

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

Diego Rodrigues Melo

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)

Juiz de Fora

2014

Diego Rodrigues Melo

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 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

2014

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

Melo, Diego Rodrigues.

Atividade do óleo essencial de *Lippia sidoides* (VERBENACEAE) e dos monoterpenos timol e carvacrol sobre larvas e pupas de *Musca domestica* LINNAEUS, 1758 (DIPTERA: MUSCIDAÉ) / Diego Rodrigues Melo. -- 2014.
42 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, 2014.

1. Contato tóxico. 2. Larvicida. 3. Mosca doméstica. 4. Pupicida. 5. Terpeno. I. Pinto, Erik Daemon de Souza , orient. II. Título.

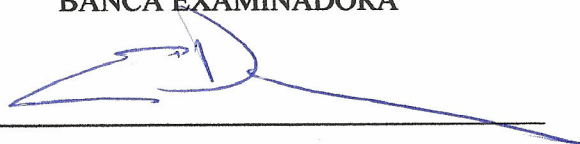
Diego Rodrigues Melo

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)

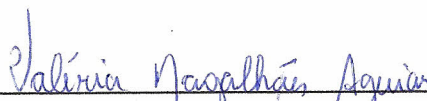
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre

Aprovada em 18 de fevereiro de 2014.

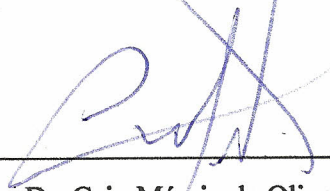
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Erik Daemon de Souza Pinto (orientador)



Prof.^a Dr.^a Valéria Magalhães Aguiar



Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro

Aos meus pais que sempre incentivaram a educação como princípio para a vida. Em especial à minha mãe que sempre me apoiou e incentivou diante das dificuldades, visando minha formação pessoal e profissional.

Agradecimentos

Ao meu orientador prof. Dr. Erik Daemon pela oportunidade oferecida, voto de confiança, apoio e incentivo dados principalmente naqueles momentos em que tudo dava errado. Seus ensinamentos e experiência de vida foram de grande valia para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

À família do Laboratório de Artrópodes Parasitos (LAP), Aline Faza, Caio Monteiro, Fernanda Calmon, Laryssa Xavier, Ralph Maturano, Renata Matos, Tatiane Novato, Tatiane Senra e Viviane Zeringóta, pelo apoio durante a execução dos experimentos, dos diversos pilotos realizados e, principalmente, pela amizade e inúmeros momentos de risadas vividos no antigo LAP.

Aos colegas de mestrado que proporcionaram momentos de descontração e ensinamentos durante o convívio nas disciplinas.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal pelo convívio, ensinamentos e boa vontade durante esses 24 meses de curso.

À minha namorada Aline Amorim pelos momentos vividos, paciência e palavras de conforto ditas nos momentos de dificuldades que, por sinal, foram inúmeros.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão e bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

Leonardo Da Vinci

Sumário

Lista de Tabelas	09
Lista de Figuras	10
Resumo.....	11
Abstract	12
1. Introdução.....	13
2. Revisão Bibliográfica.....	15
2.1. Muscidae.....	15
2.2. <i>Musca domestica</i>	15
2.3. Controle	17
2.4. Controle com inseticidas sintéticos.....	17
2.5. Controle com produtos de origem vegetal	18
2.6. Outras formas de controle	20
3. Atividade do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> (VERBENACEAE) e dos monoterpenos timol e carvacrol sobre larvas e pupas de <i>Musca domestica</i> LINNAEUS, 1758 (DIPTERA: MUSCIDAE).....	21
3.1. Resumo	21
3.2. Introdução.....	22
3.3. Material e Métodos	24
3.3.1. Local dos experimentos.....	24
3.3.2. Óleo essencial e monoterpenos	24
3.3.3. Análise dos constituintes do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	24
3.3.4. Preparação das formulações	24
3.3.5. Procedência e manutenção da colônia de <i>Musca domestica</i>	25
3.3.6. Experimento com larvas.....	26
3.3.7. Experimento com pupas	27
3.3.8. Determinação das doses letais	27
3.3.9. Análise estatística.....	27
3.4. Resultados.....	28
3.4.1. Experimento com larvas.....	28

3.4.2. Experimento com pupas	28
3.4.3. Determinação das doses letais	28
3.5. Discussão	30
3.6. Conclusão	35
3.7. Agradecimentos	35
3.8. Referências Bibliográficas.....	36

Lista de Tabelas

1. Tabela 1 – Composição química, índice de retenção (IRc) e percentual de compostos identificados do óleo essencial de *Lippia sidoides*..... 25
2. Tabela 2 – Média (\pm desvio padrão) de mortalidade de larva (terceiro instar) de *Musca domestica* tratada com diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia sidoides* e com os monoterpenos timol e carvacrol, e das pupas recuperadas, em condições de laboratório ($28\pm 2^\circ\text{C}$ e UR $60\pm 10\%$), com os respectivos percentuais de eficácia..... 29
3. Tabela 3 – Média (\pm desvio padrão) de mortalidade de pupas de *Musca domestica* e má formação de adultos tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia sidoides* e com os monoterpenos timol e carvacrol, em condições de laboratório ($28\pm 2^\circ\text{C}$ e UR $60\pm 10\%$), com os respectivos percentuais de eficácia..... 30
4. Tabela 4 – Concentrações letais (LC_{50}) do óleo essencial de *Lippia sidoides* e os monoterpenos timol e carvacrol sobre larvas (terceiro instar) e pupas de *Musca domestica* calculados para a mortalidade e eficácia do tratamento, sobre condições de laboratório ($28\pm 2^\circ\text{C}$ e UR $60\pm 10\%$)..... 31

Lista de Ilustrações

1. Figura 1 – Má formação do adulto de *Musca domestica* após tratamento pupal com timol e óleo essencial de *Lippia sidoides*: (A) controle e (B) tratado. Barra de escala horizontal = 0,5 cm. Fonte: autor..... 33

Resumo

Objetivou-se avaliar a atividade inseticida do óleo essencial de *Lippia sidoides* e dos monoterpenos timol e carvacrol sobre larvas e pupas de *Musca domestica* através de testes de contato. Para a avaliação da mortalidade larval (ML) foram feitas observações 48h após o tratamento e acompanhamento das larvas sobreviventes até o estágio adulto, e estes índices foram incluídos na eficácia de tratamento larval (ETL). Para a eficácia de tratamento pupal (ETP), foram calculados a mortalidade pupal (MP) após seis dias do tratamento e o percentual de mal desenvolvimento dos adultos (PMD). Foram testadas oito concentrações do óleo essencial e das substâncias puras, variando de 0,625 até 30,0 mg/ml. A análise dos constituintes do óleo essencial mostrou o timol como seu componente majoritário (69,91%). As doses letais (DL_{50} e DL_{90}) para larvas e pupas foram estimadas e o carvacrol apresentou os menores valores, seguido pelo timol e óleo de *L. sidoides*. Verificou-se ML de 100% a partir da concentração de 10,0 mg/ml para o carvacrol, 15,0 mg/ml para o óleo de *L. sidoides* e 30,0 mg/ml para o timol. Já para a ETL foi observada 100% de eficácia a partir da concentração de 5,0 mg/ml para o carvacrol e *L. sidoides* e 10,0 mg/ml para o timol. Com relação a MP, o óleo essencial de *L. sidoides* não apresentou atividade pupicida. Entretanto, para as concentrações de 20,0 e 30,0 mg/ml foi observado PMD, o que contribuiu para ETP de 44 e 46%, respectivamente. Já para o carvacrol a maior mortalidade foi alcançada na concentração de 20 mg/ml (58%) e para este terpeno não houve PMD. Para o timol observou-se maior MP (74%) para a concentração de 30,0 mg/ml com PMD de 60%, o que contribuiu para ETP de 84%. Os produtos testados apresentaram elevado potencial larvicida, o que os tornam promissores para o desenvolvimento de formulações ambientalmente seguras e não tóxicas para o controle de larvas de *M. domestica* e que, apesar de não terem sido totalmente efetivas no controle de pupas, seu uso para esse estágio pode ser indicado em um programa de Manejo Integrado de Pragas.

