

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Bianca Carvalho da Silva

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE QUATRO SOLVENTES E UM  
SURFACTANTE, E DOS FENILPROPANOIDES EUGENOL E  
(*E*)-CINAMALDEÍDO SOBRE LARVAS E PUPAS DE *Musca domestica* LINNAEUS,  
1758 (DIPTERA: MUSCIDAE)**

Juiz de Fora

2016

Bianca Carvalho da Silva

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE QUATRO SOLVENTES E UM  
SURFACTANTE, E DOS FENILPROPANOIDES EUGENOL E  
(E)-CINAMALDEÍDO SOBRE LARVAS E PUPAS DE *Musca domestica* LINNAEUS,  
1758 (DIPTERA: MUSCIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Erik Daemon de Souza Pinto

Juiz de Fora

2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Bianca Carvalho da.

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE QUATRO SOLVENTES E UM SURFACTANTE, E DOS FENILPROPANOIDES EUGENOL E (E) CINAMALDEÍDO SOBRE LARVAS E PUPAS DE *Musca domestica* LINNAEUS, 1758 (DIPTERA: MUSCIDAE) / Bianca Carvalho da Silva. -- 2016.

72 f. : il.

Orientador: Erik Daemon de Souza Pinto

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2016.

1. mosca doméstica. 2. bioinseticidas. 3. solventes voláteis. 4. estágios imaturos. 5. contato tóxico. I. Pinto, Erik Daemon de Souza, orient. II. Título.

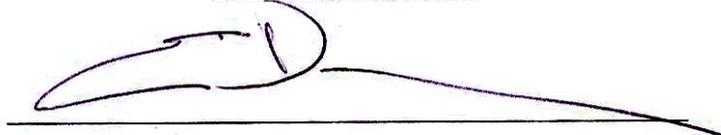
Bianca Carvalho da Silva

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE QUATRO SOLVENTES E UM  
SURFACTANTE, E DOS FENILPROPANOIDES EUGENOL E  
(E)-CINAMALDEÍDO SOBRE LARVAS E PUPAS DE *Musca domestica* LINNAEUS,  
1758 (DIPTERA: MUSCIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre.

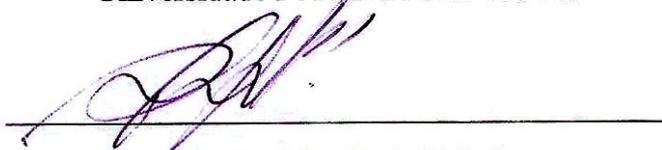
Aprovada em 24 de fevereiro de 2016.

Banca Examinadora:



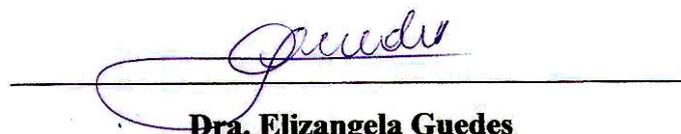
**Prof. Dr. Erik Daemon de Souza Pinto (Orientador)**

Universidade Federal de Juiz de Fora



**Dr. Rodrigo Luiz Fabri**

Universidade Federal de Juiz de Fora



**Dra. Elizangela Guedes**

Universidade Federal de Lavras

*Dedico esta dissertação aos meus pais José Afonso e  
Berenice, e ao meu irmão Alex, pelo apoio  
incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à minha família. Aos meus pais **José Afonso Dias da Silva** e **Berenice Carvalho da Silva**, por estarem sempre presentes no meu caminhar, sendo minha base e meu incentivo para seguir meus sonhos e por acreditarem em mim. Ao meu irmão **Alex Carvalho (Foffano) da Silva**, por sua simpatia, amizade, companheirismo e alegria que sempre me ajudaram a desestressar e ver que as coisas não precisam ser tão complicadas para darem certo. Aos meus tios e tias que sempre estiveram dispostos a se doarem tanto para me ajudar. Serei eternamente grata a vocês.

Agradeço ao meu orientador e amigo, professor **Dr. Erik Daemon**, pela oportunidade de realizar essa importante etapa em minha carreira científica. Pela confiança, apoio e bom humor que me ajudaram a enfrentar as dificuldades que encontrei.

Ao amigo doutorando **Diego Rodrigues Melo**, por todos os conselhos e apoio desde a criação da colônia de mosca até a análise dos dados, e pela amizade e compreensão.

Ao amigo doutorando **Ralph Maturano**, sempre disposto a ajudar, pelas sugestões e opiniões sinceras.

Aos demais amigos e pesquisadores do **Laboratório de Artrópodes Parasitos – LAP**, pelo companheirismo e disposição em sempre ajudar. Sem a ajuda de todos, este trabalho não poderia ter sido realizado.

A todos os professores que participaram da minha formação, que me auxiliaram ao longo dos meus estudos e que contribuíram para minha formação, tanto em conhecimento científico como pessoal.

À amiga **Nilhian Gonçalves de Almeida**, pelas longas horas de conversas sobre tudo, pelo seu exemplo pessoal que muito me serviu de inspiração. Sem o seu incentivo, eu não teria chegado até aqui.

Aos meus amigos **William** e **Raphaela**, que tiveram que lidar com minha ausência e mau humor nos últimos meses, sem deixar isso atrapalhar nossa amizade.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação, **Marlu** e **Osmar**, sempre dispostos a tirar dúvidas e resolver os problemas burocráticos em cima da hora.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

*“No momento em que você duvidar  
que pode voar, você deixará para  
sempre de ser capaz de fazê-lo.”*

*J.M. Barrie*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>Musca domestica</i> .....	20
<b>Figura 1.1.</b> Manutenção da Colônia de <i>Musca domestica</i> .....	34
<b>Figura 1.2.</b> Teste de contato com solventes e surfactante sobre larvas de <i>Musca domestica</i> .	36
<b>Figura 1.3.</b> Teste de contato com solventes e surfactante sobre pupas de <i>Musca domestica</i> ..	37
<b>Figura 2.1.</b> Teste de contato com eugenol e ( <i>E</i> )-cinamaldeído sobre larvas de <i>Musca domestica</i> .....	54
<b>Figura 2.2.</b> Teste de contato com eugenol e ( <i>E</i> )-cinamaldeído sobre pupas de <i>Musca domestica</i> .....	56
<b>Figura 2.3.</b> Efeitos morfológicos secundários observados após pupas de <i>Musca domestica</i> serem exposta ao contato com os fenilpropanoides eugenol e ( <i>E</i> )-cinamaldeído. ....	59

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.1.** Mortalidade de larvas pré-pupa de *Musca domestica* submetidas a solventes e surfactante em diferentes tempos de volatilização. ....38
- Tabela 1.2.** Mortalidade de pupas recuperadas da avaliação da sensibilidade de larvas pré-pupa de *Musca domestica* a solventes e surfactante em diferentes tempos de volatilização. ..39
- Tabela 1.3.** Percentual de Mortalidade Acumulada de larvas pré-pupa de *Musca domestica* submetidas a solventes e surfactante após diferentes tempos de volatilização. .... 39
- Tabela 1.4.** Mortalidade de pupas de *Musca domestica* submetidas a solventes e surfactante em diferentes tempos de volatilização.....40
- Tabela 2.1.** Média ( $\pm$  desvio padrão) da mortalidade larval (ML), mortalidade de pupas recuperadas (MPR) e eficácia do tratamento larval (ETL) de larvas de *Musca domestica* tratadas com diferentes concentrações dos fenilpropanoides eugenol e (E)-cinamaldeído em condições de laboratório ( $28\pm 2$  °C e umidade relativa de  $60\pm 10\%$ ). .....57
- Tabela 2.2.** Média ( $\pm$  desvio padrão) da mortalidade pupal (MP), percentual de má formação (PMF) e eficácia do tratamento pupal (ETP) de pupas de *Musca domestica* tratadas com diferentes concentrações dos fenilpropanoides eugenol e (E)-cinamaldeído em condições de laboratório ( $28\pm 2$  °C e umidade relativa de  $60\pm 10\%$ ). .....58
- Tabela 2.3.** Concentrações letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ) dos fenilpropanoides (E)-cinamaldeído e eugenol sobre larvas L3 pré-pupa de *Musca domestica* calculadas sobre a mortalidade larval e eficácia do tratamento larval, em condições de laboratório ( $28\pm 2$ °C e UR  $60\pm 10\%$ ). ..... 60
- Tabela 2.4.** Concentrações letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ) dos fenilpropanoides (E)-cinamaldeído e eugenol sobre pupas de 1-2 dias de *Musca domestica* calculadas sobre a mortalidade larval e eficácia do tratamento larval, em condições de laboratório ( $28\pm 2$ °C e UR  $60\pm 10\%$ ). ..... 60

## SUMÁRIO

RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	14
INTRODUÇÃO GERAL .....	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
1. Família Muscidae .....	18
2. <i>Musca domestica</i> .....	18
3. Controle .....	20
3.1 Inseticidas sintéticos .....	20
3.2 Inseticidas de origem vegetal .....	21
4. Uso de solventes e surfactantes em testes toxicológicos .....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	24
SEÇÃO 1 .....	30
SUSCEPTIBILIDADE DE LARVAS E PUPAS DE <i>Musca domestica</i> LINNAEUS, 1758 (DIPTERA: MUSCIDAE) A QUATRO SOLVENTES E UM SURFACTANTE .....	30
RESUMO .....	30
INTRODUÇÃO .....	32
MATERIAL E MÉTODOS .....	34
Local dos experimentos .....	34
Origem e manutenção da colônia de <i>Musca domestica</i> .....	34
Solventes e surfactante .....	34
Experimento com larvas .....	35
Experimento com pupas .....	36
Análise dos dados .....	38

<b>RESULTADOS</b> .....	38
<b>Experimento com larvas</b> .....	38
<b>Experimento com pupas</b> .....	40
<b>DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>CONCLUSÃO</b> .....	43
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	44
<b>SEÇÃO 2</b> .....	49
<b>ATIVIDADE INSETICIDA DOS FENILPROPANOIDES EUGENOL E (E)-CINAMALDEÍDO SOBRE LARVAS E PUPAS DE <i>Musca domestica</i> LINNAEUS, 1758 (DIPTERA: MUSCIDAE)</b> .....	49
<b>RESUMO</b> .....	49
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	51
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	53
<b>Local dos experimentos</b> .....	53
<b>Origem e manutenção da colônia de <i>Musca domestica</i></b> .....	53
<b>Procedência dos fenilpropanoides e preparação as formulações</b> .....	53
<b>Experimento com larvas</b> .....	53
<b>Experimento com pupas</b> .....	55
<b>Análise dos dados e determinação das concentrações letais</b> .....	56
<b>RESULTADOS</b> .....	57
<b>Experimento com larvas</b> .....	57
<b>Experimento com pupas</b> .....	58
<b>Determinação das concentrações letais</b> .....	60
<b>DISCUSSÃO</b> .....	61
<b>CONCLUSÃO</b> .....	63

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>72</b>

## RESUMO

*Musca domestica* é um importante vetor mecânico de diversos patógenos para humanos e animais de criação, sendo essencial o estudo de novas alternativas de controle mais eficientes e seguras para este díptero. A busca por novas alternativas de inseticidas envolve experimentos que geralmente necessitam do uso de solventes que não interfiram nos resultados da substância testada. Assim, o presente estudo compreendeu duas etapas: investigar a sensibilidade de larvas e pupas de *M. domestica* aos solventes acetona, etanol, metanol e dimetilsulfóxido (DMSO) e ao surfactante Tween 80 em diferentes tempos de volatilização; e avaliar a toxicidade dos fenilpropanoides eugenol e (*E*)-cinamaldeído sobre os mesmo estágios deste díptero. Para ambos os experimentos utilizou-se o teste de contato, com 10 repetições (n=10) para cada solvente/surfactante e concentração das substâncias sobre cada estágio. No primeiro experimento foram testados acetona, etanol e metanol em pureza analítica e DMSO e Tween 80 na concentração de 5%. Os tempos avaliados foram zero, cinco, 10 e 15 minutos ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $60\pm 10\%$  UR). Os resultados mostraram que o tempo de volatilização produz diferença significativa na mortalidade larval (ML) para os três primeiros solventes testados, e acetona mostrou-se semelhante ao controle após cinco minutos de volatilização ( $p>0,05$ ). Metanol e etanol mostraram-se semelhantes ao controle após 15 minutos de volatilização ( $p>0,05$ ). DMSO não apresentou ML significativa ( $p>0,05$ ), no entanto apresentou percentual de mortalidade acumulada (PMA) superiores a 14% ( $p<0,05$ ). Tween 80 não apresentou diferença na toxicidade sobre as larvas relacionada ao tempo. Para o teste com pupas somente etanol produziu diferença significativa entre os tempos de volatilização, enquanto acetona e metanol diferiram do controle em todos os tratamentos ( $p<0,05$ ). DMSO e Tween 80 não diferiram significativamente do controle em nenhum tempo ( $p>0,05$ ). O surfactante Tween 80 foi o único que não apresentou toxicidade para ambos os estágios na concentração testada, porém acetona foi o solvente que volatilizou mais rapidamente, mostrando menor toxicidade entre aqueles testados em pureza analítica. Para o segundo experimento, foram utilizadas oito concentrações de cada substância para a determinação das concentrações letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ). Eugenol apresentou os menores valores de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ , para a eficácia do tratamento larval (ETL) (1,5 e 3,75 mg/mL, respectivamente) enquanto (*E*)-cinamaldeído apresentou os menores valores de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  para a eficácia do tratamento pupal (ETP) (18,08 e 78,83 mg/mL, respectivamente). Ambas as substâncias apresentaram atividade larvicida a partir de 2,5 mg/mL e ETL de 100% a partir de 5 mg/mL. Para o tratamento pupal (*E*)-cinamaldeído diferiu do controle a partir da

concentração de 10mg/mL ( $p < 0,05$ ) e ambos os fenilpropanoides causaram má formação em adultos a partir de 10 mg/mL, e maior ETP na concentração de 30 mg/mL, sendo 67,2% para (*E*)-cinamaldeído e 32% para eugenol. Os produtos testados nesse estudo apresentaram elevado potencial larvicida, além de ambos apresentarem efeitos pupicida e causarem má formação nos adultos provenientes de pupas tratadas. Ainda, é possível sugerir a utilização conjunta de ambas substância para um controle mais eficiente, visto que (*E*)-cinamaldeído apresentou melhor atividade larvicida, enquanto eugenol teve melhor atividade pupicida. Desta forma, esses fenilpropanoides mostrando-se promissores para o uso no desenvolvimento de formulações mais seguras para a saúde e meio ambiente, sendo possível sua utilização em estratégias de Manejo Integrado de Pragas.

**Palavras chave:** mosca doméstica, bioinseticidas, solventes voláteis, estágios imaturos, contato tóxico, pesticida natural

## ABSTRACT

*Musca domestica* is an important mechanical vector of several pathogens to humans and domestic animals, being essential to study new alternatives to efficient and safe control against this Diptera. The search for new insecticides alternative involves experiments that generally require the use of solvents that should not interfere in the results of the test substance. Thus, this study involved two stages: to investigate the sensitivity of *M. domestica* larvae and pupae to the solvents acetone, ethanol, methanol and dimethylsulfoxide (DMSO) and the surfactant Tween 80 at different times of volatilization; and evaluating toxicity of phenylpropanoid eugenol and (*E*)-cinnamaldehyde against the same stages of this Diptera. For both experiments were used the patch test with 10 repetitions (n=10) for each solvent/surfactant and concentration of substances against each stage. In the first experiment acetone, ethanol and methanol were tested in analytical purity while DMSO and Tween 80 at the concentration of 5%. The times evaluated were zero, five, 10 and 15 minutes ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  and  $60\pm 10\%$  RH). The results showed that the volatilization time produces significant difference in larval mortality (LM) for the first three solvents tested, and acetone was similar to the control after five minutes volatilization ( $p>0.05$ ). Methanol and ethanol were similar to the control after 15 minutes of evaporation ( $p>0.05$ ). DMSO showed no significant LM ( $p>0.05$ ), but its accumulated mortality percentual (AMP) was over 14% ( $p<0.05$ ). Tween 80 showed no difference in toxicity against larvae related to time. For the pupae test only ethanol produced significant difference between the evaporation time, while acetone and methanol differed from the control in all treatments ( $p<0.05$ ). DMSO and Tween 80 did not differ significantly from control at any time ( $p>0.05$ ). The surfactant Tween 80 was the only one that showed no toxicity for both stages at the concentration tested, however the solvent acetone was volatilized more quickly, showing lower toxicity among those tested in analytical purity. For the second experiment, we used eight concentrations of each substance for the determination of lethal doses ( $\text{LC}_{50}$  and  $\text{LC}_{90}$ ). Eugenol showed the lowest values of  $\text{LC}_{50}$  and  $\text{LC}_{90}$  for the effectiveness of larval treatment (ELT) (1.5 and 3.75 mg/mL, respectively) while (*E*)-cinnamaldehyde had the lowest values of  $\text{LC}_{50}$  and  $\text{LC}_{90}$  for effectiveness of pupal treatment (EPT) (18.08 and 78.83 mg/mL, respectively). Both substances exhibited larvicidal activity from 2.5 mg/mL and ELT of 100% from 5 mg/mL. For pupal treatment (*E*)-cinnamaldehyde differed from the control from the concentration of 10mg/mL ( $p < 0.05$ ) and both phenylpropanoid caused malformation in adults from 10 mg/mL. The greater EPT was from concentration of 30 mg/mL, being 67.2% for (*E*)-cinnamaldehyde and 32% for eugenol.

The products tested in this study had high potential larvicide, and both present pupicida effects and cause malformation in adults from treated pupae. Still, it is possible to suggest the combined use of both substances for more efficient control, as (*E*)-cinamaldehyde showed better larvicidal activity, while eugenol had better pupicida activity. Thus, using these phenylpropanoids show promise in the development of safer formulations for health and the environment, and these could be used in Integrated Pest Management strategies.

**Keywords:** housefly, biopesticides, volatile solvents, toxic contact, immature stages, natural pesticide

## INTRODUÇÃO GERAL

*Musca domestica* Linnaeus, 1758 é um díptero pertencente à família Muscidae, única do gênero encontrada no Brasil e América do Sul (Carvalho, 2002). Essa mosca é cosmopolita, altamente sinantrópica, estando presente tanto em áreas urbanas como rurais, associada principalmente à criação de animais de importância econômica (Carrera, 1991; Malik et al., 2007). Seus hábitos alimentares e reprodutivos a associam a ambientes de baixa sanitização, tornando-a importante vetor mecânico de diversos organismos patogênicos como vírus, bactérias, riquetsias, protozoários e helmintos (Malik et al., 2007; Palacios et al., 2009). Exerce papel de hospedeiro intermediário de alguns helmintos de importância veterinária (Neves, 2005). Além disso, pode carrear ovos de larvas de *Dermatobia hominis* e é a principal praga da avicultura (Fotadar et al., 1992; Braverman et al., 1999).

