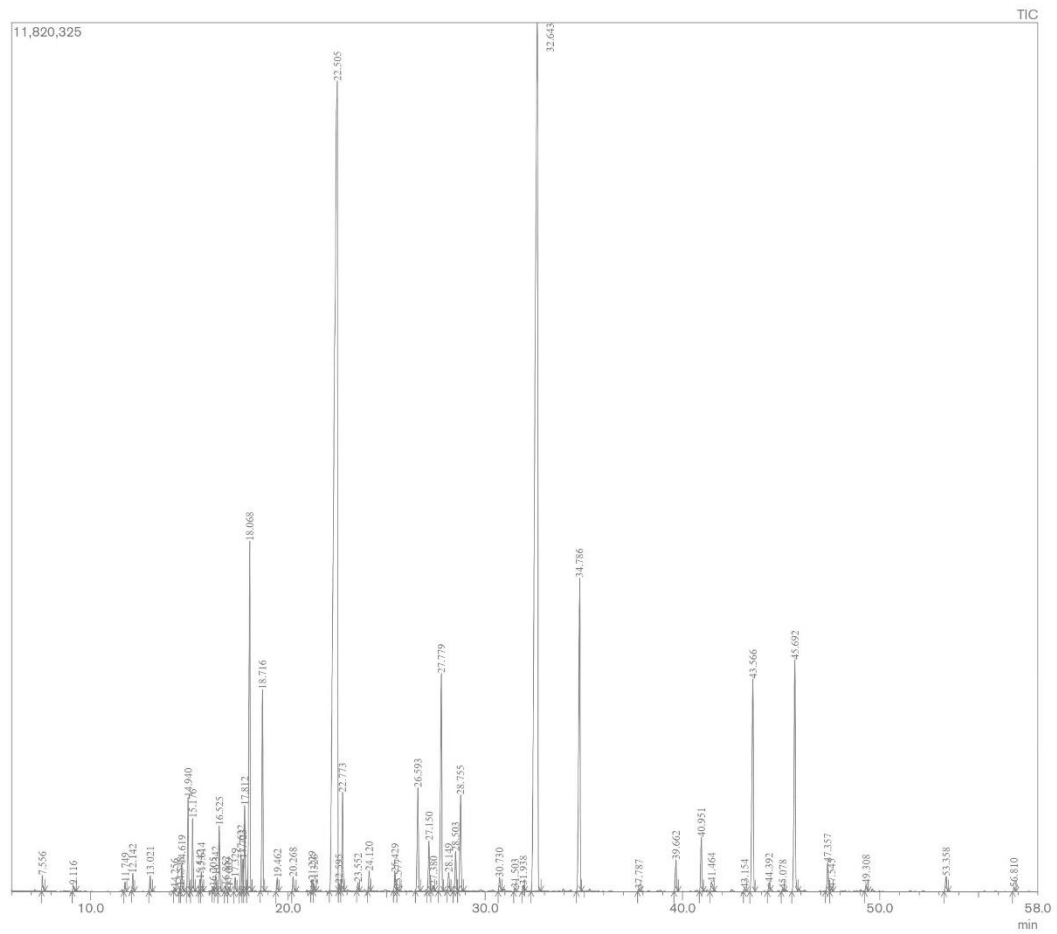
Lavender Essential Oil

Customer : doTERRA International

Lot Number : 2210191

Date Filled : 01/19/2021

Chromatogram



© Copyright 2021 Aromatic Plant Research Center. All rights reserved. Any publishing, copying, use, dissemination, or distribution of this report, including online, without the express written permission of Aromatic Plant Research Center is strictly prohibited.

Peak Report

Peak#	R.Time	Name	Area%
1	7.556	1-Methoxy hexane	0.15
2	9.116	n-Hexanol	0.08
3	11.749	alpha-Thujene	0.10
4	12.142	alpha-Pinene	0.19
5	13.021	Camphene	0.18
6	14.256	Sabinene	0.03
7	14.548	beta-Pinene	0.04
8	14.619	1-Octen-3-ol	0.33
9	14.940	3-Octanone	1.05
10	15.176	Myrcene	0.82
11	15.542	Butyl butanoate	0.13
12	15.614	3-Octanol	0.23
13	16.205	alpha-Phellandrene	0.04
14	16.342	delta-3-Carene	0.18
15	16.525	Hexyl acetate	0.76
16	16.852	alpha-Terpinene	0.06
17	17.009	meta-Cymene	0.05
18	17.329	para-Cymene	0.17
19	17.622	Limonene	0.46
20	17.723	beta-Phellandrene	0.38
21	17.812	1,8-Cineole	0.99
22	18.068	cis-beta-Ocimene	4.71
23	18.716	trans-beta-Ocimene	2.49
24	19.462	gamma-Terpinene	0.16
25	20.268	cis-Linalool oxide (furanoid)	0.20
26	21.229	Terpinolene	0.13
27	21.326	trans-Linalool oxide (furanoid)	0.10
28	22.505	Linalool	33.03
29	22.595	Hexyl propionate+Hotrienol	0.09
30	22.773	1-Octen-3-yl acetate	1.15
31	23.552	3-Octanol acetate	0.10
32	24.120	allo-Ocimene	0.24
33	25.429	Camphor	0.25
34	25.577	4-Isopropyl-3-cyclohexen-1-one	0.03
35	26.593	Lavandulol	1.49
36	27.150	Borneol	0.67
37	27.380	3-trans-5-cis-1,3,5-Undecatriene	0.07
38	27.779	Terpinen-4-ol	3.28
39	28.149	Cryptone	0.25
40	28.503	Hexyl butanoate	0.54
41	28.755	alpha-Terpineol	1.35
42	30.730	Nerol	0.19
43	31.503	Hexyl 2-methyl butanoate	0.04
44	31.938	Cumin aldehyde	0.09
45	32.643	Linalyl acetate	28.20
46	34.786	Lavandulyl acetate	5.00
47	37.787	Hexyl tiglate	0.03
48	39.662	Neryl acetate	0.42
49	40.951	Geranyl acetate	0.73
50	41.464	Hexyl hexanoate	0.19
51	43.154	cis-alpha-Bergamotene	0.04
52	43.566	beta-Caryophyllene	3.66
53	44.392	trans-alpha-Bergamotene	0.11
54	45.078	cis-beta-Farnesene	0.03
55	45.692	trans-beta-Farnesene	3.66
56	47.357	Germacrene D	0.41
57	47.545	trans-beta-Bergamotene	0.05
58	49.308	gamma-Cadinene	0.10
59	53.358	Caryophyllene oxide	0.23
60	56.810	epi-alpha-Cadinol	0.06
			100.00



© Copyright 2021 Aromatic Plant Research Center. All rights reserved. Any publishing, copying, use, dissemination, or distribution of this report, including online, without the express written permission of Aromatic Plant Research Center is strictly prohibited.