Palavras chave: contato tóxico; larvicida; mosca doméstica; pupicida; terpeno.

Abstract

This study aimed to evaluate the insecticidal activity of the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol and carvacrol monoterpenes against larvae and pupae of *Musca domestica* by contact tests. For the evaluation of larval mortality (LM) observations were made 48 hours after treatment and follow-up of surviving larvae to the adult stage, and these indices were included in the effectiveness of larval treatment (ELT). For the effectiveness of pupal treatment (EPT) were calculated pupal mortality (PM) after six days of treatment and the percentage of bad development of adults (PBD). Eight concentrations of the essential oil and pure substances, ranging from 0.625 to 30.0 mg/ml were tested. The analysis of the constituents of the essential oil thymol showed as its major component (69.91 %). The lethal dose (LD₅₀ and LD₉₀) for larvae and pupae were estimated and carvacrol showed the lowest values, followed by thymol and *L. sidoides* oil. It was found LM 100% at concentrations of 10.0 mg/ml for carvacrol, 15.0 mg/ml for *L. sidoides* oil and 30.0 mg/ml to thymol. As for the ELT 100% efficacy was observed starting at a concentration of 5.0 mg/ml for carvacrol and *L. sidoides* and 10.0 mg/ml to thymol. With respect to PM, the essential oil of *L. sidoides* showed no pupicida activity. However, for concentrations of 20.0 and 30.0 mg/ml was observed PBD, which contributed to EPT of 44 and 46%, respectively. As for carvacrol the highest mortality was achieved at a concentration of 20 mg/ml (58%) and to that terpene was not PBD. To thymol observed a higher PM (74%) for the concentration of 30.0 mg/ml with the PBD 60%, which contributed to 84% of EPT. The products tested showed high potential larvicide, which make them promising for the development of formulations environmentally safe and non-toxic for the control of larvae of *M. domestica* and that although they were not fully effective in the control pupae, their use for this stage can be indicated in a program of Integrated Pest Management.

Key words: contact toxicity; housefly; larvicidal; pupicidal; terpene.

1. Introdução

Musca domestica Linnaeus, 1758 é a única espécie do gênero encontrada no Brasil e América do Sul (CARVALHO, 2002). É um díptero cosmopolita, sinantrópico, encontrado em áreas urbanas e rurais, estando também associado a animais de importância zootécnica (MALIK *et al.*, 2007). É vetor mecânico de diversos organismos patogênicos como vírus, bactérias, protozoários e helmintos (KEIDING, 1986; MALIK *et al.*, 2007; PALACIOS *et al.*, 2009a). A mosca doméstica possui importância médica-veterinária e sua presença é geralmente associada a baixas condições de saneamento e higiene que acabam por favorecer a abundância e a transmissão de patógenos (KEIDING, 1986). Assim, *M. domestica* é considerada pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) como agente disseminador de doenças infecciosas como salmonelose, cólera e shigelose (PALACIOS *et al.*, 2009b).

Convencionalmente, o controle da mosca doméstica é feito com inseticidas sintéticos comercialmente disponíveis. Contudo, o uso indiscriminado e contínuo desses pesticidas tem trazido malefícios ao meio ambiente e animais, principalmente por selecionar populações resistentes (SCOTT *et al.*, 2000; MALIK *et al.*, 2007; PALACIOS *et al.*, 2009b). Nesse contexto, o uso de substâncias de origem vegetal, mais especificamente os óleos essenciais e seus terpenos naturais, tem sido considerado alternativa potencial e ambientalmente sustentável aos inseticidas convencionais (REGNAULT-ROGER, 1997; ISMAN, 2000; ISMAN, 2006). Isso porque apresentam propriedades inseticidas, repelentes e/ou de inibição alimentar (PAPACGRISTOS & STAMOPOULOS, 2002), associada à baixa toxicidade a mamíferos (ANSARI *et al.*, 2000), peixes e aves (STROH *et al.*, 1998; ISMAN, 2000). Além disso, podem ser econômicas, ecologicamente benéficas e biodegradáveis (REGNAULT-ROGER, 1997).

Lippia sidoides Cham. é uma planta da família Verbenaceae nativa da região Nordeste do Brasil, conhecida popularmente como “alecrim pimenta”. É amplamente usada na medicina popular (MATOS & OLIVEIRA, 1998), além de ter comprovada ação farmacológica (PASCUAL *et al.*, 2001). Dentre seus constituintes mais representativos, estão os monoterpenos carvacrol e timol (PASCUAL *et al.*, 2001), sendo este último seu componente majoritário e principal responsável pelas suas propriedades biológicas e pelo odor e sabor picante característicos das folhas dessa planta (MATOS & OLIVEIRA, 1998). O timol é um monoterpeno volátil que pode ser encontrado comercialmente na forma de cristais incolores com odor irritante, sendo ligeiramente solúvel em água (FARMACOPÉIA PORTUGUESA VIII, 2005). Possui baixo risco para o ecossistema devido à rápida dissipação e o baixo nível de resíduos deixados no ambiente (HU & COATS, 2008). Este terpeno é reconhecido como

seguro, sendo listado pela FDA para o consumo humano e como aditivo alimentar (USEPA, 1993). O carvacrol, que é um terpeno isômero do timol, é geralmente considerado como seguro para o consumo, sendo incluído pelo Conselho da Europa na lista de aromas químicos que podem ser utilizados como aditivo alimentar (DE VICENZI *et al.*, 2004). Alguns estudos já demonstraram a atividade inseticida do óleo essencial de *L. sidoides*, timol e carvacrol (SANTIAGO *et al.*, 2006; PAVELA, 2008a; PAVELA, 2011).

Existem poucos estudos relacionados à utilização de óleos essenciais no controle de *M. domestica* (MALIK *et al.*, 2007) e a maioria desses visam o controle dos adultos por meio da aplicação tópica ou fumigação (PAVELA, 2008a; PAVELA, 2008b; PALACIOS *et al.*, 2009a; PALACIOS *et al.*, 2009b; TARELLI *et al.*, 2009; PAVELA, 2011; ROSSI *et al.*, 2012; ROSSI & PALACIOS, 2013;). Entretanto, os estágios de larva e pupa permanecem negligenciados, embora os adultos representem apenas 15% do total da população (KUMAR *et al.*, 2012a). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade inseticida do óleo essencial de *L. sidoides* e dos monoterpenos timol e carvacrol sobre larvas e pupas de *M. domestica* através de testes de contato.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Muscidae

A família Muscidae (Diptera) está presente em todas as regiões biogeográficas e está representada por mais de 4000 espécies (PONT, 1986; PONT, 1989), sendo que 800 ocorrem na Região Neotropical (CARVALHO *et al.*, 1993). Essa família contém alguns gêneros sinantrópicos, como *Musca*, *Stomoxys*, *Muscina* e *Fannia* (KEIDING, 1986) e algumas espécies, como *Musca domestica*, possuem importância médica e veterinária, atuando como vetores de organismos patogênicos (PONT, 1986). A taxonomia dessa família é bem conhecida a nível mundial (THOMPSON, 1990), entretanto, na Região Neotropical, ela ainda é incipiente (CARVALHO, 1989) assim como o seu padrão de distribuição na América do Sul (CARVALHO, 2002). Hennig (1965) propôs uma visão sobre a dispersão dos muscídeos para a América do Sul e considerou que a invasão ocorreu pelo Hemisfério Norte durante o Cretáceo Superior ou no início do Terciário.