O controle convencional deste díptero é feito com o uso de inseticidas sintéticos a base de compostos como carbamatos e piretroides, disponíveis comercialmente em forma de iscas, para aplicação tópica ou fumigação. Esses inseticidas vêm sendo utilizados continuamente e de forma indiscriminada ao longo das últimas décadas, levando a seleção de populações resistentes, além de prejuízos para o meio ambiente e a saúde humana (Palacios et al., 2009; Acevedo et al., 2009; Kumar et al., 2011). Assim, a busca por inseticidas alternativos levou a pesquisas com óleos essenciais e seus constituintes, mais especificamente terpenos naturais, como uma solução viável e ecologicamente mais segura aos inseticidas convencionais (Isman, 2000; Isman, 2006; Malik et al., 2007; Kumar et al., 2012). Essas substâncias apresentam baixa toxicidade a mamíferos, além de serem biodegradáveis, permanecendo pouco tempo no ambiente, e suas propriedades inseticidas e/ou repelentes já são conhecidas desde a antiguidade (Burt, 2004; Regnault-Roger et al., 2012; Pavela, 2015).

Investigações laboratoriais em busca de substâncias com atividade inseticida necessitam da utilização de solventes e surfactantes para permitir uma aplicação homogênea da substância sobre o organismo utilizado como modelo biológico (Resende et al., 2012; Sharma et al., 2012). Solventes são substâncias utilizadas para solubilizar ou dispersar outras substâncias em seu meio, facilitando sua dispersão ou aplicação, podendo ser polar ou apolar. Surfactantes, ou tensoativos, são moléculas que possuem atividade detergente devido a apresentar uma extremidade polar e outra apolar; atuam envolvendo outras substâncias em aglomerados chamados micelas, facilitando sua dispersão em um meio de polaridade

diferente. O veículo utilizado não pode apresentar toxicidade sobre o organismo alvo, de modo a não interferir nos resultados obtidos para a substância testada (Chagas et al., 2003; Gonçalves et al., 2007). Tal fato ressalta a importância da escolha do solvente ou surfactante apropriado para o modelo biológico que se pretende utilizar.

Os fenilpropanoides são substâncias aromáticas presentes nos óleos essenciais e atuam contra herbivoria e patógenos nas plantas (Pavela, 2010). Suas propriedades toxicológicas e antimicrobianas já foram comprovadas sobre bactérias, fungos, nematoides, ácaros e insetos (Ali et al., 2005; He et al., 2012; Islam et al., 2009; Monteiro et al., 2012; Yeom et al., 2013; Senra et al., 2013a; Jumbo et al., 2014). O eugenol é um fenilpropanoide presente em algumas plantas das famílias Myrtaceae, Lauraceae e Lamiaceae, conhecido principalmente por seu uso em procedimentos odontológicos, e que apresenta atividade biocida sobre diversos organismos já citados. O óleo essencial de plantas do gênero *Cinnamomum*, por exemplo a canela, tem atividade antimicrobiana, acaricida e inseticida reconhecidas na literatura, e seu constituinte majoritário é o (*E*)-cinamaldeído, um fenilpropanoide extensivamente utilizado na aromatização de alimentos e bebidas, além da produção de produtos farmacêuticos e cosméticos (Ali et al., 2005; Senra et al., 2013b).

Estudos relacionados ao controle de *Musca domestica* através da utilização de óleos essenciais e seus constituintes muitas vezes visam o controle de adultos por meio da aplicação tópica ou fumigação (Mohottalage et al., 2007; Pavela 2008; Palacios et al., 2009; Tarelli et al., 2009; Pavela, 2011; Rossi et al., 2012). Sabe-se que os estágios de larva e pupa representam até 85% da população real deste díptero, entretanto esses estágios são negligenciados (Kumar et al., 2012). Assim, o presente estudo constituiu-se de duas etapas: a avaliação da toxicidade de solventes e um surfactante comumente utilizados com o objetivo de identificar aquele menos tóxico e mais eficiente para experimentação com larvas e pupas de *M. domestica*; e a avaliação da toxicidade de eugenol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas e pupas de *M. domestica* através da aplicação tópica.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Família Muscidae

A família Muscidae (Diptera) é considerada cosmopolita devido ao fato de estar presente em todas as regiões biogeográficas do globo, com 196 gêneros englobando 5.155 espécies (Carvalho et al., 2012). Na região Neotropical a família está representada por mais de 800 espécies (Carvalho et al., 1993; Carvalho et al., 2012). Relativamente bem estudada em comparação com outros grupos de Diptera, na região Neotropical o conhecimento sobre sua distribuição e biogeografia ainda é vago (Carvalho, 2002; Haseyama et al., 2015). Atualmente, os estudos sobre a biogeografia da família tem focado em reconhecer os padrões de distribuição dos gêneros e utilizar esse conhecimento para hipotetizar como os processos de transformação da Terra levaram a esses padrões (Löwenberg-Neto e Carvalho, 2009).

Possuindo hábitos extremamente variados, a maioria dos muscideos se alimenta e se reproduz em matéria orgânica em decomposição; no entanto, algumas são pragas primárias de plantações, enquanto outras podem causar miíases (Carvalho et al., 2012). Dentre os vários gêneros, algumas espécies têm hábitos sinantrópicos, podendo apresentar importância médico-sanitária e veterinária (Carvalho et al., 2002). *Musca domestica* Linnaeus, 1758, é a espécie mais conhecida devido ao alto grau de sinantropismo e importância médica e veterinária como vetor mecânico de patógenos (Palacios et al., 2009).

### 2. *Musca domestica*

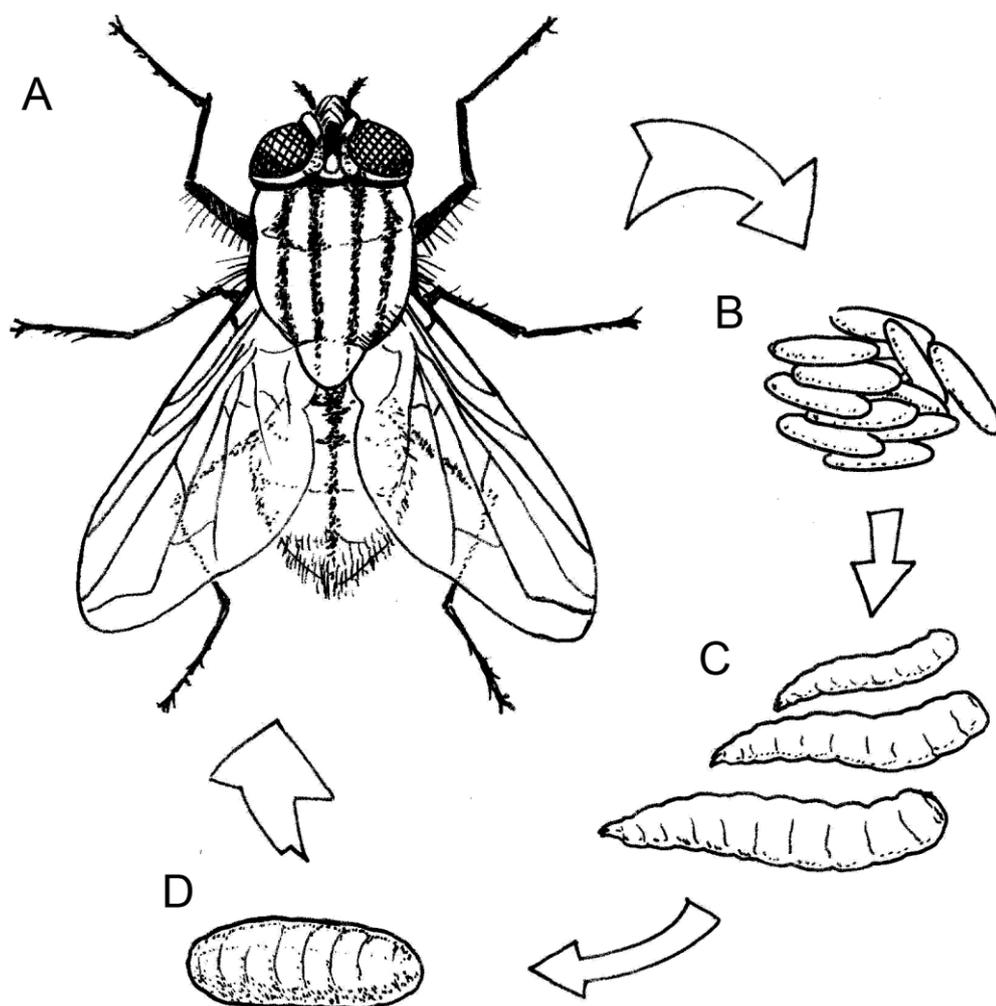
A mosca doméstica, *Musca domestica* Linnaeus, 1758, é representante da família Muscidae e única espécie do gênero no Brasil e América do Sul (Carvalho, 2002). A espécie tem distribuição cosmopolita, presente em todas as regiões do globo com exceção dos polos, apresentando maior abundância nas regiões tropicais. Deve seu nome ao seu hábito altamente sinantrópico, sendo a espécie mais abundante em áreas habitadas, estando diretamente associada com a presença de áreas propícias para criadouros e alimentação (Hewitt, 1914; Keiding, 1986).

Morfológicamente, a espécie se distingue dos demais representantes da família Muscidae por possuir torax acimentado com quatro listras negras longitudinais, abdome amarelo, marcado dorsalmente com uma linha escura (Hewitt, 1914). Seu aparelho bucal é do

tipo lambedor-sugador, adaptado para a absorção de alimentos líquidos ou liquefeitos, sendo incapaz de ingerir alimentos sólidos (Hewitt, 1914). Uma característica marcante é a veia M1 fortemente curvada para o ápice em um ângulo de 90°, e calíptera inferior larga (Carvalho, 2002). Apresentam dimorfismo sexual claro, sendo a fêmea dicóptica (olhos separados) e o macho holóptico (olhos juntos), com as fêmeas sendo ligeiramente maiores que os machos (Hewitt, 1914).

Como a maioria dos insetos, seu desenvolvimento está relacionado às condições ambientais e quando em temperatura e umidade ideais, o ciclo biológico da *M. domestica* é relativamente rápido, durando aproximadamente 15 dias (Hewitt, 1914; Carrera, 1991) (Figura 1). A fêmea adulta pode fazer de cinco a seis posturas ao longo da vida, depositando a cada vez um conjunto de cerca de 120 ovos em matéria orgânica em decomposição, que servirá de alimento para as larvas. A larva ápole eclode após 8 a 24 horas, passando por duas ecdises nos próximos cinco dias, quando finalmente abandona o meio onde se alimentou e busca um local seco e abrigado para empupar. O pupário é formado pela última ecdise larval, que se contrai e endurece, protegendo a larva que formará a pupa. Neste ponto, o desenvolvimento até a emergência do adulto dura em média quatro dias em condições ideais. O adulto recém emergido é pálido e suas asas aparentam ser atrofiadas, motivo que leva o inseto a buscar um local seguro até que seu exoesqueleto se enrijeça e escureça, e suas asas se destendam (Hewitt, 1914; Keiding, 1986).

Devido aos seus hábitos de se alimentar e reproduzir em ambientes com acúmulo de resíduos orgânicos, a mosca doméstica é geralmente associada a doenças e condições de baixa sanitização. Estes hábitos contribuem para a aquisição de patógenos em fontes contaminadas, de forma que este díptero é vetor mecânico de mais de 100 agentes causadores de doenças como salmonelose, cólera e shigelose (Palacios et al., 2009); atua também como hospedeiro intermediário de endoparasitos como *Habronema* sp., que parasita equinos, e *Railletina* sp. em aves (Carrera, 1991; Fotedar et al., 1992; Neves, 2005), além de ter subestimado seu potencial como vetor de agentes causadores da mastite bovina, como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, responsável por prejuízos econômicos significativos na produção animal (Braverman et al., 1999). Sua presença em grande quantidade causa incômodo e estresse a animais de produção e ao homem, levando à perda de rendimento e afetando o bem-estar destes (Carrera, 1991).



**Figura 1. Ciclo de vida de *Musca domestica*.** A: Adulto (fêmea). B: Aglomerado de ovos. C: Larvas ápodas passam por duas ecdises, apresentando três instares. D: Pupa.

### 3. Controle

#### 3.1 Inseticidas sintéticos

O controle da mosca doméstica é feito principalmente através da utilização de inseticidas sintéticos aplicados de forma tópica, por fumigação ou através de iscas atrativas para os adultos (Malik et al., 2007). Esses pesticidas começaram a ser desenvolvidos e utilizados desde a Segunda Guerra Mundial, derivados do petróleo e químicos como carbamatos, organoclorados e organofosforados, e seu uso extensivo logo começou a mostrar os impactos ambientais, além de toxicidade para o ser humano. Ao mesmo tempo, percebia-se os primeiros problemas ecológicos, como o surgimento de linhagens resistentes, tornando esses produtos ineficientes em poucos anos de uso (Geden, 2012). Na década de 1970, com o

desenvolvimento de inseticidas piretroides, este quadro não mudou, com as moscas desenvolvendo resistência a esses novos produtos em pouco tempo. O uso contínuo destes químicos, em doses cada vez maiores e o longo período de permanência de seus resíduos no ambiente apenas serviram para agravar o problema, resultando em maiores índices de contaminação ambiental, além de rápida perda de eficiência destes produtos (Keiding, 1986; Geden, 2012).

Durante os anos seguintes, diversos novos inseticidas foram introduzidos no mercado, possibilitando o controle de populações de moscas por um tempo, e se mostrando promissores. Como por exemplo as iscas de espinosinas, neonicotinoides, imidaclopridos e nitiazinas que, embora fossem altamente efetivos quando introduzidos no mercado, casos de populações resistentes foram documentados quase que imediatamente ao início do seu uso (Geden, 2012). Após algum tempo, a introdução de novos inseticidas e novas bases no mercado tem se tornado mais difícil, seja devido à dificuldade de descobrir novas fórmulas ou ao alto custo para sua produção em larga escala, assim como leis que passaram a ser implementadas como uma forma de regulamentar e proibir a comercialização e utilização de produtos prejudiciais à saúde e ao meio ambiente (Isman, 2006). Essas leis levaram à proibição de grande parte dos produtos produzidos antes da década de 1980, reduzindo a disponibilidade de produtos eficientes e levando a um momento propício para a busca de inseticidas alternativos que representassem maior segurança para a saúde e de baixo impacto ambiental (Isman, 2006; Geden, 2012). Uma das alternativas que tem se mostrado vantajosa desde então é a utilização de substâncias de origem vegetal, produzidos por plantas em seu metabolismo secundário e utilizados como mecanismo de defesa contra a herbivoria principalmente por insetos. Essas substâncias estão presentes em grande parte nos óleos essenciais (Isman, 2000; Isman, 2006).

### 3.2 Inseticidas de origem vegetal

Muitas plantas angiospermas produzem em seu metabolismo substâncias aromáticas voláteis que conferem a elas sabor, odor e essência característicos, sendo estas muitas vezes referidas como metabólitos secundários, que compõem os óleos essenciais (Koul et al., 2008; Pavela, 2015). Esses óleos podem estar presentes em várias partes de uma mesma planta, apresentando características, composição e funções distintas. Na planta, atuam como repelentes ou atrativos de insetos, proteção contra variação de temperatura, ou como defesa

contra hebilidade (Koul et al., 2008). Para humanos, essas substâncias têm sido utilizados por séculos para fins diversos, desde aditivos alimentares, temperos, perfumes, cosméticos, resinas e inclusive como repelentes e inseticidas (Pavela, 2015).

O uso de óleos essenciais é mencionado em Roma e Grécia por historiadores, e sua extração por meio da destilação é documentada há mais de 2000 anos, no Egito, Índia e Pérsia, e foi aprimorado pelos árabes no século IX (Burt, 2004). No entanto, a primeira descrição detalhada deste processo data do século XII na Andalusia, Espanha, e desde então os óleos essenciais foram incluídos como produtos farmacológicos na Europa (Regnault-Roger et al., 2012). Atualmente, este método foi aprimorado e é utilizado para produção industrial (Pavela, 2013). Alguns destes óleos e extratos apresentam atividade biológica contra patógenos e pragas, como bactérias, vírus e artrópodes, e seu uso como pesticida remonta de séculos atrás. Entretanto, desde o surgimento dos inseticidas sintéticos, pesquisas com extratos botânicos e óleos essenciais foram deixadas de lado, até o surgimento de populações de pragas resistentes e problemas ambientais da década de 1970 (Geden, 2012).

Nos Estados Unidos, leis como a *Food Quality Protection Act* de 1996 restringiram o uso de inseticidas convencionais, enquanto a *United States Environmental Protection Agency* isentava de registro e de requerimento de dados de toxicidade pesticidas que possuíam em sua composição substâncias utilizadas em processamento de alimentos e bebidas, incentivando pesquisas e criando oportunidades para o uso de substâncias naturais no desenvolvimento de pesticidas de risco reduzido (Isman, 2000; El-Wakeil, 2013). Assim, devido às leis mais rigorosas que surgiram para regulamentar o uso de inseticidas sintéticos, a utilização de óleos extraídos de plantas e seus constituintes voltou a se mostrar uma alternativa interessante como inseticidas ambientalmente mais seguros (Isman, 2006; Pavela, 2015).

As moléculas constituintes dos óleos essenciais geralmente apresentam ação em doses baixas, e por serem biodegradáveis, são uma alternativa ecologicamente segura às moléculas sintéticas, além de terem ação específica, afetando uma gama mais restrita de organismos e apresentando baixa toxicidade a vertebrados (Isman, 2000; Burt, 2004; Regnault-Roger et al., 2012).

#### **4. Uso de solventes e surfactantes em testes toxicológicos**

Durante o processo de extração do óleo essencial para a produção de extratos vegetais, um ou mais solventes são utilizados. Ainda, para investigações toxicológicas e avaliação da

atividade inseticida de substâncias de origem vegetal, vários solventes e surfactantes podem ser utilizados com o propósito de solubilizar e permitir uma aplicação mais homogênea da substância sobre um organismo usado como modelo biológico (Singh e Jain, 1987). Porém, muitos dessas substâncias podem ser tóxicas para o organismo alvo, levando a falsos resultados durante a experimentação (Singh e Jain, 1987; Resende et al., 2012).

Um dos primeiros trabalhos com solventes utilizando *M. domestica* como modelo biológico data de 1958, quando Hadaway e Barlow avaliaram a potencialização de inseticidas sintéticos por meio da adição de diferentes solventes quando aplicados em moscas adultas. Posteriormente, Schouest et al. (1983) avaliaram a influência de solventes na deposição de inseticidas sobre a cutícula de adultos de *M. domestica*, mas novamente não avaliando o efeito tóxico do solvente isoladamente. Apenas em 1987 um estudo que avaliava a toxicidade de diversos solventes sobre adultos de mosca doméstica por meio de aplicação tópica foi publicado, e a partir de então não foram publicados outros estudos semelhantes com moscas (Singh e Jain, 1987).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, G.R., ZAPATER, M., TOLOZA, A.C. Insecticide resistance of house fly, *Musca domestica* (L.) from Argentina. **Phytotherapy Research**, v.105(2), p.489–493, 2009.