2.2. *Musca domestica*

Musca domestica Linnaeus, 1758 é uma espécie representante da família Muscidae e a única do gênero no Brasil e América do Sul (CARVALHO, 2002). Com distribuição cosmopolita, estende-se desde regiões sub-polares até os trópicos, onde ocorre em grande número. É sinantrópica e comparada com outras espécies de moscas que habitam ou ocasionalmente visitam residências, a mosca doméstica é sem dúvida a mais abundante (HEWITT, 1916; KEIDING, 1986). Os locais de distribuição desse díptero estão diretamente relacionados a presença de criadouros e alimento (HEWITT, 1916).

A mosca doméstica apresenta características morfológicas que a distingue das demais espécies da família Muscidae, sendo elas: presença de aparelho bucal sugador-lambedor adaptado para a absorção de líquidos ou alimentos liquefeitos, região dorsal do tórax acinzentada e com quatro listras longitudinais negras, abdômen amarelo e com uma linha dorsal marrom escuro (HEWITT, 1916), asa com a veia M₁ fortemente curvada para o ápice e caliptra inferior larga (CARVALHO, 2002).

A distinção sexual é feita através de uma linha frontal presente na cabeça. Nas fêmeas, essa linha separa os olhos (olhos dicópticos) e alcança o vertex que contém os três ocelos e fica no topo da cabeça. Nos machos, os olhos são estreitamente separados por essa linha fazendo

com que eles se juntem na parte dorsal da cabeça (olhos holópticos). Os adultos medem de 6 a 7 mm de comprimento, sendo as fêmeas ligeiramente maiores que os machos (HEWITT, 1916).

O ciclo biológico da *M. domestica*, sob condições adequadas de temperatura e umidade ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $80\pm 10\%$ de umidade relativa), é rápido. Cada fêmea faz de 5 a 6 posturas durante sua vida, cada uma contendo em média 120 ovos que são depositados em grupos na matéria orgânica em processo inicial de fermentação. A eclosão larval ocorre de 8 a 24 horas após a deposição dos ovos e o desenvolvimento da larva dura cerca de 4 a 5 dias, tempo necessário para que ocorram as duas ecdises que separam os três instares larvais. Próxima a pupação, a larva para de se alimentar e abandona o meio à procura de um local refrigerado e seco para se abrigar durante o processo. O desenvolvimento pupal dura de 4 a 5 dias e, a partir daí, já existe um adulto formado dentro do pupário que é rompido pela mosca por meio do saco frontal que infla funcionando como uma bomba. O adulto recém emergido é cinza pálido, frágil e sem asa e, por essa razão, procura abrigo para que suas asas estiquem, seu exoesqueleto enrijeça e se torne escuro (HEWITT, 1916; KEIDING, 1986).

A mosca doméstica é vetor mecânico de diversos organismos patogênicos como bactérias, protozoários, helmintos e vírus. Esses patógenos estão associados a doenças como shigelose, salmonelose, cólera, disenteria, diarreia infantil e febre tifoide. Por essa razão, possui importância médica-veterinária. A presença de grandes quantidades desse díptero, tanto em áreas urbanas quanto rurais, causa estresse a animais e trabalhadores e diminui a produção (KEIDING, 1986), principalmente em instalações avícolas, onde é considerada a principal praga (AXTELL, 1985). Além disso, sua presença é geralmente associada a baixas condições de saneamento e higiene que acabam por favorecer a abundância e a transmissão de patógenos (KEIDING, 1986). Os hábitos da mosca doméstica contribuem para essa associação, uma vez que os patógenos são adquiridos através do constante e frequente contato com fontes de contaminação. Em seguida, são transferidos aos utensílios usados por humanos e alimentos por meio do seu aparelho bucal, partes externas do corpo, fezes e regurgitação (HEWITT, 1916; KEIDING, 1986).

A ideia que se tem em associar a presença da mosca doméstica a condições prejudiciais à saúde ou não higiênicas é antiga. Mercurialis em 1577 acreditava que as moscas carregavam uma praga viral presente em pessoas que sofriam de uma doença. Essas moscas se alimentavam de secreções internas desses doentes e depois depositavam seus excrementos em itens alimentares que eram ingeridos por pessoas saudáveis que acabavam se infectando (RILEY, 1910). No início do século XIX já se acreditava que os insetos, de maneira geral e especialmente

a mosca doméstica, atuavam como agentes disseminadores de doenças (CRAWFORD, 1808). Esse díptero foi responsabilizado pela propagação de gangrena hospitalar e infecções de feridas durante a Guerra Civil Americana (LEIDY, 1872).

2.3. Controle

2.3.1. Controle com inseticidas sintéticos

A principal forma de controle da mosca doméstica é feita através da utilização de inseticidas sintéticos que podem ser aplicados de diferentes formas: tópico, fumigação e iscas (MALIK *et al.*, 2007). Entretanto, diversos problemas decorrentes do uso contínuo e indiscriminado desses pesticidas tem sido relatados: seleção de linhagens resistentes que pode levar a aumento na taxa de aplicação, aumento na frequência do uso e perda de eficácia (SCOTT *et al.*, 2000); persistência no ambiente e na cadeia alimentar; aumento da mortalidade de organismos não alvo; e alteração da fertilidade do solo (MALIK *et al.*, 2007).

Após a Segunda Guerra Mundial, os derivados do petróleo e os inseticidas químicos (carbamatos, organoclorados e organofosforados) foram fortemente desenvolvidos e utilizados. Nessa mesma época, começaram os primeiros problemas ecológicos. Na década de 1970, surgiram novos piretróides e juntamente com eles problemas relacionados a seleção de linhagens resistentes de insetos (REGNAULT-ROGER, 1997), sendo que *M. domestica* já apresentava resistência a praticamente todos os inseticidas usados contra ela (KEIDING, 1975; GEORGHIOU & MELLON, 1985), o que tornou essa questão um problema global (KEIDING, 1975; SAWICKI *et al.*, 1981; MACDONALD *et al.*, 1983; MEYER *et al.*, 1987). Já em 1985, a situação mundial da resistência desse díptero aos compostos organoclorados e organofosforados já era preocupante e aumentava em enormes quantidades (KEIDING, 1986). No estado de Nova York, nos anos 2000, foi relatado resistência a sete inseticidas comumente utilizados e mais dois novos inseticidas em instalações avícolas; em uma outra área, planos de controle com um inseticida recém registrado, o cyfluthrin, já não eram eficazes para a mosca doméstica. Isso tem feito com que a principal medida adotada antes de um plano de controle desse díptero seja a implementação do manejo da resistência e, para que tal seja estabelecido, é necessário o conhecimento da distribuição e a frequência dos indivíduos selecionados pela resistência (SCOTT *et al.*, 2000).