ALI, S. M., KHAN, A. A., AHMED, I., MUSADDIQ, M., AHMED, K. S., POLASA, H. Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.43(10), p.5275-5277, 2005.

BRAVERMAN, Y., CHIZOV-GINZBURG, A., SARAN, A., WINKLER, M. The role of houseflies (*Musca domestica*) in harbouring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel. **Revue Scientifique et Technique**, v.18, p.681–690, 1999.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223– 253, 2004.

CARRERA, M. **Insetos de interesse médico e veterinário**. Curitiba: Ed. UFPR; Brasília. 228p, 1991.

CARVALHO, C. J. B., RAFAEL, J. A., COURI, M. S. E SILVA, V. C. **Diptera**, p. 701-743. *In*: Rafael, J.A; Melo, G.A.R.; Carvalho, C.J.B; Casari, S.A. e Constantino, R. Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. Holos Editora Ltda-ME, 810p, 2012.

CARVALHO, C. J. B., MOURA, M. O., RIBEIRO, P. B. Chave para identificação de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.46(2), p.107-114, 2002.

CARVALHO, C.J.B. DE, COURI, M.S., PONT, A.C., PAMPLONA, D., LOPES SM. Part II. **Muscidae**, 201 pp. *In*: Carvalho, C.J.B. de, A Catalogue of the Fanniidae and Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region. Sociedade Brasileira de Entomologia, 1993.

CARVALHO, C.J.B. **Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: taxonomy**. Editora UFPR, 2002.

CHAGAS, A.C.S., LEITE, R.C., FURLONG, J., PRATES, H.T., PASSOS, W.M. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. **Ciência Rural**, v.33(1), p.109-114, 2003.

EL-WAKEIL, N.E. Botanical Pesticides and Their Mode of Action. **Gesunde Pflanzen**, v.65(4), p.125, 2013.

FOTEDAR, R., BANERJEE, U., SINGH, S., SHRINIWAS, VERMA, A.K. The housefly (*Musca domestica*) as a carrier of pathogenic microorganisms in a hospital environment. **Journal of Hospital Infection**, v.20, p.209-215, 1992.

GEDEN, C.J. Status of biopesticides for control of house flies. **Journal of Biopesticides**, v.5 (Complementary), p.1-11, 2012.

GONÇALVES, K., TOIGO, E., ASCOLI, B., VON POSER, G., RIBEIRO, V.L. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, v.100(6), p.1267-1270, 2007.

HADAWAY, A.B. E BARLOW, F. Some aspects of the effect of the solvent on the toxicity of solutions of insecticide. **Annals of Applied Biology**. V.46(2), p.133-148, 1958.

HASEYAMA, K.L.F., PEREIRA-COLAVITE, A., de CARVALHO, C.J.B. New distribution records for Muscidae (Insecta: Diptera) in Latin America. **Check List**, v.11(6), p.1810, 2015.

HE, M., DU, M., FAN, M., BIAN, Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v.163(3), p.137-43, 2012.

HEWITT, C.G. The house-Fly, *Musca domestica* Linn. Its structure, habits, development, relation to disease and control. **The American Journal of the Medical Sciences**, v.151(2), p.278, 1914.

ISLAM, R., KHAN, R. I., AL-REZA., S. M., JEONG, Y. T., SONG, C. H., KHALEQUZZAMAN, M. Chemical composition and insecticidal properties of *Cinnamomum aromaticum* (Nees) essential oil against the stored product beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, p.1241–1246, 2009.

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

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, 51:45-66, 2006.

JUMBO, L. O. V., FARONI, L. R. A., OLIVEIRA, E. E., PIMENTEL, M. A., SILVA, G. N. Potential use of clove and cinnamon essential oils to control the beanweevil, *Acanthoscelides obtectus* Say, in small storage units. **Industrial Crops and Products**, v.56, p.27–34, 2014.

KEIDING, J. **The house fly: biology and control**. World Health Organization, UBC/76650, 82p, 1986.

KOUL, O., WALIA, S., DHALIWAL, G. S. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. **Biopesticides International**, v.4(1), p.63–84, 2008.

KUMAR, P., MISHRA, S., MALIK, A., SATYA, S. Repellent, larvicidal and pupicidal properties of essential oils and their formulations against the housefly, *Musca domestica*. **Medical and Veterinary Entomology**, v.25(3), p.302-310, 2011.

KUMAR, P., MISHRA, S., MALIK, A., SATYA, S. Efficacy of *Mentha x piperita* and *Mentha citrata* essential oils against housefly, *Musca domestica* L. **Industrial Crops and Products**, v.39(0), p.106-112, 2012.

LÖWENBERG-NETO, P. E DE CARVALHO, C. J. B. Areas of endemism and spatial diversification of the Muscidae (Insecta: Diptera) in the Andean and Neotropical regions. **Journal of Biogeography**, v.36, p.1750–1759, 2009.

MALIK, A., SINGH, N. E SATYA, S. House fly (*Musca domestica*): a review of control strategies for a challenging pest. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.42(4), p.453-469, 2007.

MOHOTTALAGE,S., TABACCHI, R. E GUERIN, P. M. Components from Sri Lankan Piper betle L. leaf oil and their analogues showing toxicity against the housefly, *Musca domestica*. **Flavour and Fragrance Journal**, v.22, p.130–138, 2007.

MONTEIRO, C. M. O., MATURANO, R., DAEMON, E., CATUNDA-JUNIOR, F. E. A., CALMON, F., SENRA, T. S., FAZA, A., CARVALHO, M. G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v.111(3), p.1295-300, 2012.

NEVES, D.P. **Muscomorpha**, p. 379-387. In: Neves, D.P. (Ed.). *Parasitologia humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 494p, 2005.

PALACIOS, S. M., BERTONI, A., ROSSI, Y., SANTANDER, R., URZÚA, A. Insecticidal activity of essential oils from native medicinal plants of Central Argentina against the house fly, *Musca domestica* (L.). **Parasitology Research**, v.106(1), p.207-212, 2009.

PAVELA, R. Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.). **Phytotherapy Research**, 22:274-278, 2008.

PAVELA, R. Acute and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the larvae of *Spodoptera littoralis*. **Journal of Biopesticides**, v.3(3), p.573–578, 2010.

PAVELA, R. Insecticidal properties of phenols on *Culex quinquefasciatus* Say and *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, v.109(6), p.1547-1553, 2011.

PAVELA, R. Efficacy of naphthoquinones as insecticides against the house fly, *Musca domestica* L. **Industrial Crops and Products**, v.43(0), p.745-750, 2013.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Industrial Crops and Products**, v.76, p.174–187, 2015.

REGNAULT-ROGER, C., VINCENT, C. E. ARNASON, J. T. Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. Annual **Review of Entomology**, v.57, p.405-424, 2012.

RESENDE, J.D., DAEMON, E., MONTEIRO, C.M., MATURANO, R., PRATA, M.C., FERREIRA RODRIGUES, A.F. Toxicity of solvents and surfactants to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) larvae. **Experimental Parasitology**. V.131, p.139–142, 2012.

ROSSI, Y. E., CANAVOSO, L., PALACIOS, S.M. Molecular response of *Musca domestica* L. to *Mintostachys verticillata* essential oil, (4R) (+)-pulegone and menthone. **Fitoterapia**, v.83(2), p.336-342, 2012.

SCHOUEST, L.P., UMETSU, N., MILLER, T.A. Solvent-modified deposition of insecticides on house fly (Diptera: Muscidae) cuticle. **Journal of Economic Entomology**, v.76(5), p.973-982, 1983.

SENRA, T. O. S., CALMON, F., ZERINGOTA, V., MONTEIRO, C. M. O., MATURANO, R., MATOS, R., MELO, D., GOMES, G., CARVALHO, M., DAEMON, E. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.112(10), p.3471-6, 2013a.

SENRA, T. O. S., ZERINGOTA, V., MONTEIRO, C. M. O., CALMON, F., MATURANO, R., GOMES, G. A., FAZA, A., CARVALHO, M. G., DAEMON, E. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (E)-cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.112(4), p.1461-1466, 2013b.

SHARMA, A.K., KUMAR, S., TIWARI, S.S., SRIVASTAVA, S., KUMAR, R., RAY, D.D., CHAUDHURI, P., RAWAT, A.K.S., BANDYOPADHYAY, A., GHOSH, S. Comparative acaricidal properties of different solvents and surfactants on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **The Indian Journal of Animal Sciences**, V.82(2), p.154–158, 2012.

SINGH, D. E JAIN, D.C. Relative toxicity of various organic solvents generally used in screening plant products for insecticidal activity against the house fly *Musca domestica* L. **Indian Journal of Experimental Biology**, 25. pp. 569-570, 1987.

TARELLI, G., ZERBA, E. N., ALZOGARAY, R. A. Toxicity to vapor exposure and topical application of essential oils and monoterpenes on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, v.102(3), p.1383-1388, 2009.

YEOM, H. J., KANG, J., KIM, S. W., PARK, I. K. Fumigant and contact toxicity of Myrtaceae plant essential oils and blends of their constituents against adults of German cockroach (*Blattella germanica*) and their acetylcholinesterase inhibitory activity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.107, p.200–206, 2013.

## SEÇÃO 1

### SUSCEPTIBILIDADE DE LARVAS E PUPAS DE *Musca domestica* LINNAEUS, 1758 (DIPTERA: MUSCIDAE) A QUATRO SOLVENTES E UM SURFACTANTE

#### RESUMO

A busca por novos inseticidas sintéticos ou naturais envolve experimentos que geralmente necessitam do uso de solventes e surfactantes. Assim, espera-se que o solvente utilizado apresente baixa ou nenhuma toxicidade para o organismo alvo. O objetivo deste estudo foi verificar a sensibilidade de larvas e pupas de *M. domestica* aos solventes acetona, etanol, metanol e dimetilsulfóxido (DMSO) e ao surfactante Tween 80 em diferentes tempos de volatilização. Utilizou-se o teste de contato, com 10 repetições (n=10) de cada solvente/surfactante para cada estágio. Acetona, etanol e metanol foram testados em pureza analítica e DMSO e Tween 80 foram testados na concentração de 5%. Como controle utilizou-se água destilada. Os tempos avaliados foram zero, cinco, 10 e 15 minutos ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $60 \pm 10\%$  UR). Avaliou-se a mortalidade larval (ML) após 48 horas e as larvas sobreviventes foram acompanhadas até a emergência do adulto, obtendo-se o percentual de mortalidade acumulada (PMA). No experimento com pupas avaliou-se a mortalidade pupal (MP) após seis dias. Os resultados mostram que o tempo de volatilização produz diferença significativa na ML para os três primeiros solventes testados, e acetona mostrou-se semelhante ao controle após 5 minutos de volatilização ( $p > 0,05$ ). Metanol causou ML de 100% para 0 e 5 minutos, e 23% para 10 minutos ( $p < 0,05$ ), e PMA de 42%. Para etanol verificou-se ML de 100% para os três primeiros tempos testados. DMSO não apresentou ML significativa ( $p > 0,05$ ), no entanto apresentou PMA superiores a 14% ( $p < 0,05$ ). Tween 80 não apresentou diferença na toxicidade sobre as larvas relacionada ao tempo. Para o teste com pupas somente etanol produziu diferença significativa entre os tempos de volatilização, enquanto acetona e metanol diferiram do controle em todos os tratamentos ( $p < 0,05$ ). DMSO e Tween 80 não diferiram significativamente do controle em nenhum tempo ( $p > 0,05$ ). Ao comparar os valores de PMA dos solventes e surfactante testados sugere-se utilizar Tween 80 ou acetona como solvente em testes com larvas de *M. domestica*. Para testes com pupas recomenda-se o uso de DMSO ou Tween 80 em concentração igual ou inferior a 5%, não requerendo volatilização do solvente. A utilização de etanol ou metanol como solvente não é

recomendada para testes com larvas ou pupas de *M. domestica* com tempo de volatilização abaixo de 15 minutos.

**Palavras-chave:** mosca, solvente volátil, testes biológicos, toxicidade, estágios imaturos.

## INTRODUÇÃO

*Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae) é um díptero com ampla distribuição geográfica e altamente sinantrópico, estando presente tanto em ambiente urbano quanto rural (Carvalho, 2002; Carvalho et al., 2002; Acevedo et al., 2009). Conhecido popularmente como mosca doméstica, deposita os ovos em matéria orgânica em decomposição, onde as larvas se desenvolvem. Esse hábito faz com que *M. domestica* esteja geralmente associado a condições sanitárias precárias e a transmissão de mais de 100 patógenos, atuando como potencial vetor mecânico de agentes causadores de diversas doenças para humanos e animais domésticos e de criação (Palacios et al., 2009), sendo responsável por prejuízos econômicos significativos na produção animal (Braverman et al., 1999; Neves, 2005). Ainda, quando presente em grande quantidade, a mosca causa estresse ao homem e animais domésticos, afetando sua produção e bem-estar (Carrera, 1991). Tais aspectos prejudiciais enfatizam a necessidade de adoção de medidas de controle deste díptero.

O método convencional de controle é feito com a utilização de inseticidas sintéticos como organofosforados, carbamatos e piretroides, disponíveis no mercado. O uso extensivo e indiscriminado destes produtos leva à seleção de populações resistentes, além de contaminação ambiental e riscos para a saúde humana e animal (Pavela, 2008; Acevedo et al., 2009). Assim, estudos com a utilização de produtos de origem vegetal, mais especificamente óleos essenciais e seus constituintes, vem sendo realizados com o intuito de buscar novas alternativas para o controle de pragas, inclusive *M. domestica* (Malik et al., 2007; Kumar et al., 2012a; Kumar et al., 2012b).

A busca por novos inseticidas sintéticos ou naturais envolve experimentos laboratoriais que geralmente necessitam o uso de solventes, visto que muitas destas substâncias não são solúveis em água. Muitos tipos de solventes são usados para formulações inseticidas ou em experimentos laboratoriais com a função de solubilizar e/ou diluir o princípio ativo, possibilitando uma aplicação mais homogênea (Resende et al., 2012). No entanto, alguns solventes orgânicos podem apresentar toxicidade ao organismo alvo e assim alterar os resultados de experimentos (Stratton e Corke, 1981). Deste modo, para a avaliação da atividade inseticida de uma substância, espera-se que o solvente/surfactante utilizado seja capaz de solubilizar apropriadamente a amostra a ser testada, e apresente baixa ou nenhuma

toxicidade para o organismo alvo (Chagas et al., 2003; Resende et al., 2012; Sharma et al., 2012), permitindo avaliar o real potencial da amostra sem influenciar nos resultados.

Dentre os poucos trabalhos que avaliam a atividade de diferentes solventes sobre artrópodes podemos citar aqueles com carrapatos das espécies *Rhipicephalus microplus* Canestrini, 1888 (Chagas et al., 2003; Gonçalves et al., 2007; Sharma et al., 2012), *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 e *Dermacentor nitens* Neumann, 1897 (Resende et al., 2012), coleópteros da espécie *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1885 (Oliveira et al., 2011), e odonatas das espécies *Pyrrhosoma nymphula* Sulzer, 1776 e *Coenagrion puella* Linnaeus, 1758 (Gorb et al., 2000). Dos estudos que utilizam *M. domestica* como modelo biológico, Hadaway e Barlow (1958) tiveram como objetivo avaliar a potencialização de inseticidas sintéticos e não avaliar o efeito deletério dos solventes para o organismo alvo; posteriormente, Singh e Jain (1987) avaliaram a toxicidade de diversos solventes sobre adultos de mosca doméstica por aplicação tópica.

Uma forma de evitar a interferência do solvente e/ou surfactante sobre a avaliação da toxicidade de uma determinada substância consiste em esperar um tempo predeterminado para a sua volatilização. O tempo de volatilização pode variar de acordo com as condições ambientais de temperatura e umidade em que o teste é realizado, características químicas da substância, entre outros fatores, como a fase de desenvolvimento do artrópode. O solvente mais utilizado em testes laboratoriais com óleos essenciais e substâncias de origem vegetal sobre *M. domestica* é a acetona, com poucos trabalhos utilizando combinações de dimetilsulfóxido e acetona, e outros solventes como etanol e Tween 80 (Sukontason et al., 2004; Bigham et al., 2010; Fernandes et al., 2010; Pavela, 2011; Kumar et al., 2012a; Kumar et al., 2012b; Melo, 2014). Porém, todos esses solventes podem ser tóxicos de acordo com a forma de aplicação, concentração e tempo de volatilização, e sobre qual estágio de desenvolvimento do organismo alvo está sendo aplicado, dificultando a escolha do solvente ideal. Visando facilitar a escolha do solvente, assim como o tempo de realização de experimentos futuros, o objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade de larvas e pupas de *M. domestica* expostas a solventes e um surfactante após diferentes períodos de volatilização.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Artrópodes Parasitos da Universidade Federal de Juiz de Fora, localizado em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

### Origem e manutenção da colônia de *Musca domestica*

Adultos selvagens de *M. domestica* foram coletados com o auxílio de rede entomológica no campus da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, e mantidos em gaiolas entomológicas (35 x 35 x 35 cm) contendo água e uma mistura de leite em pó, açúcar cristal e água na proporção de 1:1:2 (v/v) adaptado de Brito et al. (2008) (Figura 2-A). Para a oviposição, foi fornecida uma mistura previamente fermentada de farelo de trigo, leite em pó e água (1:1:1 v/v). Após a oviposição, esse meio foi transferido para câmara climatizada ( $28 \pm 2$  °C e  $60 \pm 10\%$  UR) para a obtenção das larvas (pré-pupa) e pupas utilizadas nos bioensaios (Figura 2-B). Foram utilizadas larvas e pupas de terceira e quarta gerações.



**Figura 1.1. Manutenção da colônia de *Musca domestica*.** A: Gaiolas entomológicas para manutenção dos adultos. B: Meio de alimentação com larvas em desenvolvimento.

### Solventes e surfactante

Os solventes acetona [P.A. – A.C.S.,  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ , P.M. 58,08], metanol [P.A. – A.C.S.,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , P.M. 32,04], etanol [P.A. – A.C.S.,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , P.M. 46,07] e DMSO [P.A. –

A.C.S., (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, P.M. 78,13] foram adquiridos da Synth® (LABSYNTH® Produtos para Laboratórios Ltda.), enquanto o surfactante Tween® 80 P.S. (Polissorbato 80) [C<sub>64</sub>H<sub>124</sub>O<sub>26</sub>, P.M. 1310,00] foi adquirido da Vetec® Química Fina Ltda.