O suprimento de novos inseticidas para substituir os compostos atuais tem sido dificultado devido a diferentes fatores: aos altos custos para seu desenvolvimento; dificuldades

em se descobrir novos compostos (GEORGHIU, 1986; HAMMOCK & SODERLUND, 1986); e perda de materiais disponíveis devido a implementação de leis regulatórias com a finalidade de restringir, substituir ou proibir os produtos mais prejudiciais por aqueles que representem menores riscos a saúde humana e ambiental (SCOTT *et al.*, 2000; ISMAN, 2006). No início da década de 1990, essas leis refletiram na criação e definição dos pesticidas de “risco reduzido” através do estatuto jurídico da *United States Environmental Protection Agency* e da *Food Quality Protection Act of 1996* que reavaliaram os níveis seguros de pesticidas nos alimentos. Assim, grande parte dos pesticidas convencionais usados na agricultura e que foram desenvolvidos antes de 1980 foram removidos. Essas mudanças na regulamentação ambiental criaram um ambiente propício para o descobrimento e desenvolvimento de produtos alternativos para o controle de pragas e que possuam baixo impacto ambiental e na saúde humana (ISMAN, 2006), e uma das alternativas é o uso dos produtos de origem vegetal, mais especificamente os óleos essenciais.

2.3.2. Controle com produtos de origem vegetal

As plantas aromáticas, assim chamadas por possuírem compostos voláteis que lhes conferem odor e sabor característicos, estão intimamente associadas as origens da civilização ocidental. São mencionadas desde a Antiguidade para uso como especiarias, ervas aromáticas ou plantas medicinais: reforçavam o gosto dos alimentos, ajudavam a preservá-los e serviam para embalsamar mortos. Posteriormente, foram usadas em aplicações industriais, particularmente em produtos de perfumaria, cosméticos, detergentes, farmacologia, química fina e compostos aromáticos para a indústria alimentar. E desde a década de 1990 um novo campo além dessas atividades tradicionais tem se desenvolvido: manejo de insetos pragas. E os compostos voláteis, comumente chamados de óleos essenciais e que constituem fração das plantas aromáticas, tem se mostrado promissor para esse uso. Porém, essa estratégia alternativa de controle não é recente. Relatos indicam que os inseticidas vegetais eram usados na agricultura na China Antiga, Grécia, Egito e Índia há pelo menos dois milênios atrás (WARE, 1883; THACKER, 2002). No século XIX, diversas moléculas foram extraídas a partir de plantas: a nicotina a partir do tabaco, a rotenona foi extraída de plantas da família Papilionidae e o piretro foi extraído de plantas do gênero *Chrysanthemum* (Compositae). Na Europa e América do Norte o uso de pesticidas vegetais remonta de 150 anos atrás, o que mostra que esse uso era feito mesmo antes do emprego dos pesticidas convencionais (piretróides, carbamatos, organofosforados e organoclorados) em meados dos anos 1930 a 1950 (ISMAN, 2006). Com a Segunda Guerra Mundial, a utilização dessa primeira geração de produtos de

origem vegetal foi reduzida (REGNAULT-ROGER, 1997). A partir daí começaram as investigações com o objetivo de encontrar moléculas inseticidas extraídas de plantas (ARNASON *et al.*, 1989).

Os óleos essenciais são constituídos de moléculas capazes de influenciar o comportamento e a biologia de uma ampla variedade de insetos, sendo que o efeito de determinada substância vai depender de seu padrão fitoquímico e da sensibilidade da espécie de inseto envolvida. Essas moléculas geralmente tem ação em doses baixas, podem ser econômicas e ecologicamente benéficas, são biodegradáveis, mais específicas, não afetam organismos não alvo e apresentam baixa toxicidade a peixes, aves e mamíferos (WILLIKINS & METCALFE, 1993; REGNAULT-ROGER, 1997; STROH *et al.*, 1998; ISMAN, 2000). Podem ser utilizadas como larvicidas, pupicidas e adulticidas e exercerem ações como repelentes, fagoinibidoras, inibidoras de ovipostura, crescimento e digestão tanto para a mosca doméstica como para outras pragas (TSAO *et al.*, 1995; REGNAULT-ROGER, 1997).

Em 1997, os óleos essenciais representavam um mercado estimado em US\$ 700 milhões e uma produção mundial total de 45 000 toneladas. Cerca de 90% dessa produção estava focada em 15 produtos, particularmente menta (*Mentha piperata*, *M. arvensis* e *M. Spicata*) e citros (laranja, limão, lima) (REGNAULT-ROGER, 1997). Já no ano de 2000, a representação dos inseticidas de origem vegetal no mercado global de inseticidas era de aproximadamente 1%. Entretanto, este panorama tem sido modificado devido a leis federais, como a *Food Quality Protection Act of 1996*, que tem como objetivo restringir o uso e a dependência dos inseticidas convencionais. Essa lei criou uma oportunidade de mercado para os pesticidas de “risco reduzido” que são favorecidos pela *United States Environmental Protection Agency* que isenta de registro e de requerimentos de dados de toxicidade os que possuam em sua composição substâncias utilizadas em processamento de alimentos e bebidas (QUARLES, 1996; ISMAN, 2000). No Brasil cada estado tem autoridade reguladora autônoma e os produtos de origem vegetal registrados para uso na maioria dos estados são: piretro, rotenona, nim, alho e nicotina. Contudo, vários óleos essenciais e extratos são produzidos artesanalmente em pequena escala e usados fora de qualquer sistema de regulação a nível regional, como é o caso da nicotina e dos extratos de plantas nativas (ISMAN, 2006).

Os primeiros estudos relacionados ao controle de *M. domestica* com a utilização de produtos de origem vegetal foram publicados no final da década de 1980 e início de 1990 (AHMED & EAPEN, 1986; SINGH & AGARWAL, 1988; COATS *et al.*, 1991; RICE & COATS, 1994; LEE *et al.*, 1997). Após esses primeiros trabalhos, houve um período de

escassez que só foi rompido a partir de 2007 (PAVELA, 2007; PAVELA, 2008a; PAVELA, 2008b; PALACIOS *et al.*, 2009a; PALACIOS *et al.*, 2009b; TARELLI *et al.*, 2009). Daí em diante, vários extratos de plantas, óleos essenciais e substâncias isoladas tem sido identificados como importantes fontes naturais de inseticidas (KUMAR *et al.*, 2011a; KUMAR *et al.*, 2012a; KUMAR *et al.*, 2012b; KUMAR *et al.*, 2012c; KUMAR *et al.*, 2013a; KUMAR *et al.*, 2013b; KUMAR *et al.*, 2013c; KUMAR *et al.*, 2014; MOREY & KHANDAGLE, 2012; PAVELA, 2011; PAVELA, 2013; ROSSI *et al.*, 2012; ROSSI & PALACIOS, 2013).

2.3.3. Outras formas de controle

Algumas medidas podem e devem ser adotadas de forma a regular a população de mosca doméstica, minimizar o uso dos pesticidas sintéticos e os danos que eles causam. Uma alternativa altamente viável é Manejo Integrado de Pragas, que consiste em uma forma combinada de diferentes alternativas de controle como o biológico, físico, cultural e químico (produtos de origem vegetal) (AXTELL, 1986). Esse tipo de manejo reduz a densidade populacional da praga, atinge diferentes estágios do ciclo de vida da população da mosca, resolve o problema da seleção de linhagens resistentes, e reduz os impactos causados pelo uso contínuo e indiscriminado dos inseticidas sintéticos (MALIK *et al.*, 2007).