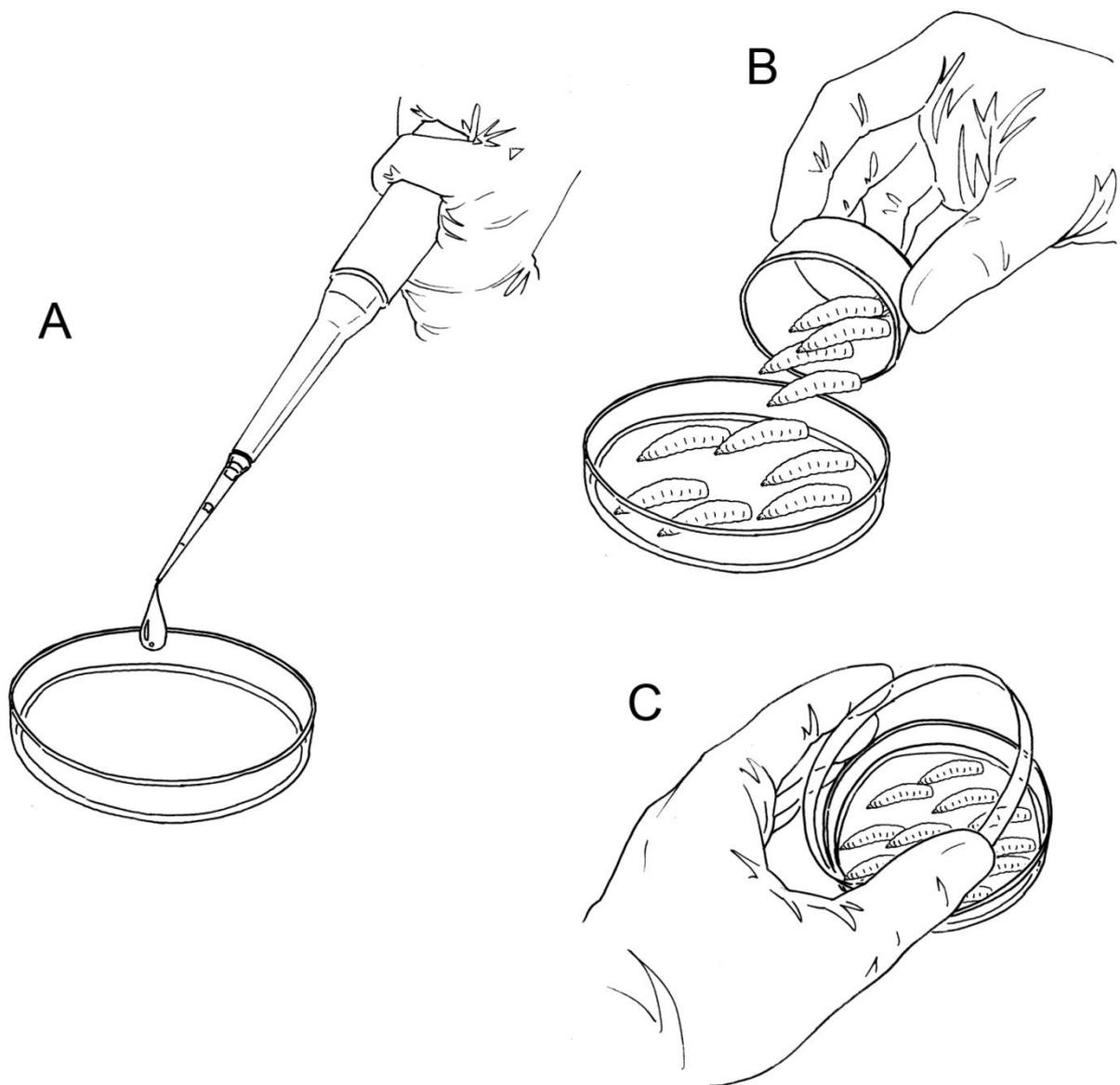
Os solventes acetona, metanol e etanol foram testados em pureza analítica, enquanto o DMSO e o surfactante Tween® 80 P.S. foram diluídos em água destilada para a concentração de 5% (50 mg/mL).

### **Experimento com larvas**

Para larvas foi seguida a metodologia de aplicação descrita por Melo (2014). Foram utilizadas placas de Petri de 6 x 1,5 cm cobertas com papel filtro, onde foram aplicados 500 µl do solvente/surfactante a ser testado.. As placas foram mantidas abertas por zero, cinco, 10 e 15 minutos para avaliar o tempo mínimo necessário para que a volatilização da substância não causasse mortalidade superior a do grupo controle. Para o grupo controle utilizou-se água destilada sem necessidade de evaporação. Em seguida, foram adicionadas 10 larvas de terceiro ínstar (pré-pupa) em cada placa, a qual foi fechada e mantida em câmaras climatizadas (28 ± 2 °C e 60 ± 10% UR). Foi utilizada uma câmara para cada substância testada e uma para o grupo controle. Foram feitas 10 repetições para cada tratamento e controle. Os grupos foram deixados para volatilizar nas seguintes condições ambientais: 23 ± 3 °C e 70 ± 10% UR (Figura 3).

A primeira avaliação (ML) foi feita após 48 horas da aplicação. Foram contadas as larvas mortas e vivas, sendo que as larvas que sobreviveram e empuparam foram mantidas nas placas de Petri por seis dias para o acompanhamento da emergência de adultos. Após esse tempo uma nova avaliação foi feita (MPR) para determinar a mortalidade causada por cada substância e tempo testados. Foi considerada morta toda pupa que não deu origem a um adulto. O PMA foi calculado levando-se em conta essas duas avaliações para cada solvente/surfactante e tempo de acordo com a fórmula proposta por Melo (2014):

$$PMA = ML + [(100 - ML) \times MPR] \quad , \quad \text{onde } ML \text{ é a mortalidade larval, } 100 \times \left( \frac{\text{larvas mortas}}{\text{total larvas tratadas}} \right); \text{ e } MPR \text{ é a mortalidade das pupas recuperadas, } 100 \times \left( \frac{\text{pupas mortas recuperadas do tratamento larval}}{\text{total de pupas recuperadas do tratamento larval}} \right).$$

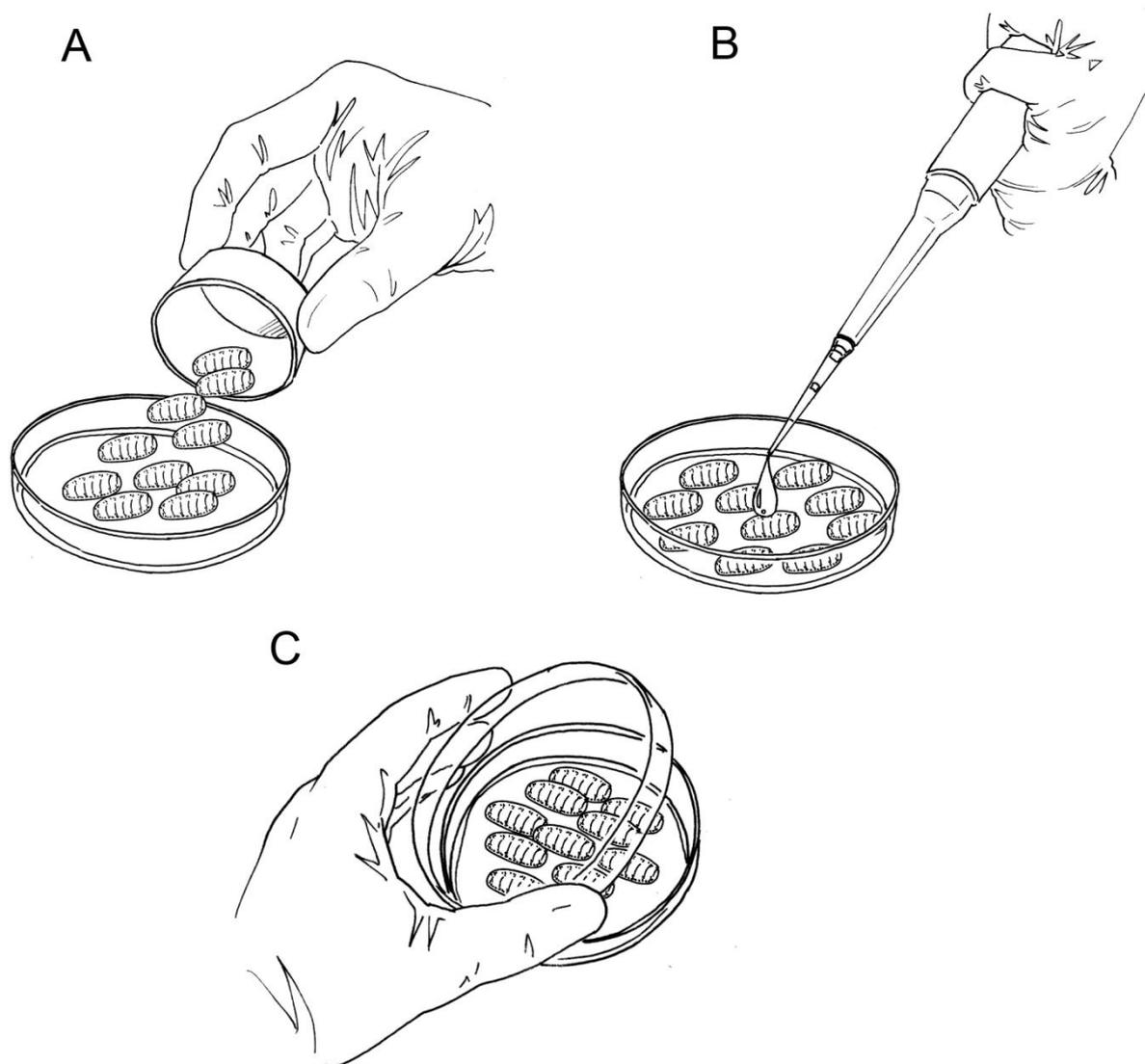


**Figura 1.2. Teste de contato com solventes e surfactante sobre larvas de *Musca domestica*.** A: Aplica-se 500  $\mu\text{l}$  do solvente/surfactante a ser testado sobre o papel filtro dentro da placa de Petri e aguarda-se o tempo determinado para a volatilização. B: 10 larvas de terceiro instar são adicionadas à placa. C: A placa de Petri é fechada e mantida em condições controladas de temperatura e umidade ( $28\pm 2$  °C e  $60\pm 10\%$  UR).

### Experimento com pupas

De acordo com a metodologia proposta por Melo (2014), foram utilizadas placas de Petri de 9 x 1,5 cm cobertas com papel filtro. Em cada placa foram colocadas 10 pupas com um a dois dias de formação e sobre cada pupa foram aplicados, com o auxílio de uma micropipeta, 50  $\mu\text{L}$  do solvente/surfactante a ser testado. Assim como a metodologia de

aplicação em larvas, as placas foram mantidas abertas por zero, cinco, 10, ou 15 minutos, conforme o tratamento, para permitir a volatilização da substância testada nas mesmas condições ambientais do experimento com larvas; em seguida, foram fechadas e colocadas em câmaras climatizadas nas mesmas condições dos testes com larvas. Para o grupo controle utilizou-se água destilada sem necessidade de evaporação. Foram feitas 10 repetições para cada tratamento e controle. A avaliação da mortalidade pupal para substância e tempo foi feita seis dias após a aplicação.



**Figura 1.3. Teste de contato com solventes e surfactante sobre pupas de *Musca domestica*.** A: 10 pupas de um a dois dias são adicionadas a uma placa de Petri coberta com papel filtro. B: Sobre cada pupa são pipetados 50  $\mu\text{L}$  do solvente/surfactante a ser testado e aguarda-se o tempo determinado para a volatilização. C: A placa de Petri é fechada e mantida em condições controladas de temperatura e umidade ( $28 \pm 2$  °C e  $60 \pm 10\%$  UR).

## Análise dos dados

A análise estatística foi feita através do software Bioestat versão 5.0 (Ayres et al., 2007). Os valores percentuais foram transformados em  $\sqrt{\text{arcseno } x}$  e submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). No caso de distribuição não paramétrica, os dados foram comparados através dos testes de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS

### Experimento com larvas

Os resultados de mortalidade larval estão apresentados na Tabela 1.1. Ressalta-se que o aumento do tempo de volatilização reduziu a mortalidade larval para acetona, metanol e etanol ( $p < 0,05$ ). Dentre estes, acetona apresentou menor tempo de volatilização, apresentando-se semelhante ao controle após volatilizar por cinco minutos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1.1:** Média  $\pm$  Desvio padrão da mortalidade de larvas pré-pupa de *Musca domestica* submetidas a solventes e surfactante em diferentes tempos de volatilização.

Tempo de Volatilização (min)	Mortalidade por solvente/surfactante (%)				
	Acetona P.A.	Metanol P.A.	Etanol P.A.	DMSO 5%	Tween 80 5%
0	100,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,0	100,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,0	100,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,0	2,0 <sup>ba</sup> $\pm$ 4,2	2,0 <sup>ba</sup> $\pm$ 4,2
5	1,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 3,2	100,0 <sup>bb</sup> $\pm$ 0,0	100,0 <sup>bb</sup> $\pm$ 0,0	3,9 <sup>aA</sup> $\pm$ 5,0	1,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 3,2
10	0,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 0,0	23,0 <sup>ba</sup> $\pm$ 27,5	100,0 <sup>cb</sup> $\pm$ 0,0	3,0 <sup>abA</sup> $\pm$ 4,8	5,0 <sup>abA</sup> $\pm$ 5,3
15	0,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 0,0	0,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 0,0	0,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 0,0	0,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 0,0	0,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 0,0
CTR	0,0 <sup>A</sup> $\pm$ 0,0				

As médias seguidas por diferentes letras minúsculas na linha e diferentes letras maiúsculas na coluna diferem significativamente ( $p < 0,05$ ). n = 100; CTR: controle com água destilada e zero minuto de evaporação.

Os resultados sobre mortalidade de pupas recuperadas deste primeiro teste encontram-se na Tabela 1.2. A maior mortalidade de pupas recuperadas foi observada para metanol após 10 minutos de volatilização (33,1%), diferindo significativamente do controle e dos demais solventes, exceto DMSO.

**Tabela 1.2:** Média  $\pm$  Desvio padrão da mortalidade de pupas recuperadas da avaliação da sensibilidade de larvas pré-pupa de *Musca domestica* a solventes e surfactante em diferentes tempos de volatilização.

Tempo de Volatilização (min)	Mortalidade por solvente/surfactante (%)				
	Acetona P.A.	Metanol P.A.	Etanol P.A.	DMSO 5%	Tween 80 5%
0	*	*	*	12,1 <sup>aA</sup> $\pm$ 13,2	2,0 <sup>bA</sup> $\pm$ 4,2
5	4,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 5,2	*	*	15,4 <sup>bB</sup> $\pm$ 11,8	5,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 7,1
10	3,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 4,8	33,1 <sup>bB</sup> $\pm$ 28,4	*	14,1 <sup>bcAB</sup> $\pm$ 11,2	6,0 <sup>acA</sup> $\pm$ 7,0
15	7,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 8,2	8,6 <sup>aA</sup> $\pm$ 8,0	10,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 18,9	9,0 <sup>aAB</sup> $\pm$ 7,4	2,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 4,2
CTR	3,0 <sup>A</sup> $\pm$ 4,8				

As médias seguidas por diferentes letras minúsculas na linha e diferentes letras maiúsculas na coluna diferem significativamente ( $p < 0,05$ );  $n = 100$ ; CTR: controle com água destilada e zero minuto de evaporação; \*: Nenhuma larva empupou na primeira avaliação.

Na Tabela 1.3 estão apresentados os percentuais de mortalidade acumulada dos experimentos com larvas pré-pupa. Todos os solventes testados apresentaram percentuais de mortalidade acumulada semelhantes ao controle quando deixados evaporar por 15 minutos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1.3:** Média  $\pm$  Desvio padrão do percentual de Mortalidade Acumulada de larvas pré-pupa de *Musca domestica* submetidas a solventes e surfactante após diferentes tempos de volatilização.

Tempo de Volatilização (min)	Mortalidade por solvente/surfactante (%)				
	Acetona P.A.	Metanol P.A.	Etanol P.A.	DMSO 5%	Tween 80 5%
0	100,0 <sup>aB</sup> $\pm$ 0,0	100,0 <sup>aC</sup> $\pm$ 0,0	100,0 <sup>aB</sup> $\pm$ 0,0	14,1 <sup>bB</sup> $\pm$ 11,7	4,0 <sup>bA</sup> $\pm$ 5,2
5	5,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 5,3	100,0 <sup>bC</sup> $\pm$ 0,0	100,0 <sup>bB</sup> $\pm$ 0,0	18,9 <sup>cB</sup> $\pm$ 10,9	6,0 <sup>acA</sup> $\pm$ 7,0
10	3,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 4,8	42,0 <sup>bcB</sup> $\pm$ 29,4	100,0 <sup>bB</sup> $\pm$ 0,0	16,7 <sup>cdB</sup> $\pm$ 11,5	11,0 <sup>adB</sup> $\pm$ 3,2
15	7,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 8,2	8,6 <sup>aAB</sup> $\pm$ 8,0	10,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 18,9	9,0 <sup>aAB</sup> $\pm$ 7,4	2,0 <sup>aA</sup> $\pm$ 4,2
CTR	3,0 <sup>A</sup> $\pm$ 4,8				

As médias seguidas por diferentes letras minúsculas na linha e diferentes letras maiúsculas na coluna diferem significativamente ( $p < 0,05$ );  $n = 100$ ; CTR: controle com água destilada e zero minuto de evaporação.

## Experimento com pupas

Os resultados do experimento com pupas encontram-se na Tabela 1.4. Observa-se que somente para etanol o tempo de volatilização produziu diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Ainda, DMSO 5%, e Tween 80 5% não diferiram significativamente do controle em nenhum tempo ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1.4:** Média  $\pm$  Desvio padrão da mortalidade de pupas de *Musca domestica* submetidas a solventes e surfactante em diferentes tempos de volatilização.

Tempo de Volatilização (min)	Mortalidade por solvente/surfactante (%)				
	Acetona P.A.	Metanol P.A.	Etanol P.A.	DMSO 5%	Tween 80 5%
0	11,1 <sup>ab</sup> $\pm$ 8,7	10,0 <sup>acB</sup> $\pm$ 10,5	19,4 <sup>ac</sup> $\pm$ 17,3	0,0 <sup>bA</sup> $\pm$ 0,0	1,0 <sup>bcA</sup> $\pm$ 3,2
5	8,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 9,2	13,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 11,6	4,0 <sup>abB</sup> $\pm$ 7,0	6,0 <sup>abA</sup> $\pm$ 9,7	4,0 <sup>abA</sup> $\pm$ 7,0
10	6,0 <sup>acAB</sup> $\pm$ 5,2	11,1 <sup>cb</sup> $\pm$ 8,7	7,0 <sup>acBC</sup> $\pm$ 6,7	3,0 <sup>abA</sup> $\pm$ 4,8	0,0 <sup>bA</sup> $\pm$ 0,0
15	8,0 <sup>abB</sup> $\pm$ 9,2	4,0 <sup>abAB</sup> $\pm$ 5,2	10,0 <sup>ac</sup> $\pm$ 6,7	1,0 <sup>bA</sup> $\pm$ 3,2	2,0 <sup>bA</sup> $\pm$ 4,2
CTR	0,0 <sup>A</sup> $\pm$ 0,0				

As médias seguidas por diferentes letras minúsculas na linha e diferentes letras maiúsculas na coluna diferem significativamente ( $p < 0,05$ );  $n = 100$ ; CTR: controle com água destilada e zero minuto de evaporação; \*: Não foram feitas avaliações.

## DISCUSSÃO

A necessidade de novos e mais seguros inseticidas tem levado a um aumento no número de estudos com óleos essenciais e substâncias naturais. Pouco se sabe, porém, a respeito da toxicidade dos solventes e surfactantes comumente utilizados em testes laboratoriais e durante os processos de extração dos óleos essenciais. Neste estudo foi comparada a toxicidade de quatro solventes e um surfactante comumente utilizados em testes laboratoriais, em relação ao tempo em que estes solventes são expostos para volatilização, utilizando como modelo biológico larvas e pupas de *M. domestica*. Sendo, desta forma, o primeiro estudo a abranger o efeito destas substâncias sobre larvas e pupas de *M. domestica* e correlacionando o tempo de volatilização dos mesmos.

Os resultados obtidos para larvas pré-pupa mostram que os solventes utilizados em pureza analítica (acetona, metanol e etanol) apresentaram toxicidade elevada quando não era permitida a volatilização destes (Tempo 0); porém essa toxicidade reduziu significativamente ao permitir a volatilização dos solventes, com acetona apresentando baixa toxicidade após cinco minutos de volatilização. Etanol absoluto mostrou-se ativo por mais tempo dentre os três, causando mortalidade larval de 100% quando submetido a até 10 minutos de volatilização. Assim pode-se afirmar que o tempo de volatilização produziu diferença significativa na toxicidade dos solventes acetona, metanol e etanol quando aplicados sobre larvas pré-pupa de *M. domestica*. O mesmo não foi observado para o solvente DMSO 5% nem para o surfactante Tween 80 5%, porém estas substâncias também não apresentaram toxicidade significativa sobre a mortalidade larval.

Tween 80 e DMSO não apresentaram diferença na mortalidade larval que possa ser correlacionada ao tempo de volatilização, o que pode ser atribuído à baixa volatilidade destes solventes em condições ambientais quando comparado aos demais solventes utilizados neste estudo. Outro fator que pode influenciar a volatilidade destas substâncias está no fato de terem sido diluídas, e a presença de água muda sua volatilidade e estabilidade. No entanto, quando observado o efeito na emergência dos adultos, DMSO 5% causou mortalidade significativamente maior que Tween 80 e acetona (Tabela 1.2). A mortalidade de pupas recuperadas para DMSO 5% contribuiu para um percentual de mortalidade acumulada superior a 9 % em todos os tempos ao final do experimento, fazendo com que os grupos expostos a DMSO 5% após zero, cinco e 10 minutos de volatilização diferissem significativamente do controle ( $p < 0,05$ ). No entanto, vale ressaltar que esses valores não diferiram significativamente daqueles alcançados pelo surfactante Tween 80 em mesma concentração e tempo de volatilização avaliados (Tabela 1.3). Melo (2014), em estudo com óleo essencial e monoterpenos sobre fases imaturas de *M. domestica*, utilizou como solvente DMSO a 1% e 3%, obtendo mortalidade semelhante ao presente estudo e igual ou inferiores às concentrações mais baixas do óleo e substâncias avaliados, corroborando a observação de que em baixas concentrações DMSO não apresenta toxicidade sobre *M. domestica*.

A influência da volatilização do solvente sobre pupas foi menor do que quando aplicado em larvas, sugerindo que outro fator pode influenciar a toxicidade sobre pupas, além da volatilização do solvente. Acredita-se que a baixa relação do tempo de volatilização na diminuição da atividade dos solventes pode estar relacionada à forma de aplicação. Neste teste o solvente foi aplicado diretamente sobre a pupa, simulando a metodologia utilizada em

outros estudos para testes de substâncias com esse estágio, o que permite que este atue sobre o inseto antes de volatilizar, podendo penetrar o pupário e causar efeito tóxico independente do período de volatilização, como observado para os solventes acetona, metanol e etanol em relação ao controle. Durante o período de pupa, o inseto passa por processos de transformação e reorganização dos tecidos, o que permite supor que o contato com substâncias tóxicas que atravessem a cutícula possa causar efeitos letais durante esse período, interrompendo o desenvolvimento do adulto (Karandikar e Renade, 1965).

A preferência da acetona como solvente em experimentos com óleo essencial já é relatada na literatura, justificada por sua rápida volatilização e baixa toxicidade, como observado por Singh e Jain (1987). Ao avaliarem a toxicidade de diversos solventes aplicados topicamente sobre o tórax de adultos de *M. domestica*, os autores encontraram que acetona foi o solvente que apresentou menor toxicidade sobre o organismo, necessitando uma dose mais elevada (2µl /inseto) para apresentar efeito tóxico, seguida por etanol e metanol, que se mostrou tóxico em concentração inferior que os anteriores (1 µl /inseto). O nosso estudo não avaliou diferentes concentrações, mas sim o tempo de volatilização, o que impossibilita maiores comparações com o estudo de Singh e Jain. Entretanto, os resultados encontrados para larvas pré-pupa se assemelham aos encontrados para adultos por estes autores, apesar de que entre estes três solventes, não foi observada diferença significativa em nenhum dos tempos avaliados para pupas.

Diversos fatores podem estar relacionados à toxicidade de solventes sobre artrópodes, desde a forma de aplicação, permeabilidade da cutícula, viscosidade e polaridade da substância até o peso molecular e número de carbonos da molécula do solvente (Hadaway e Barlow, 1958; Lewis, 1980; Chagas et al., 2003). Sabe-se que substâncias com cadeias carbônicas maiores são menos voláteis, ficando assim em contato com o organismo por mais tempo, podendo prolongar o tempo em que atua como carreador e, ainda, aparentar maior toxicidade. Foi observada durante a realização do presente estudo, nos grupos em que foi testado Tween 80 5%, a presença de uma camada úmida sobre o corpo dos insetos por tempo prolongado, de forma a ser ainda perceptível sobre alguns indivíduos mesmo após a formação da pupa nos grupos de larvas submetidas a essas substâncias. Essa película pode favorecer a ação do solvente como carreador de substâncias por um tempo prolongado.

Acetona e metanol não apresentaram diferença significativa entre os tempos de volatilização quando aplicadas sobre pupas. Uma hipótese é que ao fechar a placa antes do solvente evaporar completamente, este ficou contido dentro das placas, potencializando sua

ação. Webb e Green (1945) sugerem que alguns solventes aumentam sua capacidade carreadora quando em ambientes com alta concentração de vapor dos mesmos, como observaram para diacetona álcool e cicloexanol. Essa observação enfatiza a importância de conhecer as propriedades dos solventes utilizados, considerando a ação deste sobre o organismo alvo e permitir a suficiente volatilização do solvente, garantindo que este não influencie nos resultados obtidos em testes com substâncias inseticidas.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o tempo de volatilização do solvente escolhido pode influenciar diretamente no resultado de experimento com larvas de *M. domestica*, tendo um efeito menor sobre pupas. Além da toxicidade do solvente ou surfactante, o tempo de volatilização pode influenciar na capacidade de penetração de substâncias através da cutícula do inseto, como observado por Schouest et al. (1983) ao avaliarem a influência de solventes na deposição de inseticidas sobre a cutícula de adultos de *M. domestica*. Os autores constataram que a volatilização do solvente aumenta o efeito de concentração do inseticida sobre a cutícula do inseto, de modo que solventes que volatilizam muito rápido podem prejudicar a difusão dos inseticidas sobre essa superfície, causando sua precipitação e saturação da substância, diminuindo sua absorção e conseqüente sua atividade.

## CONCLUSÃO

Diante dos nossos resultados, conclui-se que o surfactante Tween 80 concentração igual ou inferior a 5% pode ser utilizado de forma segura, não influenciando nos resultados de avaliações de toxicidade de óleos essenciais e substâncias de origem vegetal sobre larvas pré-pupa e pupas de *M. domestica*, não necessitando volatilização. Dentre os solventes avaliados, DMSO a 5% mostrou-se menos tóxico que os demais solventes sem necessidade de volatilização ao ser utilizado para os mesmos estágios. Para os demais solventes, quando utilizados em pureza analítica em testes com larvas pré-pupa de *M. domestica*, aguardar cinco minutos para a volatilização da acetona e pelo menos 15 minutos ao utilizar metanol e etanol, não sendo recomendada a aplicação destes solventes em pureza analítica diretamente sobre pupas de *M. domestica*. Entretanto, sabendo-se que solventes diluídos apresentam menor toxicidade, mas diferenças em suas propriedades voláteis, são necessários mais estudos avaliando a toxicidade destes solventes em diferentes concentrações e tempos de volatilização.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, G.R., ZAPATER, M., TOLOZA, A.C. Insecticide resistance of house fly, *Musca domestica* (L.) from Argentina. **Phytotherapy Research**, v.105(2), p.489–493, 2009.
- AYRES, M., AYRES JUNIOR, M., AYRES, D.L., SANTOS, A.A.S. **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. Instituto Mamirauá, Belém, 2007.
- BIGHAM, M., HOSSEININAVEH, V., NABAVI, B., TALEBI, K., ESMAEILZADEH, N.S. Effects of essential oil from *Teucrium polium* on some digestive enzyme activities of *Musca domestica*. **Entomological Research**, V.40, p.37–45, 2010.
- BRAVERMAN, Y., CHIZOV-GINZBURG, A., SARAN, A., WINKLER, M. The role of houseflies (*Musca domestica*) in harbouring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel. **Revue Scientifique et Technique**, v.18, p.681–690, 1999.
- BRITO, L.G.; OLIVEIRA, M.C.S.; GIGLIOTI, R.; JUNIOR, F. S.; NETTO, F.G.S., CHAGAS, A.C.S.; CELESTINO, O.O. **Manual de identificação, importância e manutenção de colônias estoque de dípteros de interesse veterinário em laboratório**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2008. 25 p.
- CARRERA, M. **Insetos de interesse médico e veterinário**. Curitiba: Ed. UFPR; Brasília. 228p, 1991.
- CARVALHO, C.J.B. **Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: taxonomy**. Editora UFPR, 2002.
- CARVALHO, C. J. B., MOURA, M. O., RIBEIRO, P. B. Chave para identificação de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.46(2), p.107-114, 2002.

CHAGAS, A.C.S., LEITE, R.C., FURLONG, J., PRATES, H.T., PASSOS, W.M. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. **Ciência Rural**, v.33(1), p.109-114, 2003.

CRIVELENTI, L.Z., GUILHERME, L.C., MORELLI, S., BORIN, S. Toxicidade do inseticida organofosforado Abate® em alevinos de *Poecilia reticulata*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.6, p.65–68, 2011.

FERNANDES, J.I., RIBEIRO, F.A., CORREIA, T.R., COUMENDOUROS, K.,; VEROCAI, G.G., FAZIO-JUNIOR, P.I.,; SILVA, D.D., SCOTT, F.B. Eficácia larvívica de uma emulsão contendo 10% de óleo de nim (*Azadirachta indica*) no controle de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.32, p.25-30, 2010.

FOTEDAR, R., BANERJEE, U., SINGH, S., SHRINIWAS, VERMA, A.K. The housefly (*Musca domestica*) as a carrier of pathogenic microorganisms in a hospital environment. **Journal of Hospital Infection**, v.20, p.209-215, 1992.

GONÇALVES, K., TOIGO, E., ASCOLI, B., VON POSER, G., RIBEIRO, V.L. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, v.100(6), p.1267-1270, 2007.

GORB, S.N., KESEL, A., BERGER, J. Microsculpture of the wing surface in Odonata: evidence for cuticular wax covering. **Arthropod Structure e Development**, v.29(2), p.129–135, 2000.

HADAWAY, A.B. e BARLOW, F. Some aspects of the effect of the solvent on the toxicity of solutions of insecticide. **Annals of Applied Biology**, v.46(2), p.133-148, 1958.

KARANDIKAR, K.R. e RENADE, D.R. Studies on the pupation of *Musca domestica nebulosa* Fabr. (Diptera - Cyclorrhapha - Muscidae). **Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section B**. v.61(4), p.204-213, 1965.

KUMAR, P., MISHRA, S., MALIK, A., SATYA, S. Insecticidal evaluation of essential oils of *Citrus sinensis* L. (Myrtales: Myrtaceae) against housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Parasitology Research**, v.110(5), p.1929-1936, 2012a.

KUMAR, P., MISHRA, S., MALIK, A., SATYA, S. Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). **Acta Tropica**, v.122(2), p.212-218, 2012b.

LEWIS, C.T. **The penetration of cuticle by insecticides**. In: Cuticle techniques in arthropods (ed. by T.A. Miller). Springer-Verlag, New York, NY, USA. 367–400, 1980.

MALIK, A., SINGH, N. E SATYA, S. House fly (*Musca domestica*): a review of control strategies for a challenging pest. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.42(4), p.453-469, 2007.

MELO, D.R. **Atividade do óleo essencial de *Lippia sidoides* (VERBENACEAE) e dos monoterpenos timol e carvacrol sobre larvas e pupas de *Musca domestica* LINNAEUS, 1758 (DIPTERA: MUSCIDAE)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. 44p, 2014.

OLIVEIRA, T.A., RONCHI-TELES, B., OLIVEIRA, R.B., FONSECA, C.R.V., SILVA, S.L.R., SANTOS, P.A., NUNEZ, C. V. Evaluation of the acute effects of organic solvents on adults of *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**. V.6, p.9-13, 2011.

PALACIOS, S. M., BERTONI, A., ROSSI, Y., SANTANDER, R., URZÚA, A. Insecticidal activity of essential oils from native medicinal plants of Central Argentina against the house fly, *Musca domestica* (L.). **Parasitology Research**, v.106(1), p.207-212, 2009.

PAVELA, R. Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.). **Phytotherapy Research**, 22:274-278, 2008.

PAVELA, R. Insecticidal properties of phenols on *Culex quinquefasciatus* Say and *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, v.109(6), p.1547-1553, 2011.

RESENDE, J.D., DAEMON, E., MONTEIRO, C.M., MATURANO, R., PRATA, M.C., FERREIRA RODRIGUES, A.F. Toxicity of solvents and surfactants to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) larvae. **Experimental Parasitology**. V.131, p.139–142, 2012.

SCHOUEST, L.P., UMETSU, N., MILLER, T.A. Solvent-modified deposition of insecticides on house fly (Diptera: Muscidae) cuticle. **Journal of Economic Entomology**, v.76(5), p.973-982, 1983.

SHARMA, A.K., KUMAR, S., TIWARI, S.S., SRIVASTAVA, S., KUMAR, R., RAY, D.D., CHAUDHURI, P., RAWAT, A.K.S., BANDYOPADHYAY, A., GHOSH, S. Comparative acaricidal properties of different solvents and surfactants on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **The Indian Journal of Animal Sciences**, V.82(2), p.154–158, 2012.

SINGH, D. E JAIN, D.C. *Relative toxicity of various organic solvents generally used in screening plant products for insecticidal activity against the house fly Musca domestica L.* **Indian Journal of Experimental Biology**, 25. pp. 569-570, 1987.

STRATTON, G.W. e CORKE, C.T. Effect of acetone on the toxicity of atrazine towards photosynthesis in anabaena. **Journal o Environmental Science and Health**, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, v.16(1), p.21-33, 1981.

SUKONTASON, K.W., BOONCHU, N., SUKONTASON, K., CHOOCHOTE, W. Effects of eucalyptol on house fly (Diptera: Muscidae) and blow fly (Diptera: Calliphoridae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.6(2), p.97-101, 2004.

URZÚA, A., SANTANDER, R., ECHEVERRIA, J., VILLALOBOS, C., PALACIOS, S.M., ROSSI, Y. Insecticide properties of the essential oils from *Haplopappus foliosus* and *Bahia*

*ambrosoides* against the house fly, *Musca domestica* L. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v.55(3), p.392–395, 2010.

WEBB, J.E. e GREEN, R.A. On the penetration of insecticides through the insect cuticle. **Journal of Experimental Biology**, v.22, p.8-20, 1945.

## SEÇÃO 2

### ATIVIDADE INSETICIDA DOS FENILPROPANOIDES EUGENOL E (*E*)-CINAMALDEÍDO SOBRE LARVAS E PUPAS DE *Musca domestica* LINNAEUS, 1758 (DIPTERA: MUSCIDAE)

#### RESUMO

*Musca domestica* é um importante vetor mecânico de diversos patógenos para homens e animais de criação, sendo essencial o estudo de novas alternativas de controle mais eficientes e seguras para este díptero. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade inseticida de dois fenilpropanoides, eugenol e (*E*)-cinamaldeído, sobre larvas e pupas de *M. domestica*. A avaliação do potencial larvicida foi realizada com larvas de terceiro ínstar pré-pupas submetidas ao teste de contato. A mortalidade larval (ML) foi avaliada 48h após o tratamento com as substâncias, e as larvas sobreviventes foram acompanhadas até o estágio adulto para a avaliação da mortalidade de pupas recuperadas (MPR) e cálculo da eficácia do tratamento larval (ETL). Para a avaliação da atividade pupicida foram utilizadas pupas de um a dois dias submetidas ao teste de contato, sendo calculada a mortalidade pupal (MP) após seis dias do tratamento, e adultos emergindo com anormalidade foram contabilizados (PMD) para o cálculo da eficácia do tratamento pupal (ETP). Foram testadas oito concentrações de cada substância, de 0,625 a 30,0 mg/mL, para o cálculo das concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) para larvas e pupas. Eugenol apresentou os menores valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>, para a ETL (1,5 e 3,75 mg/mL, respectivamente) enquanto (*E*)-cinamaldeído apresentou os menores valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> para a ETP (18,08 e 78,83 mg/mL, respectivamente). Ambas as substâncias apresentaram atividade larvicida a partir de 2,5 mg/mL e ETL de 100% a partir de 5 mg/mL. Para o tratamento pupal (*E*)-cinamaldeído diferiu do controle a partir da concentração de 10mg/mL ( $p < 0,05$ ) e ambos os fenilpropanoides causaram má formação em adultos. As substâncias testadas neste estudo apresentaram elevado potencial larvicida, o que em conjunto com os efeitos sobre pupas tornam seu uso promissor no desenvolvimento de formulações mais seguras para a saúde e meio ambiente, sendo possível sua utilização em estratégias de Manejo Integrado de Pragas.