3. 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)

3.1. Resumo

Objetivou-se avaliar a atividade inseticida do óleo essencial de *Lippia sidoides* e dos monoterpenos timol e carvacrol sobre larvas e pupas de *Musca domestica* através de testes de contato. Para a avaliação da mortalidade larval (ML) foram feitas observações 48h após o tratamento e acompanhamento das larvas sobreviventes até o estágio adulto, e estes índices foram incluídos na eficácia de tratamento larval (ETL). Para a eficácia de tratamento pupal (ETP), foram calculados a mortalidade pupal (MP) após seis dias do tratamento e o percentual de mal desenvolvimento dos adultos (PMD). Foram testadas oito concentrações do óleo essencial e das substâncias puras, variando de 0,625 até 30,0 mg/ml. A análise dos constituintes do óleo essencial mostrou o timol como seu componente majoritário (69,91%). As doses letais (DL₅₀ e DL₉₀) para larvas e pupas foram estimadas e o carvacrol apresentou os menores valores, seguido pelo timol e óleo de *L. sidoides*. Verificou-se ML de 100% a partir da concentração de 10,0 mg/ml para o carvacrol, 15,0 mg/ml para o óleo de *L. sidoides* e 30,0 mg/ml para o timol. Já para a ETL foi observada 100% de eficácia a partir da concentração de 5,0 mg/ml para o carvacrol e *L. sidoides* e 10,0 mg/ml para o timol. Com relação a MP, o óleo essencial de *L. sidoides* não apresentou atividade pupicida. Entretanto, para as concentrações de 20,0 e 30,0 mg/ml foi observado PMD, o que contribuiu para ETP de 44 e 46%, respectivamente. Já para o carvacrol a maior mortalidade foi alcançada na concentração de 20 mg/ml (58%) e para este terpeno não houve PMD. Para o timol observou-se maior MP (74%) para a concentração de 30,0 mg/ml com PMD de 60%, o que contribuiu para ETP de 84%. Os produtos testados apresentaram elevado potencial larvicida, o que os tornam promissores para o desenvolvimento de formulações ambientalmente seguras e não tóxicas para o controle de larvas de *M. domestica* e que, apesar de não terem sido totalmente efetivas no controle de pupas, seu uso para esse estágio pode ser indicado em um programa de Manejo Integrado de Pragas.

Palavras-chave: contato tóxico; larvicida; mosca doméstica; pupicida; terpeno.

3.2. Introdução

Musca domestica Linnaeus, 1758 é um díptero sinantrópico encontrado em áreas urbanas e rurais, estando também associado a animais de importância zootécnica (MALIK *et al.*, 2007). É vetor mecânico de mais de 100 agentes relacionados à doenças intestinais associadas ao homem e a outros animais, sendo responsável pela transmissão de patógenos como vírus, bactérias, protozoários e helmintos (KEIDING, 1986; MALIK *et al.*, 2007; PALACIOS *et al.*, 2009a). Esses organismos são adquiridos pelas moscas em lixeiras, esgotos e outras fontes de contaminação e são transmitidos ao alimento humano e animal através das partes externas do corpo, aparelho bucal, regurgitação e fezes (KEIDING, 1986; FOTEDAR, 2001; ZUREK *et al.*, 2001). Assim, *M. domestica* é considerada pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) como agente disseminador de doenças infecciosas como salmonelose, cólera e shigelose (PALACIOS *et al.*, 2009b).

Convencionalmente, o controle da mosca doméstica é feito com inseticidas comercialmente disponíveis. Todavia, o uso indiscriminado e repetitivo desses compostos compromete sua eficácia por selecionar linhagens resistentes desses insetos, além de afetar negativamente a fertilidade do solo, produzir riscos relacionados à saúde humana e deixar resíduos no ambiente e em alimentos (SCOTT *et al.*, 2000; MALIK *et al.*, 2007; PALACIOS *et al.*, 2009a). Os óleos essenciais e os terpenos naturais podem vir a ser agentes efetivos no controle de pragas, devido às suas propriedades inseticidas, repelentes e/ou de inibição alimentar (PAPACHRISTOS & STAMOPOULOS, 2002), associada à baixa toxicidade a peixes, aves e mamíferos (ANSARI *et al.*, 2000; ISMAN, 2000; REGNAULT-ROGER, 1997; STROH *et al.*, 1998; WILLIKINS & METCALFE, 1993). Além disso, são mais específicos, pouco afetam organismos não alvo e podem ser econômica e ecologicamente benéficos (MALIK *et al.*, 2007). Nesse contexto, as substâncias de origem vegetal representam uma alternativa potencial e ambientalmente sustentável aos inseticidas convencionais (REGNAULT-ROGER, 1997; ISMAN, 2000; ISMAN & MACHIAL, 2006).

Lippia sidoides Cham. é uma planta da família Verbenaceae nativa da região Nordeste do Brasil, conhecida popularmente como “alecrim pimenta”. É amplamente usada na medicina popular devido às suas propriedades antimicrobianas e antissépticas (MATOS & OLIVEIRA, 1998), além de ter comprovada ação farmacológica como sedativo, antifúngico, anti-hipertensivo, antiespasmódico e anestésico local (PASCUAL *et al.*, 2001). Recentemente, sua atividade antimicrobiana, anti-helmíntica, inseticida e carrapaticida foi evidenciada (SANTIAGO *et al.*, 2006; BOTELHO *et al.*, 2007; CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007;

GOMES *et al.*, 2014). Dentre seus constituintes mais representativos, estão os monoterpenos carvacrol e timol (PASCUAL *et al.*, 2001), sendo este último seu componente majoritário e principal responsável pelas suas propriedades biológicas e pelo odor e sabor picante característicos das folhas dessa planta (MATOS & OLIVEIRA, 1998).

O timol é um monoterpeno volátil presente em óleos essenciais de plantas das famílias Apiaceae, Lamiaceae e Verbenaceae. Pode ser encontrado comercialmente na forma de cristais incolores com odor irritante, sendo ligeiramente solúvel em água (FARMACOPÉIA PORTUGUESA VIII, 2005). Possui baixo risco para o ecossistema devido à rápida dissipação e o baixo nível de resíduos deixados no ambiente (HU & COATS, 2008). Este terpeno é reconhecido como seguro, sendo listado pela FDA para o consumo humano e como aditivo alimentar (USEPA, 1993). A eficiência desse monoterpeno como agente antimicrobiano, carrapaticida e inseticida é bem conhecida (BOTELHO *et al.*, 2007; NOSTRO *et al.*, 2007; PAVELA, 2008; DAEMON *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2010; PAVELA, 2011).

O carvacrol é um terpeno presente em óleos essenciais de plantas aromáticas das famílias Lamiaceae e Verbenaceae. É geralmente considerado como seguro para o consumo, sendo incluído pelo Conselho da Europa na lista de aromas químicos que podem ser utilizados como aditivo alimentar (DE VICENZI *et al.*, 2004). Diversos estudos demonstraram as propriedades anti-câncer, bactericida, carrapaticida e inseticida desse monoterpeno (BOTELHO *et al.*, 2007; NOSTRO *et al.*, 2007; PAVELA, 2008a; PAVELA, 2011; YIN *et al.*, 2012; SENRA *et al.*, 2013a; SENRA *et al.*, 2013b).

Existem poucos estudos relacionados à utilização de óleos essenciais no controle de *M. domestica* (MALIK *et al.*, 2007) e a maioria desses visam o controle dos adultos por meio da aplicação tópica ou fumigação (PALACIOS *et al.*, 2009a; PALACIOS *et al.*, 2009b; PAVELA, 2008a; PAVELA, 2008b; PAVELA, 2011; ROSSI *et al.*, 2012; ROSSI & PALACIOS, 2013; TARELLI *et al.*, 2009). Entretanto, os estágios de larva e pupa permanecem negligenciados, embora os adultos representem apenas 15% do total da população (KUMAR *et al.*, 2012a). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade inseticida do óleo essencial de *L. sidoides* e dos monoterpenos timol e carvacrol sobre larvas e pupas de *M. domestica* através do contato.