**Palavras-chave:** bioinseticidas, mosca doméstica, contato tóxico, toxicidade, pesticida natural

## INTRODUÇÃO

A *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (mosca doméstica) está distribuída em todas as regiões biogeográficas do globo, com excessão dos pólos, estando geralmente associado à presença humana e presente em ambientes rurais e urbanos (Acevedo et al., 2009; Pavela, 2008; Carvalho et al., 2002). Esse díptero se alimenta e reproduz em matéria orgânica em decomposição, onde entra em contato com organismos patogênicos, sendo por isso considerada importante vetor mecânico de mais de 100 patógenos, podendo atuar como potenciais vetores em ambiente hospitalar (Carrera, 1991; Fotadar et al., 1992; Béjar et al., 2006; Samarasekera et al., 2006; Malik et al., 2007). Além disso, é hospedeiro intermediário de endoparasitos como *Habronema* sp, que parasita equinos e *Raillietina* sp, parasito de aves, assim como atua na transmissão de agentes causadores da mastite bovina, como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, e vetor de ovos de *Dermatobia hominis* Linnaeus Jr., 1781, sendo responsável por prejuízos econômicos significativos na produção animal (Braverman et al., 1999; Pinto et al., 2002; Silva et al., 2005; Castro, 2008). Sua presença em grande quantidade causa estresse a animais de criação e ao homem, afetando a produção e o bem estar destes, principalmente em instalações avícolas, onde é considerada a principal praga (Axtell, 1985; Carrera, 1991). Tais aspectos prejudiciais enfatizam a necessidade de adoção de medidas de controle deste díptero.

Para o controle de dípteros, convencionalmente utiliza-se inseticidas sintéticos disponíveis comercialmente como organofosforados, carbamatos e piretroides. A facilidade de acesso a inseticidas, somada a falta de conhecimento e conscientização sobre as maneiras adequadas de utilização desses produtos, resultam no uso indiscriminado, podendo levar à seleção de populações de parasitos resistentes (Acevedo et al., 2009), além de contaminação ambiental e riscos para a saúde humana e animal (Pavela, 2008; Urzúa et al., 2010; Crivelenti et al., 2011). De acordo com essa preocupação, estudos com a utilização de produtos de origem vegetal, mais especificamente óleos essenciais e seus constituintes, vem sendo realizados com o intuito de buscar novas alternativas para o controle de diferentes grupos de pragas, desde ácaros a dípteros e coleópteros (Isman, 2000; Coitinho et al., 2006; Pavela, 2008a; Castro, 2008; Cavalcanti et al., 2010; Daemon et al., 2012; Zeringóta et al., 2013). O uso de óleos essenciais e seus constituintes já mostrou eficácia contra várias espécies de

dípteros, incluindo *M. domestica* (Malik et al., 2007; Kumar et al., 2012a; Kumar et al., 2012b; Melo, 2014).

Dentre os constituintes dos óleos essenciais, os fenilpropanoides são substâncias aromáticas (Pavela, 2010). O eugenol é um fenilpropanoide extraído de algumas plantas das famílias Myrtaceae, Lauraceae e Lamiaceae, presente, por exemplo, no óleo do cravo da Índia. Além de seu uso em procedimentos odontológicos, o eugenol apresenta atividade bactericida, fungicida, nematocida, acaricida e inseticida amplamente comprovada na literatura (Ali et al., 2005; He et al., 2012; Monteiro et al., 2012; Yeom et al., 2013; Senra et al., 2013a).

O (*E*)-cinamaldeído, também um fenilpropanoide, está presente no óleo essencial de plantas do gênero *Cinnamomum*, como a canela. O óleo essencial extraído de plantas desse gênero tem atividades antimicrobiana e inseticida relatadas na literatura (Islam et al., 2009; Jumbo et al., 2014), sendo o (*E*)-cinamaldeído seu componente majoritário. Ainda, é mencionada atividade carrapaticida e bactericida para (*E*)-cinamaldeído (Ali et al., 2005; Senra et al., 2013b).

Atualmente vem crescendo o interesse na utilização de óleos essenciais e seus constituintes para o controle de pragas; no entanto, são poucos os estudos que visam sua utilização para o controle de *M. domestica* (Malik et al., 2007). A maioria desses estudos visa o controle do adulto por meio de aplicação tópica ou fumigação (Pavela 2008a; Pavela 2008b; Palacios et al., 2009a; Palacios et al., 2009b; Pavela 2011; Rossi et al., 2012; Rossi and Palacios 2013; Tarelli et al., 2009). Porém, sabe-se que os adultos representam apenas 15% da população real (Kumar et al., 2012a), e sua capacidade de voo dificulta o controle do ambiente de forma eficaz a longo prazo. Por outro lado, as larvas e pupas deste díptero estão restritas ao local do criadouro e proximidades, sendo pouco móveis, tornando assim estratégias de controle dos estágios imaturos uma alternativa ecológica e economicamente interessante.

Ciente das propriedades destes fenilpropanoides, e a constante necessidade de novos e mais seguros inseticidas para o controle de moscas, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade inseticida sobre larvas e pupas de *M. domestica* através do teste de contato, visando uma alternativa eficaz e segura para o controle deste inseto.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Artrópodes Parasitos da Universidade Federal de Juiz de Fora, localizado em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

### Origem e manutenção da colônia de *Musca domestica*

Adultos selvagens de *M. domestica* foram coletados com o auxílio de rede entomológica no campus da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, e mantidos em gaiolas entomológicas (35x35x35 cm). Foi oferecido diariamente água e uma mistura de leite em pó, açúcar cristal e água na proporção de 1:1:2 (v/v) adaptado de Brito et al. (2008). Para a oviposição, foi fornecida uma mistura previamente fermentada de farelo de trigo, leite em pó e água (1:1:1 v/v). Após a oviposição, esse meio foi transferido para câmara climatizada (28±2 °C e 60±10% UR) para a obtenção das larvas (pré-pupa) e pupas utilizadas nos bioensaios. Foram utilizadas larvas e pupas de terceira geração de laboratório.

### Procedência e diluição dos fenilpropanoides

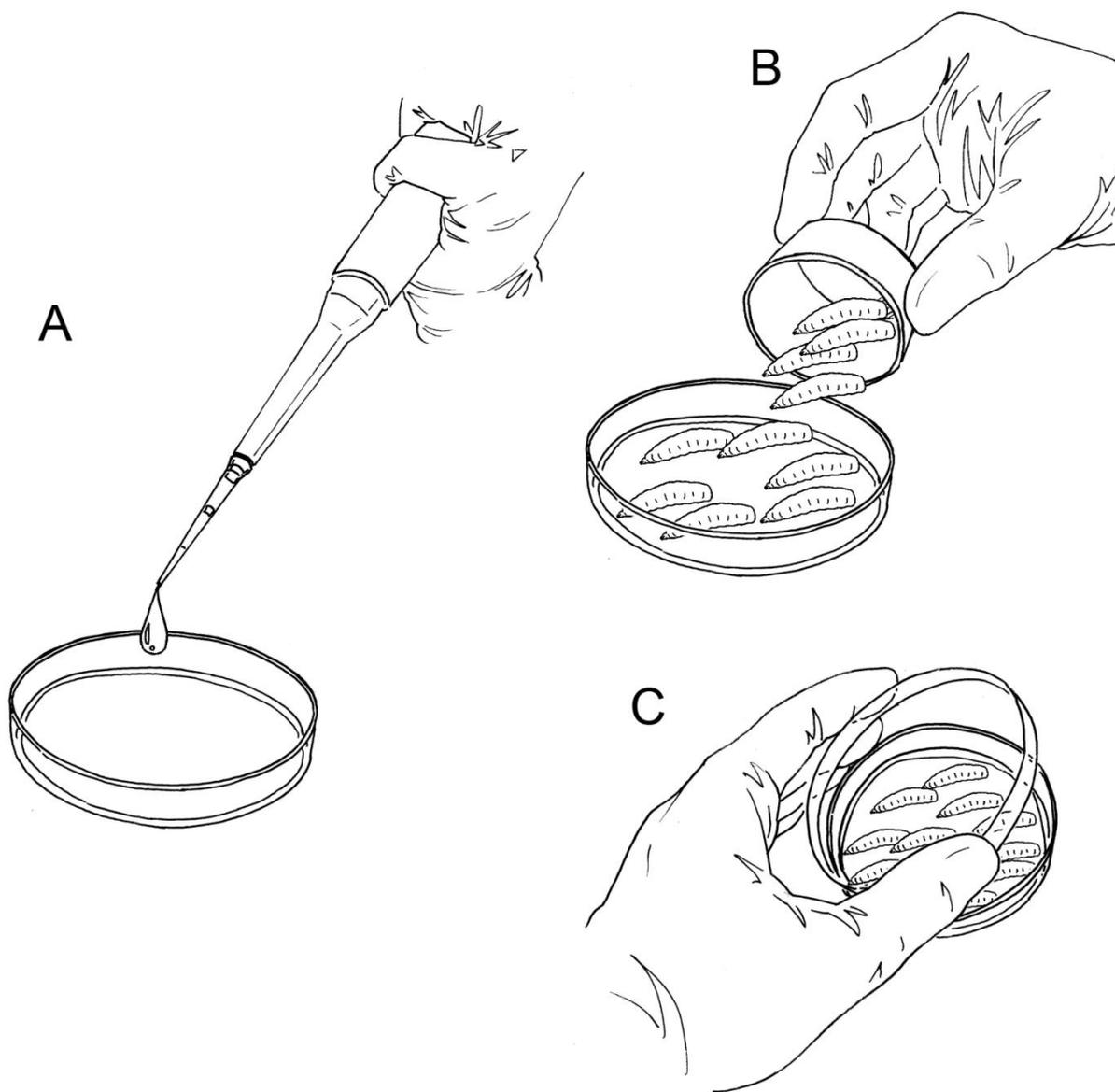
Os fenilpropanoides eugenol e (*E*)-cinamaldeído foram adquiridos da Sigma-Aldrich, ambos com 99,9% de pureza. O solvente acetona foi adquirido da Synth® (LABSYNTH® Produtos para Laboratórios Ltda.).

A diluição das substâncias foi feita em acetona 50% com a utilização de vortéx por um minuto para homogeneização da solução. As concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 30,0 mg/mL foram selecionadas com base nos resultados de Melo (2014).

### Experimento com larvas

Para larvas foi seguida a metodologia de aplicação descrita por Melo (2014) na qual papéis filtro foram colocados em placas de Petri (6x1,5 cm) e sobre estes foram aplicados 500µL da solução da substância a ser testada. Foram utilizados dois grupos controle, sendo um com água destilada e outro com o solvente (acetona 50%). As placas foram mantidas abertas por 10 minutos para permitir a volatilização do solvente. Em seguida, foram adicionadas 10 larvas de terceiro ínstar (pré-pupa) em cada placa, a qual foi fechada e mantida em câmaras climatizadas (28±2 °C e 60±10% UR); foi utilizada uma câmara para cada substância testada e uma para os grupos controles. Foram feitas 10 repetições para cada

tratamento e controles. Os grupos foram deixados para volatilizar nas seguintes condições ambientais:  $23\pm 3$  °C e  $70\pm 10\%$  UR. (Figura 5).



**Figura 2.1. Teste de contato com eugenol e (E)-cinamaldeído sobre larvas de *Musca domestica*.**  
A: Aplica-se 500  $\mu$ l da substância a ser testado sobre o papel filtro dentro da placa de Petri e aguarda-se 10 minutos para a volatilização do solvente. B: 10 larvas de terceiro instar são adicionadas à placa. C: A placa de Petri é fechada e mantida em condições controladas de temperatura e umidade ( $28\pm 2$  °C e  $60\pm 10\%$  UR).

A primeira avaliação (ML) foi feita após 48 horas da aplicação. Foram contadas as larvas mortas e vivas, sendo que as larvas que sobreviveram e empuparam foram mantidas nas placas de Petri por seis dias para o acompanhamento até a emergência de adultos. Após esse tempo uma nova avaliação foi feita (MPR) para determinar a mortalidade causada por cada

substância testada. Foi considerada morta toda pupa que não deu origem a um adulto. A eficácia do tratamento larval (ETL) foi calculada levando-se em conta essas duas avaliações para cada concentração das substâncias testadas de acordo com a fórmula proposta por Melo (2014):

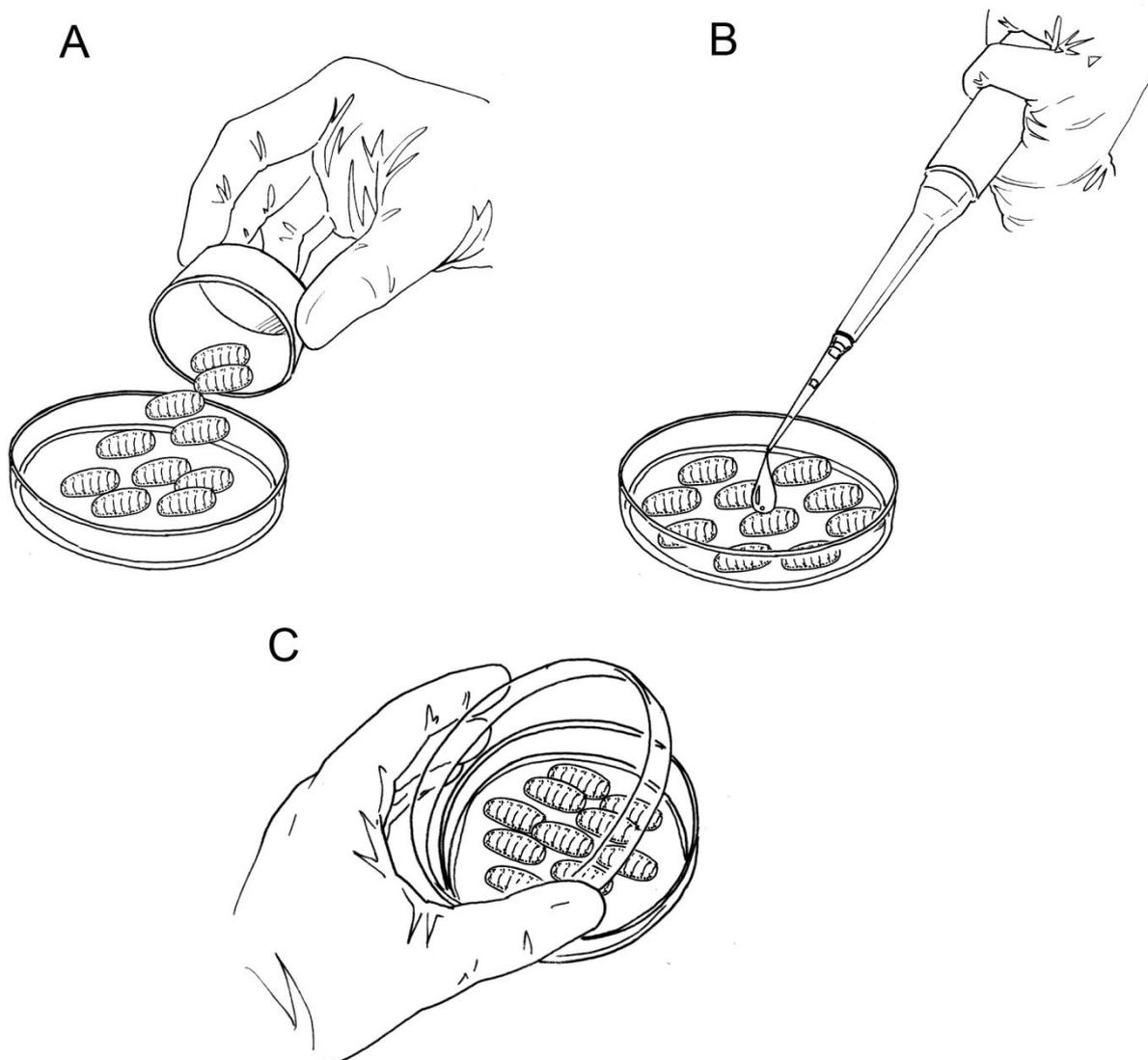
$$ETL = ML + [(100 - ML) \times MPR], \quad \text{onde } ML \text{ é a mortalidade larval, } 100 \times \left( \frac{\text{larvas mortas}}{\text{total larvas tratadas}} \right); \text{ e } MPR \text{ é a mortalidade das pupas recuperadas, } 100 \times \left( \frac{\text{pupas mortas recuperadas do tratamento larval}}{\text{total de pupas recuperadas do tratamento larval}} \right).$$

### **Experimento com pupas**

Em cada placa de Petri (9x1,5 cm) com papel filtro foram colocadas 10 pupas com um a dois dias de formação. Sobre cada uma foi aplicado, com o auxílio de uma micropipeta, 50 µL da solução da substância a ser testada. Foram utilizados dois grupos controle, sendo um com água destilada e outro com o solvente (acetona 50%). Assim como a metodologia de aplicação em larvas, as placas foram mantidas abertas por 10 minutos para permitir a volatilização do solvente; em seguida, foram fechadas e colocadas em câmaras climatizadas nas mesmas condições dos testes com larvas. Foram feitas 10 repetições para cada tratamento e controles. A avaliação da mortalidade pupal para cada substância foi feita seis dias após a aplicação, sendo considerados vivos apenas adultos que emergiram completamente do pupário (Melo, 2014).

Uma segunda avaliação foi realizada contabilizando adultos que apresentaram sinais de mau desenvolvimento, como asas e/ou abdômen atrofiados, obtendo-se assim o percentual de mau desenvolvimento dos adultos. Ao final, foi calculada a eficiência do tratamento pupal (ETP) de acordo com cada concentração, através da seguinte fórmula (Melo, 2014):

$$ETP = MP + [(100 - MP) \times PMD], \quad \text{onde } MP \text{ é a mortalidade pupal, } 100 \times \left( \frac{\text{pupas mortas}}{\text{total de pupas tratadas}} \right); \text{ e } PMD \text{ é o percentual de mau desenvolvimento dos adultos, } 100 \times \left( \frac{\text{adultos emergidos com mau desenvolvimento}}{\text{total de adultos emergidos do tratamento pupal}} \right).$$



**Figura 2.2. Teste de contato com eugenol e (*E*)-cinamaldeído sobre pupas de *Musca domestica*.** A: 10 pupas de um a dois dias são adicionadas a uma placa de Petri coberta com papel filtro. B: Sobre cada pupa são pipetados 50  $\mu$ L da substância a ser testada e aguarda-se 10 minutos para a volatilização do solvente. C: A placa de Petri é fechada e mantida em condições controladas de temperatura e umidade até a emergência do adulto ( $28\pm 2$  °C e  $60\pm 10\%$  UR).