3.3. Material e métodos

3.3.1. 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.

3.3.2. Óleo essencial e monoterpenos

O óleo essencial de *L. sidoides* foi adquirido da PRONAT (Produtos Naturais Ltda.). Esse óleo apresenta coloração amarela, densidade (d) = 0,94 g/ml e índice de refração (n) = 1,505. Os monoterpenos carvacrol e timol foram adquiridos da Sigma-Aldrich e Henrifarma Químicos e Farmacêuticos Ltda., respectivamente, e ambos com 99,9% de pureza.

3.3.3. Análise dos constituintes do óleo essencial de *Lippia sidoides*

A composição química do óleo essencial de *L. sidoides* utilizado no presente trabalho foi caracterizada por Gomes *et al.* (2014) através de análise em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM – Shimadzu QP-2010 Plus) (qualitativo) e cromatógrafo a gás acoplado a HP 5890 Series II detector de ionização por chama (DIC) (quantitativo).

Para essa amostra de óleo foram identificadas 22 substâncias representando um total de 98,47% de sua composição química, sendo o timol seu constituinte majoritário (69,91%). Entre os compostos identificados, 72,21% pertencem ao grupo dos monoterpenos oxigenados, 21,01% aos hidrocarbonetos monoterpênicos, 4,70% aos hidrocarbonetos sesquiterpênicos e 0,55% aos sesquiterpenos oxigenados. A Tabela 1 apresenta os constituintes de cada grupo citado com seus respectivos percentuais e índices de retenção.

3.3.4. Preparação das formulações

O óleo essencial de *L. sidoides* foi diluído em Tween 80 P.S. (Polissorbato 80) a 2% (20,0 mg/ml), enquanto os monoterpenos timol e carvacrol foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 1 (10,0 mg/ml) e 3% (30,0 mg/ml), respectivamente. No caso do timol, foi utilizada placa aquecedora a 60°C para a homogeneização da solução. Foram realizados testes preliminares para determinação das concentrações a serem utilizadas nos experimentos, sendo selecionadas as concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 30,0 mg/ml.

Tabela 1 – Composição química, índice de retenção (IR_c) e percentual de compostos identificados do óleo essencial de *Lippia sidoides**.

Compostos	IR _c	%
<u>Hidrocarbonetos monoterpênicos</u>		21,01
α-Tujeno	930	0,16
α-Pineno	938	0,74
β-Pineno	986	0,12
Mirceno	994	3,57
δ-(3)-Careno	1012	0,17
α-Terpineno	1022	0,78
<i>o</i> -Cimeno	1035	14,84
<i>E</i> -β-Ocimeno	1052	0,04
γ-Terpineno	1065	0,59
<u>Monoterpenos oxigenados</u>		72,21
6,7-Epoximirceno	1095	0,20
Linalol	1102	0,23
Ipsdienol	1164	0,12
4-Terpineol	1188	0,16
<i>p</i> -Cimen-8-ol	1198	0,26
α-Terpineol	1202	0,49
Timol metil éter	1236	0,84
Timol	1315	69,91
<u>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</u>		4,70
α-Ylangeno	1385	0,11
<i>E</i> -Cariofileno	1433	4,04
α-Humuleno	1467	0,21
Viridifloreno	1487	0,34
<u>Sesquiterpenos oxigenados</u>		0,55
Óxido de cariofileno	1597	0,55
Total		98,47

*Essa amostra do óleo foi previamente caracterizada em estudo realizado por Gomes *et al.*, (2014).

3.3.5. Procedência e manutenção da colônia de *Musca domestica*

Os adultos de *M. domestica* foram coletados em depósito de lixo em áreas próximas ao campus da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, com o puçá. Em seguida

foram transferidos para gaiolas entomológicas (35 x 35 x 35 cm) cobertas com tela e mantidas em sala com temperatura ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa (UR) ($60\pm 10\%$) e sem controle de

fotoperíodo. Foram fornecidas às moscas adultas água e alimento constituído de mistura de leite em pó, açúcar cristal e água na proporção de 1:1:2 (v/v); tanto a água quanto o alimento foram acondicionados em placas de Petri (9 x 1,5 cm) individuais preenchidas com algodão. Para a oviposição, foram colocados nas gaiolas potes cilíndricos de polipropileno (8 x 6 cm) contendo mistura previamente fermentada por três dias em câmara climatizada ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $60\pm 10\%$ de umidade relativa) composta de farelo de trigo, leite em pó e água (1:1:1 v/v). O alimento e a água das moscas adultas e o meio fermentado utilizado como alimento pelas larvas foram fornecidos *ad libitum* e trocados diariamente para evitar contaminação. Após a postura, os potes foram transferidos para bandejas plásticas (40 x 7 x 27 cm) forradas com serragem para que as larvas (L3) abandonassem o meio de criação para iniciar o processo de pupação. Essas bandejas foram cobertas com tecido tipo tule fixado às bordas com goma elástica, e em seguida acondicionadas em câmara climatizada ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $60\pm 10\%$ UR). Posteriormente, a serragem foi peneirada e as L3 pré-pupa e pupas foram separadas para a utilização nos experimentos de contato.

3.3.6. Experimento com larvas

Para cada tratamento, foram colocados papel filtro no fundo de placas de Petri (6 x 1,5 cm). Em seguida, os papéis filtro foram umedecidos com 500 μL da substância a ser testada. Após a aplicação, as placas foram mantidas abertas por 10 minutos para a evaporação do solvente. Em seguida, foram adicionadas 10 L3 pré-pupa em cada placa e estas foram fechadas. O grupo controle constituiu-se do solvente utilizado para diluir cada óleo/substância isolada. Para cada tratamento foram feitas cinco repetições. Os grupos experimentais foram mantidos em câmaras climatizadas ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $60\pm 10\%$ UR), com uma câmara para cada substância testada e outra para o grupo controle.

A avaliação da mortalidade das larvas tratadas foi realizada após 48h. As larvas que sobreviveram e, por conseguinte, empuparam, foram mantidas nas placas de Petri até a emergência dos adultos. Após seis dias da formação da pupa, foi realizada nova avaliação para calcular a taxa de mortalidade das pupas recuperadas de acordo com cada substância e concentração testadas. Considerou-se viável toda pupa que originou um indivíduo adulto. A

partir dessas duas avaliações foi calculada a eficiência do tratamento larval de acordo com cada concentração, utilizando-se a fórmula:

Eficácia do tratamento larval (%ETL) = $ML + [(1 - ML) \times MPR]$, sendo ML a mortalidade larval e MPR a mortalidade das pupas recuperadas.

3.3.7. Experimento com pupas

Em cada placa de Petri (9 x 1,5 cm) contendo papel filtro foram colocadas 10 pupas com idades de 1 a 2 dias de formação e aplicados sobre cada uma, com micropipeta, 50 μ L da solução a ser testada. Após 10 minutos, as placas foram fechadas e os grupos colocados em câmaras climatizadas assim como para o teste com larvas. Foram feitas cinco repetições para cada tratamento. A emergência dos adultos nos grupos experimentais foi avaliada após seis dias.

Considerou-se viável toda pupa que originou um indivíduo adulto que emergiu completamente do pupário. Entretanto, alguns desses adultos que emergiram completamente do pupário apresentaram sinais de mal desenvolvimento. A partir dessa segunda avaliação foi calculado o percentual de mal desenvolvimento dos adultos. Sendo assim, foi calculada a eficiência do tratamento pupal de acordo com cada concentração, através da seguinte fórmula:

Eficácia do tratamento pupal (%ETP) = $MP + [(1 - MP) \times PMD]$, sendo MP a mortalidade pupal e PMD o percentual de mal desenvolvimento dos adultos.

3.3.8. Determinação das doses letais

Tanto para larvas como para pupas foram determinadas as doses letais (DL_{50}), sendo feitas duas análises: uma em relação aos dados de mortalidade e outra em relação a eficácia do tratamento.

3.3.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Bioestat versão 5.0 (AYRES *et al.*, 2007). Os valores percentuais foram transformados em $\sqrt{\text{arcoseno } x}$ e analisados através da análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey ($p < 0,05$). No caso de distribuição não

paramétrica, os valores foram comparados pelos testes Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Para o cálculo da dose letal 50% (DL_{50}) foi utilizado análise do probito através do programa POLOPC (LeOra Software, 1987, Berkeley, CA, USA) (FINNEY, 1971).

3.4. Resultados

3.4.1. Experimento com larvas

Os resultados mostram que a partir da concentração de 5 mg/ml a mortalidade larval para as três substâncias testadas diferiu dos seus respectivos grupos controle ($p < 0,05$). O mesmo foi observado para a eficácia do tratamento, com exceção do carvacrol, que apresentou eficácia a partir da concentração de 1,25 mg/ml ($p < 0,05$) (Tabela 2). Foi observada mortalidade de 100% das larvas nas concentrações acima de 10,0 mg/ml para o carvacrol, 15,0 mg/ml para o óleo essencial de *L. sidoides* e na concentração de 30,0 mg/ml para o timol ($p < 0,05$). Com relação à eficácia do tratamento, as concentrações a partir de 5,0 mg/ml para o carvacrol e óleo de *L. sidoides* e 10,0 mg/ml para o timol apresentaram 100% de eficácia ($p < 0,05$).

3.4.2. Experimento com pupas

Os resultados da ação pupicida do óleo essencial de *L. sidoides* e dos monoterpenos timol e carvacrol através do contato estão apresentados na Tabela 3. O timol apresentou maior atividade pupicida (74,0%) seguida de uma eficácia do tratamento de 84,0% para a concentração de 30,0 mg/ml ($p < 0,05$). Já para o carvacrol a maior mortalidade das pupas (58,0%) foi observada na concentração de 20,0 mg/ml, seguida de eficácia do tratamento de 62,0% ($p < 0,05$). Para o óleo de *L. sidoides* não foi observada ação pupicida ($p > 0,05$). Entretanto, para as concentrações de 20,0 e 30,0 mg/ml foi observada ocorrência de mal desenvolvimento de adultos, o que foi responsável por eficácia de tratamento de 44,0 e 46,0%, respectivamente ($p < 0,05$). Esse impacto também foi observado para o timol na concentração de 30,0 mg/ml ($p < 0,05$).

3.4.3. Determinação das doses letais

Os valores referentes às doses letais das substâncias testadas sobre larvas e pupas estão apresentados na Tabelas 4. Deve ser ressaltado que as menores doses letais nos experimentos com larvas e pupas foram observadas para o carvacrol. Para essa substância, o valor da DL_{50} para a mortalidade de larvas foi 2,05 mg/ml.

Tabela 2 – Média (\pm desvio padrão) de mortalidade de larva (terceiro instar) de *Musca domestica* tratada com diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia sidoides* e com os monoterpenos timol e carvacrol, e das pupas recuperadas, em condições de laboratório ($28\pm 2^\circ\text{C}$ e UR $60\pm 10\%$), com os respectivos percentuais de eficácia.

Tratamentos	Concentrações (mg/ml)	Mortalidade larval (ML%)	Mortalidade das pupas recuperadas (MPR%)	Eficácia do tratamento larval (ETL%)
Óleo de <i>L. sidoides</i>	Controle Tween 80			
	(20,0)	0,0 ^a \pm 0,0	8,0 ^a \pm 8,4	8,0 ^a \pm 9,0
	0,625	0,0 ^a \pm 0,0	20,7 ^{ab} \pm 14,8	20,7 ^a \pm 13,8
	1,25	4,0 ^{ab} \pm 5,5	26,9 ^{ab} \pm 15,2	30,0 ^a \pm 12,9
	2,5	44,0 ^{ab} \pm 15,2	49,8 ^{bc} \pm 19,2	72,0 ^{ab} \pm 11,1
	5,0	80,0 ^{bc} \pm 7,1	100 ^c \pm 0,0	100 ^b \pm 0,0
	10,0	98,0 ^c \pm 4,5	100*	100 ^b \pm 0,0
	15,0	100 ^c \pm 0,0	-	100 ^b \pm 0,0
	20,0	100 ^c \pm 0,0	-	100 ^b \pm 0,0
	30,0	100 ^c \pm 0,0	-	100 ^b \pm 0,0
Timol	Controle DMSO			
	(10,0)	0,0 ^a \pm 0,0	12,0 ^a \pm 21,7	12,0 ^a \pm 23,7
	0,625	2,5 ^a \pm 5,0	7,8 ^a \pm 9,7	10,0 ^a \pm 11,0
	1,25	52,2 ^{ab} \pm 10,2	40,0 ^{ab} \pm 23,5	72,8 ^{ab} \pm 5,2
	2,5	56,0 ^{abc} \pm 23,0	71,8 ^{bc} \pm 19,0	88,0 ^{abc} \pm 12,5
	5,0	74,0 ^{bcd} \pm 18,2	81,7 ^{bc} \pm 21,4	94,0 ^{bc} \pm 7,9
	10,0	90,0 ^{bcd} \pm 12,2	100 ^c \pm 0,0	100 ^c \pm 0,0
	15,0	98,0 ^d \pm 4,5	100*	100 ^c \pm 0,0
	20,0	94,0 ^{cd} \pm 5,5	66,7 ^{abc} \pm 57,7	98,0 ^c \pm 4,9
	30,0	100 ^d \pm 0,0	-	100 ^c \pm 0,0
Carvacrol	Controle DMSO			
	(30,0)	4,0 ^a \pm 5,5	4,2 ^a \pm 5,8	8,0 ^a \pm 8,4
	0,625	8,0 ^a \pm 4,5	71,9 ^b \pm 11,4	73,9 ^{ab} \pm 11,4
	1,25	31,5 ^{ab} \pm 12,7	87,0 ^b \pm 17,4	92,0 ^{bc} \pm 11,0
	2,5	52,0 ^{ab} \pm 16,4	78,0 ^b \pm 22,8	88,0 ^{bc} \pm 13,0
	5,0	94,0 ^{bc} \pm 8,9	100 ^b \pm 0,0	100 ^c \pm 0,0
	10,0	100 ^c \pm 0,0	-	100 ^c \pm 0,0
	15,0	100 ^c \pm 0,0	-	100 ^c \pm 0,0
	20,0	100 ^c \pm 0,0	-	100 ^c \pm 0,0
	30,0	100 ^c \pm 0,0	-	100 ^c \pm 0,0

$$(\%ETL) = ML + [(1 - ML) \times MPR]$$

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

* Apresentou apenas um indivíduo em uma única repetição.

N = 50.

Já para a eficácia do tratamento larval, esse valor foi 0,26 mg/ml. Para pupas o valor da DL₅₀ foi 19,30 mg/ml para a mortalidade pupal e 17,32 mg/ml para a eficácia do tratamento. Com relação a este estágio, cabe destacar os altos valores referentes as doses letais devido à baixa atividade das substâncias testadas.