### **Análise dos dados e determinação das concentrações letais**

A análise estatística foi feita por meio do software Bioestat versão 5.0 (Ayres et al., 2007). Os valores percentuais foram transformados em  $\sqrt{\text{arcseno } x}$  e submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). No caso de distribuição não paramétrica, os dados foram comparados através dos testes de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls ( $p < 0.05$ ). Foi realizada a análise probit através do programa POLOPC (LeOra Software, 1987,

Berkeley, CA, USA) (Finney, 1971) para o cálculo das concentrações letais 50% (CL<sub>50</sub>) e 90% (CL<sub>90</sub>).

## RESULTADOS

### Experimento com larvas

Os resultados da avaliação larvicida dos fenilpropanoides eugenol e (*E*)-cinamaldeído estão representados na Tabela 2.1. O presente estudo mostrou que a mortalidade larval para ambas as substâncias testadas diferiu dos grupos controles a partir da concentração de 2,5 mg/mL ( $p < 0,05$ ). Para a ETL, eugenol apresentou diferença do controle a partir da concentração de 1,25 mg/mL ( $p < 0,05$ ). Ambas as substâncias apresentaram eficácia de tratamento de 100% a partir da concentração e 5 mg/mL ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2.1:** Média ( $\pm$  desvio padrão) da mortalidade larval (ML), mortalidade de pupas recuperadas (MPR) e eficácia do tratamento larval (ETL) de larvas de *Musca domestica* tratadas com diferentes concentrações dos fenilpropanoides eugenol e (*E*)-cinamaldeído em condições de laboratório ( $28 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $60 \pm 10\%$ ).

Substância	Concentrações (mg/mL)	ML (%)	MPR (%)	ETL (%)
Eugenol	Controle1	0,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	3,0 <sup>a</sup> $\pm$ 4,8	3,0 <sup>a</sup> $\pm$ 4,8
	Controle2	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 3,2	4,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,2	5,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,3
	0,625	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 3,2	07,2 <sup>ab</sup> $\pm$ 8,6	8,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 10,3
	1,25	7,8 <sup>ab</sup> $\pm$ 7,6	16,9 <sup>b</sup> $\pm$ 11,8	23,6 <sup>b</sup> $\pm$ 10,7
	2,5	75,0 <sup>b</sup> $\pm$ 11,8	85,7 <sup>c</sup> $\pm$ 23,9	95,0 <sup>c</sup> $\pm$ 9,7
	5,0	97,9 <sup>c</sup> $\pm$ 4,5	100,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0	100,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0
	10,0	99,0 <sup>c</sup> $\pm$ 3,2	100,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0	100,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0
	15,0	100,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0	*	100,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0
	20,0	100,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0	*	100,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0
	30,0	98,0 <sup>c</sup> $\pm$ 4,2	100,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0	100,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0
<i>(E)</i> -cinamaldeído	Controle1	0,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	5,0 <sup>a</sup> $\pm$ 7,1	5,0 <sup>a</sup> $\pm$ 7,1
	Controle2	2,0 <sup>a</sup> $\pm$ 4,2	5,1 <sup>a</sup> $\pm$ 5,4	7,0 <sup>a</sup> $\pm$ 6,7
	0,625	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 3,2	6,0 <sup>a</sup> $\pm$ 7,0	7,0 <sup>a</sup> $\pm$ 6,7
	1,25	3,0 <sup>a</sup> $\pm$ 4,8	7,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 8,7	10,0 <sup>a</sup> $\pm$ 10,5
	2,5	73,0 <sup>b</sup> $\pm$ 9,5	48,3 <sup>bc</sup> $\pm$ 42,8	87,0 <sup>b</sup> $\pm$ 11,6
	5,0	98,0 <sup>bc</sup> $\pm$ 4,0	100,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0	100,0 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0
	10,0	100,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0	*	100,0 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0
	15,0	100,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0	*	100,0 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0
	20,0	100,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0	*	100,0 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0
	30,0	100,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0	*	100,0 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0

Médias seguidas por diferentes letras na mesma coluna diferem significativamente ( $p < 0,05$ ); N = 100. Controle 1: água destilada; Controle 2: Acetona 50%.\*: Todas as larvas morreram antes de empupar na primeira avaliação.

## Experimento com pupas

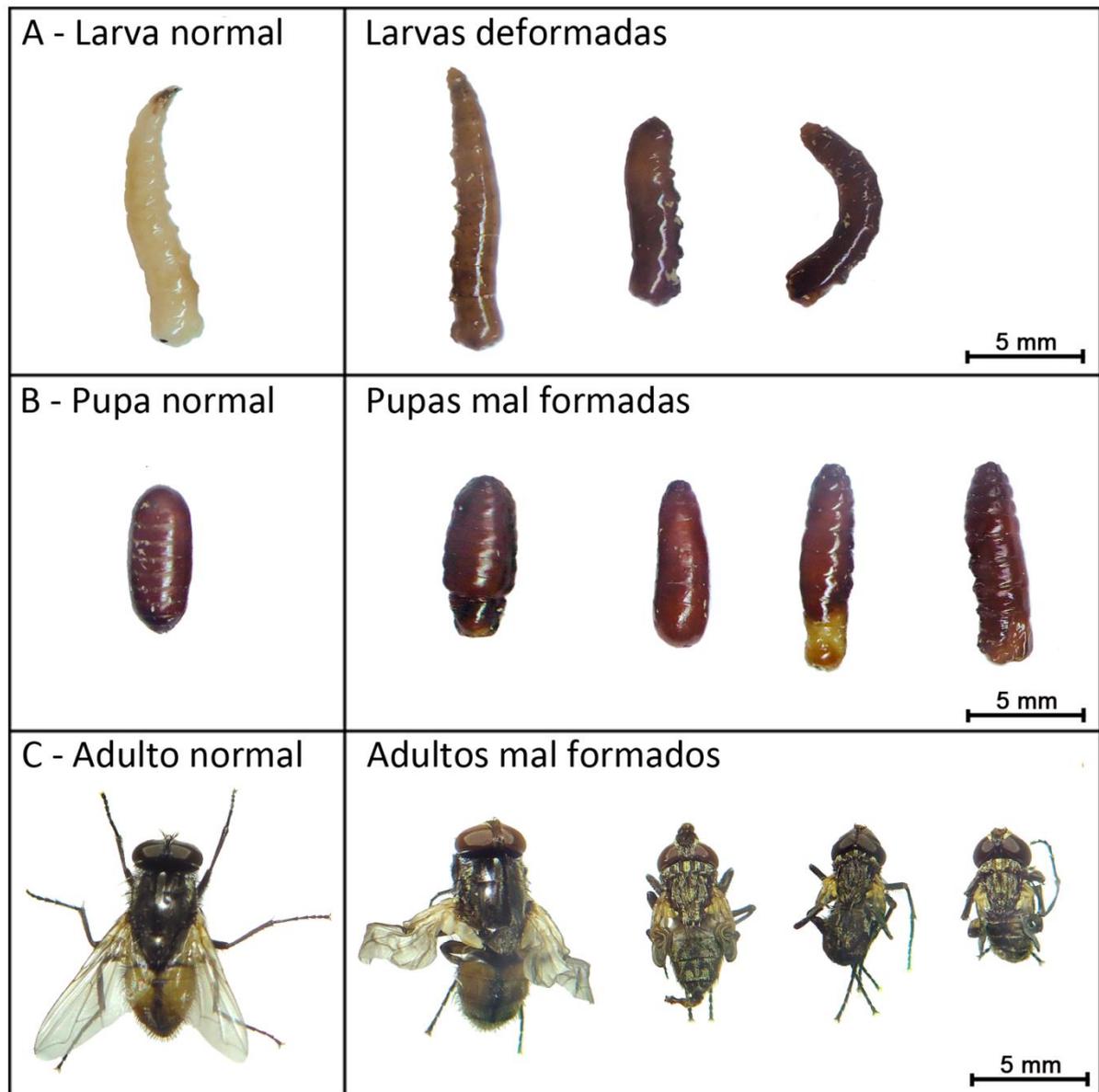
Os resultados da avaliação pupicida dos fenilpropanoides eugenol e (*E*)-cinamaldeído encontram-se na Tabela 2.2. Observa-se que (*E*)-cinamaldeído diferiu do controle a partir da concentração de 10mg/mL ( $p < 0,05$ ), apresentando a maior mortalidade pupal absoluta (49,3%) na concentração de 30 mg/mL ( $p < 0,05$ ). Eugenol apresentou maior mortalidade pupal absoluta (18%) na concentração de 30 mg/mL ( $p < 0,05$ ). Ambos os fenilpropanoides provocaram mal desenvolvimento de adultos nos grupos tratados com concentrações igual ou superiores a 10 mg/mL; no entanto, apenas os grupos tratados com (*E*)-cinamaldeído nas concentrações de 20 e 30 mg/mL diferiram significativamente do controle (26,5% e 43% respectivamente) ( $p < 0,05$ ) (Figura 7).

**Tabela 2.2:** Média ( $\pm$  desvio padrão) da mortalidade pupal (MP), percentual de má formação (PMF) e eficácia do tratamento pupal (ETP) de pupas de *Musca domestica* tratadas com diferentes concentrações dos fenilpropanoides eugenol e (*E*)-cinamaldeído em condições de laboratório ( $28 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $60 \pm 10\%$ ).

Substância	Concentrações (mg/mL)	MP (%)	PMF (%)	ETP (%)
Eugenol	Controle1	2,0 <sup>a</sup> ±4,2	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	2,0 <sup>a</sup> ±4,2
	Controle2	2,0 <sup>a</sup> ±4,2	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	2,0 <sup>a</sup> ±4,2
	0,625	4,0 <sup>ab</sup> ±5,2	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	4,0 <sup>a</sup> ±5,2
	1,25	4,0 <sup>ab</sup> ±5,2	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	4,0 <sup>a</sup> ±5,2
	2,5	6,0 <sup>ab</sup> ±8,4	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	6,0 <sup>ab</sup> ±8,4
	5,0	2,0 <sup>a</sup> ±4,2	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	2,0 <sup>a</sup> ±4,2
	10,0	10,0 <sup>ab</sup> ±9,4	4,3 <sup>a</sup> ±13,5	13,0 <sup>abc</sup> ±17,7
	15,0	13,0 <sup>ab</sup> ±12,5	14,9 <sup>a</sup> ±17,3	26,0 <sup>c</sup> ±17,8
	20,0	17,0 <sup>b</sup> ±13,4	5,7 <sup>a</sup> ±18,1	21,0 <sup>bc</sup> ±21,3
	30,0	18,0 <sup>b</sup> ±16,2	20,5 <sup>a</sup> ±35,8	32,0 <sup>bc</sup> ±34,9
( <i>E</i> )-cinamaldeído	Controle1	4,1 <sup>a</sup> ±5,3	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	4,1 <sup>a</sup> ±5,3
	Controle2	3,0 <sup>a</sup> ±4,8	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	4,0 <sup>a</sup> ±5,5
	0,625	2,0 <sup>a</sup> ±4,2	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	2,0 <sup>a</sup> ±4,5
	1,25	3,1 <sup>a</sup> ±5,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	3,1 <sup>a</sup> ±5,0
	2,5	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0
	5,0	4,0 <sup>a</sup> ±7,0	0,0 <sup>a</sup> ±0,0	4,0 <sup>a</sup> ±7,0
	10,0	32,0 <sup>b</sup> ±16,9	3,6 <sup>ab</sup> ±8,3	34,0 <sup>b</sup> ±17,8
	15,0	30,0 <sup>b</sup> ±18,3	9,6 <sup>ab</sup> ±23,1	37,0 <sup>b</sup> ±23,6
	20,0	49,0 <sup>b</sup> ±25,6	26,5 <sup>bc</sup> ±24,2	64,0 <sup>c</sup> ±21,2
	30,0	49,3 <sup>b</sup> ±22,5	43,0 <sup>c</sup> ±31,2	67,2 <sup>c</sup> ±27,4

Médias seguidas por diferentes letras na mesma coluna diferem significativamente ( $p < 0,05$ ); N = 100. Controle 1: água destilada; Controle 2: Acetona 50%.

Para a eficácia do tratamento pupal, (*E*)-cinamaldeído apresentou eficiência significativa a partir da concentração de 10 mg/mL ( $p < 0,05$ ), enquanto eugenol foi eficiente a partir de 15 mg/mL ( $p < 0,05$ ). O maior valor absoluto para esta avaliação foi observado para (*E*)-cinamaldeído na concentração de 30 mg/mL (67,2%) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.3.** Efeitos morfológicos secundários observados após pupas de *Musca domestica* serem exposta ao contato com os fenilpropanoides eugenol e (*E*)-cinamaldeído. **A:** Larva normal em comparação com larvas tratadas apresentando enegrecimento, inchaço e morte antes de empuparem. **B:** Pupa normal em comparação a pupas mal formadas provenientes do tratamento de larvas, apresentando forma larviforme e pupário incompleto e com estreitamento de uma das extremidades. **C:** Adulto normal em comparação com adultos mal formados resultantes do tratamento pupal, apresentando atrofia alar, tamanho corporal reduzido e ptilinum exposto.

### Determinação das concentrações letais

Os valores obtidos para as concentrações letais de ambas as substâncias avaliadas sobre larvas e pupas estão representados na Tabela 2.3 e Tabela 2.4, respectivamente. As menores concentrações letais para mortalidade larval foram obtidas por (*E*)-cinamaldeído, que apresentou CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> de 2,20 e 4,73 mg/mL, respectivamente. Quando avaliados os resultados para a eficácia de tratamento larval, eugenol obteve menores valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>, sendo 1,5 e 3,75 mg/mL respectivamente. Para o tratamento pupal, (*E*)-cinamaldeído apresentou CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> de 27,46 e 173,77 mg/mL, respectivamente para mortalidade pupal; para a eficácia do tratamento pupal os valores foram de, respectivamente, 18,08 e 78,83 mg/mL. O fenilpropanoide eugenol apresentou CL<sub>90</sub> elevadas, de modo que essas não foram incluídas na tabela, visto que seus intervalos de confiança (IC) não puderam ser calculados.

**Tabela 2.3:** Concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) dos fenilpropanoides (*E*)-cinamaldeído e eugenol sobre larvas L3 pré-pupa de *Musca domestica* calculadas sobre a mortalidade larval e eficácia do tratamento larval, em condições de laboratório (28±2°C e UR 60±10%).

Tratamentos	Mortalidade Larval		Eficácia do Tratamento Larval	
	CL <sub>50</sub> (95% IC)	CL <sub>90</sub> (95% IC)	CL <sub>50</sub> (95% IC)	CL <sub>90</sub> (95% IC)
Eugenol	3,33 (2,97-3,74)	7,01 (5,95-9,81)	1,50 (1,32-1,72)	3,75 (3,07-5,63)
( <i>E</i> )-cinamaldeído	2,20 (1,96-2,48)	4,73 (3,97-6,79)	2,27 (2,00-2,59)	5,73 (4,75-8,41)

IC: Intervalo de confiança, a atividade da substância é considerada significativamente diferente quando o IC de 95% não se sobrepõe.  
Valores da CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> em mg/mL.

**Tabela 2.4:** Concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) dos fenilpropanoides (*E*)-cinamaldeído e eugenol sobre pupas de 1-2 dias de *Musca domestica* calculadas sobre a mortalidade larval e eficácia do tratamento larval, em condições de laboratório (28±2°C e UR 60±10%).

Tratamentos	Mortalidade Pupal		Eficácia do Tratamento Pupal	
	CL <sub>50</sub> (95% IC)	CL <sub>90</sub> (95% IC)	CL <sub>50</sub> (95% IC)	CL <sub>90</sub> (95% IC)
Eugenol	1220,42 (85,28-17464,29)	*	1783,28 (37,66-84435,30)	*
( <i>E</i> )-cinamaldeído	27,46 (20,81-36,24)	173,77 (91,20-648,69)	18,08 (15,14-21,60)	78,83 (52,67-179,71)

IC: Intervalo de confiança, a atividade da substância é considerada significativamente diferente quando o IC de 95% não se sobrepõe. Valores da CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> em mg/mL. \* Não foi possível calcular a concentração letal.

## DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a atividade inseticida dos fenilpropanoides eugenol e (*E*)-cinamaldeído sobre larvas pré-pupa e pupas de *M. domestica*. Ambas as substâncias apresentaram atividade inseticida sobre os estágios imaturos do díptero, com (*E*)-cinamaldeído causando impacto direto na mortalidade de larvas a partir de 1,25 mg/mL enquanto o eugenol apresentou atividade semelhante a partir de 2,5 mg/mL. As larvas que morreram antes de empuparem tinham aparência escurecida, inchada e com manchas (Figura 7-A). Ainda, foi observado impacto secundário, ocasionando mal desenvolvimento de pupas recuperadas (Figura 7-B), o que levou à não emergência do adulto. Este fato pode ser observado principalmente para a concentração de 1,25 mg/mL de eugenol, o que contribuiu para um aumento da eficácia do tratamento larval desta substância.

Os resultados para os tratamentos sobre pupas mostram que (*E*)-cinamaldeído também apresentou atividade direta na mortalidade pupal em menores concentrações (10mg/mL) do que o eugenol (20 mg/mL), porém o efeito secundário apresentado pelos tratamentos resultou na eficácia do tratamento pupal a partir de 10 mg/mL para (*E*)-cinamaldeído e de 15 mg/mL para eugenol. Estes efeitos secundários observados no tratamento pupal não interromperam o processo de metamorfose em adultos, que emergiram com alterações morfológicas como asas atrofiadas ou não distendidas completamente, tamanho corporal menor e deformação do abdome e, em alguns indivíduos, não retração do ptilinum após esclerotização do corpo (Figura 7-C).

Outros autores já relataram a atividade inseticida do eugenol através de aplicação tópica sobre adultos de *M. domestica*, com a CL<sub>50</sub> variando entre 1,8 e 124 µg/mosca (Isman, 2000; Samarasekera et al., 2006; Pavela, 2011). Dentre estes estudos, Samarasekera et al. (2006) foi o único que avaliou a atividade de eugenol e cinamaldeído (não discriminando qual isômero), e os óleos essenciais dos quais são constituintes, encontrando os valores de CL<sub>50</sub> de 1,8 e 1,04 µg/mosca para eugenol e cinamaldeído, respectivamente, e propondo que a atividade dos óleos de casca e folhas de *Cinnamomum zeylanicum* deve-se a atividade de eugenol e cinamaldeído, principalmente. Estes estudos diferem no método de aplicação, na dosagem e concentrações utilizadas, o que pode explicar a grande variação nos resultados obtidos. Esses mesmos fatores, além da diferença de estágios utilizados, dificulta que comparações mais aprofundadas sejam feitas entre os estudos e em relação ao presente estudo. No entanto, através dos resultados obtidos por Samarasekera et al. (2006), pode-se

perceber que cinamaldeído apresentou atividade levemente superior ao eugenol, o que coincide com os resultados obtidos em nosso estudo ao avaliarmos o impacto direto destas substâncias na mortalidade larval.

Sinthusiri e Soonwera (2013) testaram a atividade de vários óleos essenciais em relação a tempo de exposição sobre adultos de *M. domestica*. Os autores encontraram que, dentre os 20 óleos essenciais testados, o óleo de *Cinnamomon verum* foi o que apresentou atividade em menor concentração e em menos tempo de exposição, paralisando (efeito “*knock down*”) 24% das moscas após 30 minutos de exposição, assim como atingindo 24% de mortalidade à concentração de 1%. Porém, esse efeito não se repetiu para concentrações mais elevadas do óleo, com outros óleos mostrando-se mais eficientes. No presente estudo o fenilpropanoide (*E*)-cinamaldeído, presente no óleo de *C. verum*, mostrou toxicidade semelhante ao eugenol nas concentrações testadas sobre larvas, porém eugenol causou mais efeitos secundários, levando à maior mortalidade de pupas recuperadas, o que contribuiu para que o eugenol apresentasse  $CL_{50}$  menor que (*E*)-cinamaldeído neste teste. Essas observações podem sugerir que o efeito do (*E*)-cinamaldeído ocorre mais rápido que o eugenol, perdendo a atividade de modo a diminuir o efeito secundário a longo prazo.

Em estudo recente, Melo (2014) avaliou a atividade de outros dois monoterpenos, timol e carvacrol, e do óleo de *L. sidoides* sobre larvas e pupas de *M. domestica*, mensurando os impactos secundários no desenvolvimento dos estágios tratados. Os resultados obtidos para as substâncias aplicadas sobre larvas de terceiro ínstar são semelhantes aos do presente estudo, apresentando atividade larvicida a partir da concentração de 2,5 mg/mL. O autor encontrou valores de CLs menores para o carvacrol na eficácia do tratamento larval ( $CL_{50}$  de 0,26 mg/mL e  $CL_{90}$  de mg/mL) quando comparados aos nossos resultados para o mesmo tratamento com eugenol e (*E*)-cinamaldeído. Apesar de que todas as quatro substâncias são monoterpenos, os resultados para o tratamento pupal mostram que (*E*)-cinamaldeído, em nosso estudo, apresentou valores de  $CL_{90}$  para a eficácia de tratamento pupal inferiores aos encontrados para timol, carvacrol e óleo de *L. sidoides* pelo referido autor. Essa diferença pode estar relacionada à presença da cadeia de três carbonos (propila) ligada ao anel aromático do eugenol e (*E*)-cinamaldeído. Vale ressaltar, porém, que o valor da  $CL_{90}$  encontrado para (*E*)-cinamaldeído está parcialmente englobado pelo intervalo de confiança dos valores  $CL_{90}$  de timol e carvacrol do referido estudo. Em ambos os estudos a contabilização dos resultados secundários do tratamento de larvas e pupas na eficiência do tratamento contribuiu para a redução das CLs das substâncias testadas.

Efeitos secundários no desenvolvimento de larvas e pupas de *M. domestica* já foram relatados na literatura para outras substâncias. Kumar et al. (2013) testaram seis monoterpenos sobre larvas de segundo ínstar e pupas de 2-3 dias, acompanhando o seu desenvolvimento, e observaram efeitos secundários no desenvolvimento de pupas tratadas com mentol e mentona, com adultos não emergindo completamente do pupário ou adultos emergindo com anomalias. Da mesma forma, Naqvi et al. (2007) observaram anomalias no desenvolvimento de larvas tratadas com extrato de nim (N-9), acompanhadas até a idade adulta, com a presença de pupas mal formadas e adultos que não emergiram completamente do pupário. Ambos os estudos não estimaram o impacto dessas anomalias na mortalidade e eficiência do tratamento como mensurado no presente estudo; no entanto, as descrições das anomalias encontradas pelos autores correspondem ao que foi encontrado em nossos estudos, principalmente nos adultos provenientes do tratamento de pupas com os fenilpropanoides eugenol e (*E*)-cinamaldeído.

Os impactos secundários do tratamento com substâncias de origem vegetal observados neste e nos demais estudos discutidos previamente representam um dado positivo para o uso dessas substâncias no controle de populações de moscas, visto que indivíduos com má formação podem não concluir seu desenvolvimento, além do que adultos mal formados apresentariam dificuldade para sobreviver e se reproduzir no ambiente. Esses resultados tornam interessante a realização de mais estudos que avaliem os impactos secundários no desenvolvimento e na biologia de estágios imaturos de *M. domestica*.

## CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou o potencial dos fenilpropanoides eugenol e (*E*)-cinamaldeído no controle de larvas e pupas de *M. domestica* por meio da aplicação tópica, representando uma possível alternativa para o desenvolvimento de futuros inseticidas mais seguros ambientalmente e menos tóxicos para animais, auxiliando no controle da população deste díptero através do Manejo Integrado de Pragas. Visto que (*E*)-cinamaldeído apresentou melhor atividade larvicida, ao passo que eugenol foi mais eficiente no controle de pupas, sugere-se ainda a avaliação da atividade combinada destas substâncias, com o propósito de aumentar a eficiência do controle deste díptero, devido as propriedades complementares destes fenilpropanoides no controle dos estágios imaturos de *M. domestica*. Mais estudos são

necessários para compreender melhor os mecanismos de ação destas substâncias e seus efeitos na biologia destes insetos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, G.R., ZAPATER, M., TOLOZA, A.C. Insecticide resistance of house fly, *Musca domestica* (L.) from Argentina. **Phytotherapy Research**, v.105(2), p.489–493, 2009.

ALI, S. M., KHAN, A. A., AHMED, I., MUSADDIQ, M., AHMED, K. S., POLASA, H. Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.43(10), p.5275-5277, 2005.

AYRES, M., AYRES JUNIOR, M., AYRES, D.L., SANTOS, A.A.S. **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. Instituto Mamirauá, Belém, 2007.

BÉJAR, V., CHUMPITAZ, J., PAREJA, E., VALENCIA, E., HUAMÁN, A., SEVILLA, C., TAPIA, M., SAEZ, G. *Musca domestica* como vector mecánico de bacterias enteropatógenas en mercados y basurales de Lima y Callao. **Revista Peruana Medicina Experimental y Salud Publica**, v.23(1), p.39-43, 2006.

BRAVERMAN, Y., CHIZOV-GINZBURG, A., SARAN, A., WINKLER, M. The role of houseflies (*Musca domestica*) in harbouring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel. **Revue Scientifique et Technique**, v.18, p.681–690, 1999.

BRITO, L.G.; OLIVEIRA, M.C.S.; GIGLIOTI, R.; JUNIOR, F. S.; NETTO, F.G.S., CHAGAS, A.C.S.; CELESTINO, O.O. **Manual de identificação, importância e manutenção de colônias estoque de dípteros de interesse veterinário em laboratório**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2008. 25 p.

CARRERA, M. **Insetos de interesse médico e veterinário**. Curitiba: Ed. UFPR; Brasília. 228p, 1991.

CARVALHO, C. J. B., MOURA, M. O., RIBEIRO, P. B. Chave para identificação de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.46(2), p.107-114, 2002.

CASTRO, B. G. **Avaliação do papel de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) na veiculação de *Escherichia coli* causadora de mastite bovina e outros agentes bacterianos.** Tese (Doutorado em Ciências) 2008. 87 f – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

CAVALCANTI, S. C. H., NICULAU, E. D. O. S. S., BLANCK, A. F., CÂMARA, C. A. G., ARAÚJO, I. N. E ALVES, P. B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (Tetranychusurticae Koch). **Bioresource Technology**, v.101(2), p.829-832, 2010.

COITINHO, R. L. B. C., OLIVEIRA, J. V., GONDIM JÚNIOR, M. G. C., CÂMARA, C. A. G. Atividade inseticida de óleos vegetais sobre *Sitophilus zeamais* Mots (Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. **Revista Caatinga**, v.19(2), p.176-182, 2006.

CRIVELENTI, L. Z., GUILHERME, L. C., MORELLI. S., BORIN, S. Toxicity of Organophosphate Insecticide Abate® to larvaes of *Poecilia reticulata*. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 6, p.65-68, 2011.

DAEMON, E., MATURANO, R., MONTEIRO, C. M. O., GOLDNER, M. S., MASSONIC, T. Acaricidal activity of hydroethanolic formulations of thymol against *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v.186, p.542– 545, 2012.

FINNEY, D.S. **Probit Analysis**. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1971.

FOTEDAR, R., BANERJEE, U., SINGH, S., SHRINIWAS, VERMA, A.K. The housefly (*Musca domestica*) as a carrier of pathogenic microorganisms in a hospital environment. **Journal of Hospital Infection**, v.20, p.209-215, 1992.

HE, M., DU, M., FAN, M., BIAN, Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v.163(3), p.137-43, 2012.

ISLAM, R., KHAN, R. I., AL-REZA., S. M., JEONG, Y. T., SONG, C. H., KHALEQUZZAMAN, M. Chemical composition and insecticidal properties of *Cinnamomum aromaticum* (Nees) essential oil against the stored product beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, p.1241–1246, 2009.

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

ISMAN, M.B., MACHIAL, C.M. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. **Advances in Phytomedicine**, v.3, p.29-44, 2006.

JUMBO, L. O. V., FARONI, L. R. A., OLIVEIRA, E. E., PIMENTEL, M. A., SILVA, G. N. Potential use of clove and cinnamon essential oils to control the beanweevil, *Acanthoscelides obtectus* Say, in small storage units. **Industrial Crops and Products**, v.56, p.27–34, 2014.

KUMAR, P., MISHRA, S., MALIK, A., SATYA, S. Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). **Acta Tropica**, v.122(2), p.212-218, 2012a.

KUMAR, P., MISHRA, S., MALIK, A., SATYA, S. Efficacy of *Mentha x piperita* and *Mentha citrata* essential oils against housefly, *Musca domestica* L. **Industrial Crops and Products**, v.39(0), p.106-112, 2012b.

KUMAR, P., MISHRA, S., MALIK, A., SATYA, S. Housefly (*Musca domestica* L.) control potential of *Cymbopogon citratus* Stapf. (Poales: Poaceae) essential oil and monoterpenes (citral and 1,8-cineole). **Parasitology Research**, v.112(1), p.69-76, 2013.

MALIK, A., SINGH, N. E SATYA, S. House fly (*Musca domestica*): a review of control strategies for a challenging pest. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.42(4), p.453-469, 2007.

MELO, D.R. **Atividade do óleo essencial de *Lippia sidoides* (VERBENACEAE) e dos monoterpenos timol e carvacrol sobre larvas e pupas de *Musca domestica* LINNAEUS,**

**1758 (DIPTERA: MUSCIDAE).** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. 44p, 2014.

MONTEIRO, C. M. O., MATURANO, R., DAEMON, E., CATUNDA-JUNIOR, F. E. A., CALMON, F., SENRA, T. S., FAZA, A., CARVALHO, M. G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v.111(3), p.1295-300, 2012.

NAQVI, S. N. H., TABASSUM, R., KHAN, M.FERHANULLAH, YASMIN, N., NURULAIN, S. M., BURNEY, A. A. Toxic, residual, and teratomorphic effect of a Neem extract (N-9) in comparison to Coopex 25 WP (Permethrin + Bioallethrin) against *Musca domestica* L. (Holland Strain). **Turkish Journal of Zoology**, v.31(2), p.127-130, 2007.

PALACIOS, S. M., BERTONI, A., ROSSI, Y., SANTANDER, R., URZÚA, A. Insecticidal activity of essential oils from native medicinal plants of Central Argentina against the house fly, *Musca domestica* (L.). **Parasitology Research**, v.106(1), p.207-212, 2009a.

PALACIOS, S. M., BERTONI, A., ROSSI, Y., SANTANDER, R., URZÚA, A. Efficacy of essential oils from edible plants as insecticides against the house fly, *Musca domestica* L. **Molecules**, v.14(5), p.1938-1947, 2009b.

PAVELA, R. Acute and synergistic effects of some monoterpenoid essential oil compounds on the House Fly (*Musca domestica* L.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.11(5), p.451-459, 2008a.

PAVELA, R. Insecticidal properties of phenols on *Culex quinquefasciatus* Say and *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, v.109(6), p.1547-1553, 2011.

PAVELA, R. Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.). **Phytotherapy Research**, v.22(2), p.274-278, 2008b.

PAVELA, R. Acute and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the larvae of *Spodoptera littoralis*. **Journal of Biopesticides**, v.3(3), p.573-578, 2010.

PAVELA, R. Insecticidal properties of phenols on *Culex quinquefasciatus* Say and *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, v.109(6), p.1547-1553, 2011.

PAVELA, R. Efficacy of naphthoquinones as insecticides against the house fly, *Musca domestica* L. **Industrial Crops and Products**, v.43(0), p.745-750, 2013.

PINTO, S.B., SOCCOL, V.T., VENDRUSCOLO, E., ROCHADELLI, R., RIBEIRO, P. B., FREITAG, A., HENEMANN, C., UEMURA, M. Bioecologia de *Dermatobia hominis* (LINNAEUS Jr., 1781) em Patolina, Paraná, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32(5), p.821-827, 2002.

ROSSI, Y. E., CANAVOSO, L., PALACIOS, S.M. Molecular response of *Musca domestica* L. to *Mintostachys verticillata* essential oil, (4R) (+)-pulegone and menthone. **Fitoterapia**, v.83(2), p.336-342, 2012.

ROSSI, Y. E., PALACIOS, S. M. Fumigant toxicity of *Citrus sinensis* essential oil on *Musca domestica* L. adults in the absence and presence of a P450 inhibitor. **Acta tropica**, v.127(1), p.33-7, 2013.

SAMARASEKERA, R., KALHARI, K.S., WEERASINGHE, I.S. Insecticidal activity of essential oils of *Ceylon cinnamomum* and *Cymbopogon* species against *Musca domestica*. **Journal of Essential Oil Research**, v.18, p.352–354, 2006.

Senra, T. O. S., Calmon, F., Zeringota, V., Monteiro, C. M. O., Maturano, R., Matos, R., Melo, D., Gomes, G., Carvalho, M., Daemon, E., 2013a. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, Oct; 112(10):3471-6.

SENRA, T. O. S., CALMON, F., ZERINGOTA, V., MONTEIRO, C. M. O., MATURANO, R., MATOS, R., MELO, D., GOMES, G., CARVALHO, M., DAEMON, E. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma*

*cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.112(10), p.3471-6, 2013a.

SENRA, T. O. S., ZERINGOTA, V., MONTEIRO, C. M. O., CALMON, F., MATURANO, R., GOMES, G. A., FAZA, A., CARVALHO, M. G., DAEMON, E. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (E)-cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.112(4), p.1461-1466, 2013b.

SILVA, A.S, HECK, C.A, DOYLE, R.L, MONTEIRO, S.G. Levantamento das espécies de dípteros na região de Santa Maria baseado em diferentes substratos. **Revista da Faculdade Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.12(1), p.51-58, 2005.

SINTHUSIRI, J. e SOONWERA, M. Efficacy of herbal essential oils as insecticides against the housefly, *Musca domestica* L. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.44(2), p.188-96, 2013.

TARELLI, G., ZERBA, E. N., ALZOGARAY, R. A. Toxicity to vapor exposure and topical application of essential oils and monoterpenes on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, v.102(3), p.1383-1388, 2009.

URZÚA, A., SANTANDER, R., ECHEVERRIA, J., VILLALOBOS, C., PALACIOS, S. M., ROSSI, Y. Insecticide properties of the essential oils from *Haplopappus foliosus* and *Bahia ambrosoides* against the house fly, *Musca domestica* L. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v.55, p.392–395, 2010.

YEOM, H. J., KANG, J., KIM, S. W., PARK, I. K. Fumigant and contact toxicity of Myrtaceae plant essential oils and blends of their constituents against adults of German cockroach (*Blattella germanica*) and their acetylcholinesterase inhibitory activity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.107, p.200–206, 2013.

ZERINGÓTA, V., SENRA T. O. S., CALMON, F., MATURANO, R., FAZA, A. P., CATUNDA-JUNIOR, F. E., MONTEIRO, C. M. O., CARVALHO, M.G. C., DAEMON, E.

Repellent activity of eugenol on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.112, p.2675–2679, 2013.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos estudos mostraram resultados inéditos sobre a toxicidade de quatro solventes e um surfactante sobre estágios imaturos de *Musca domestica*, evidenciando o surfactante Tween 80 a 5% como a única substância que não apresentou toxicidade para ambos os estágios. No entanto, ao permitir a volatilização dos demais solventes, é possível utilizá-los de forma segura para larvas. O modo de aplicação sobre pupas deve ser revisto com o intuito de evitar o contato direto do solvente sobre as pupas, de forma a certificar que estes não interferirão nos resultados de testes com outras substâncias.

Apesar de o surfactante Tween 80, em concentrações iguais ou inferiores a 5%, não apresentar toxicidade para larvas e pupas de *M. domestica*, é incapaz de homogeneizar apropriadamente algumas substâncias, como os fenilpropanoides utilizados no nosso segundo estudo. Tal fato nos levou a escolha do solvente acetona a 50% para a diluição dos fenilpropanoides testados, visto que testes preliminares mostraram que ao diluir a acetona, o efeito tóxico anteriormente observado sobre pupa foi anulado.

Os resultados obtidos pelos experimentos com eugenol e (*E*)-cinamaldeído demonstram o potencial inseticida destas substâncias no controle de larvas e pupas de *M. domestica* submetidas ao teste de contato. Ao contabilizar os efeitos secundários causados pelo contato com essas substâncias em larvas (mortalidade de pupas recuperadas) e em pupas (má-formação de adultos), evidenciamos a potencialização da atividade inseticida de eugenol e (*E*)-cinamaldeído sobre esses estágios. Nos resultados sobre pupas, quando os fenilpropanoides apresentaram menor potencial inseticida, esse percentual de má formação avaliado mostrou importância significativa ao ser contabilizado juntamente à mortalidade pupal direta, proporcionando um aumento na eficácia do tratamento pupal. Ainda, vimos que eugenol apresentou melhores resultados sobre larvas, enquanto cinamaldeído foi mais eficiente no controle de pupas, de modo que se faz interessante investigar a possibilidade de utilizar ambas as substâncias em conjunto, buscando uma atividade sinérgica para o controle de imaturos de *M. domestica*.

Desta forma, concluímos que eugenol e (*E*)-cinamaldeído apresentam potencial inseticida sobre estágios imaturos de *M. domestica*, enfatizando a necessidade de mais investigações com essas substâncias combinadas que possam levar ao desenvolvimento de produtos ambientalmente mais seguros e não tóxicos, como alternativa aos inseticidas sintéticos ou sua aplicação em técnicas de Manejo Integrado de Pragas.