Tabela 3 – Média (\pm desvio padrão) de mortalidade de pupas de *Musca domestica* e má formação de adultos tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia sidoides* e com os monoterpenos timol e carvacrol, em condições de laboratório ($28\pm 2^\circ\text{C}$ e UR $60\pm 10\%$), com os respectivos percentuais de eficácia.

Tratamentos	Concentrações (mg/ml)	Mortalidade pupal (MP%)	Percentual de má formação de adultos (PMD%)	Eficácia do tratamento pupal (ETP%)
Óleo de <i>L. sidoides</i>	Controle Tween 80			
	(20,0)	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0
	0,625	4,0 ^a \pm 5,5	0,0 ^a \pm 0,0	4,0 ^a \pm 5,5
	1,25	4,0 ^a \pm 5,5	0,0 ^a \pm 0,0	4,0 ^a \pm 5,5
	2,5	2,0 ^a \pm 4,5	0,0 ^a \pm 0,0	2,0 ^a \pm 4,5
	5,0	2,0 ^a \pm 4,5	0,0 ^a \pm 0,0	2,0 ^a \pm 4,5
	10,0	2,0 ^a \pm 4,5	0,0 ^a \pm 0,0	2,0 ^a \pm 4,5
	15,0	2,0 ^a \pm 4,5	0,0 ^a \pm 0,0	2,0 ^a \pm 4,5
	20,0	10,0 ^a \pm 10,0	37,7 ^b \pm 11,6	44,0 ^b \pm 11,4
	30,0	12,0 ^a \pm 8,4	38,5 ^b \pm 14,8	46,0 ^b \pm 13,4
Timol	Controle DMSO			
	(10,0)	4,0 ^a \pm 5,5	0,0 ^a \pm 0,0	4,0 ^a \pm 5,5
	0,625	2,0 ^a \pm 4,5	0,0 ^a \pm 0,0	2,0 ^a \pm 4,5
	1,25	8,0 ^a \pm 11,0	2,0 ^a \pm 4,5	10,0 ^a \pm 10,0
	2,5	6,0 ^a \pm 8,9	0,0 ^a \pm 0,0	6,0 ^a \pm 8,9
	5,0	8,0 ^a \pm 8,4	0,0 ^a \pm 0,0	8,0 ^a \pm 8,4
	10,0	6,0 ^a \pm 5,5	2,2 ^a \pm 5,0	8,0 ^a \pm 8,4
	15,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0
	20,0	52,0 ^b \pm 16,4	3,3 ^a \pm 7,4	54,0 ^b \pm 15,2
	30,0	74,0 ^b \pm 20,7	60,0 ^b \pm 38,4	84,0 ^b \pm 20,8
Carvacrol	Controle DMSO			
	(30,0)	4,0 ^a \pm 5,5	0,0 ^a \pm 0,0	4,0 ^a \pm 5,5
	0,625	4,0 ^a \pm 5,5	0,0 ^a \pm 0,0	4,0 ^a \pm 5,5
	1,25	4,0 ^a \pm 5,5	2,0 ^a \pm 4,5	6,0 ^a \pm 5,5
	2,5	16,0 ^{ab} \pm 5,5	0,0 ^a \pm 0,0	16,0 ^{ab} \pm 5,5
	5,0	36,0 ^b \pm 15,2	7,3 ^a \pm 10,1	40,0 ^{bc} \pm 18,7
	10,0	38,0 ^{bc} \pm 17,9	7,5 ^a \pm 11,2	42,0 ^{bc} \pm 19,2
	15,0	44,0 ^{bc} \pm 11,4	2,8 ^a \pm 6,4	46,0 ^{bc} \pm 9,0
	20,0	58,0 ^c \pm 19,2	8,0 ^a \pm 17,9	62,0 ^c \pm 19,2
	30,0	52,0 ^c \pm 13,0	0,0 ^a \pm 0,0	52,0 ^c \pm 13,0

$$(\%ETP) = MP + [(1 - MP) \times PMD]$$

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

N = 50.

3.5. Discussão

Nesse estudo foram testados o óleo essencial de *L. sidoides* e seus monoterpenos mais frequentemente encontrados, embora o carvacrol não esteja presente nessa amostra de óleo. Essa variação na quantidade e constituição química dos óleos essenciais para uma mesma espécie é decorrente de diversos fatores, tais quais parte da planta utilizada para a extração, processo de extração, ambiente e solo diferenciados, sazonalidade, disponibilidade de água,

luminosidade, temperatura, fatores genéticos, estágio de desenvolvimento da planta e estado nutricional (SOARES & TAVARES-DIAS, 2013).

Tabela 4 – Concentrações letais (LC₅₀) do óleo essencial de *Lippia sidoides* e os monoterpenos timol e carvacrol sobre larvas (terceiro ínstar) e pupas de *Musca domestica* calculados para a mortalidade e eficácia do tratamento, sobre condições de laboratório (28±2 °C e UR 60±10%).

Tratamentos	Mortalidade		Eficácia do Tratamento	
	Mortalidade Larval (ML)	Mortalidade Pupal (MP)	Eficácia do Tratamento Larval (ETL)	Eficácia do Tratamento Pupal (ETP)
	DL ₅₀	DL ₅₀	DL ₅₀	DL ₅₀
	(95% CI)	(95% CI)	(95% CI)	(95% CI)
Óleo essencial de <i>L. sidoides</i>	2,97 (2,65-3,33)	*	1,64 (1,44-1,86)	64,62 (36,62-114,02)
Timol	2,09 (1,75-2,49)	32,09 (23,65-43,54)	1,25 (1,07-1,45)	27,39 (20,96-35,80)
Carvacrol	2,05 (1,81-2,33)	19,30 (14,92-24,97)	0,26 (0,14-0,49)	17,32 (13,47-22,27)

IC: indica os intervalos de confiança; a atividade do composto é considerada significativamente diferente quando o IC de 95% não consegue sobrepor-se.

*: DL₅₀ não calculada devido a falta de atividade do óleo essencial de *L. sidoides*.

Valores da DL₅₀ em mg/ml.

N = 50.

Os resultados do presente estudo mostram que a partir da concentração de 5,0 mg/ml para o carvacrol e 10,0 mg/ml para o timol e o óleo de *L. sidoides* essas substâncias apresentaram impacto direto na mortalidade das larvas. Já nas concentrações menores, apesar de não ocorrer a morte após o contato, um impacto secundário foi observado, visto que houve inibição no desenvolvimento de algumas das pupas recuperadas, sendo que essas não originaram adultos. Esse fato contribuiu para elevar a eficácia do tratamento das substâncias testadas. Com relação

às pupas, também foi observado impacto secundário para as concentrações de 20,0 e 30,0 mg/ml para o óleo de *L. sidoides* e 30,0 mg/ml para o timol; nessas formulações algumas das pupas tratadas que não interromperam o processo de metamorfose formaram adultos com alterações de crescimento e desenvolvimento, pois apresentaram tamanho corporal menor e ausência do desenvolvimento alar em relação ao grupo controle (Figura 1).

Pavela (2007) também encontrou impacto direto na mortalidade de larvas de último instar tratadas com óleo de *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) em testes de aplicação tópica; entretanto, o autor não mensurou a ação sobre o desenvolvimento das larvas que não morreram após o contato com o óleo, cujo como componente majoritário também é o timol (77,72%). Os impactos secundários verificados por este autor foram observados, principalmente, nos ovos postos por fêmeas tratadas com dosagem sub-letal. Nesse caso, a eclosão larval foi afetada, houve mortalidade significativa das larvas que eclodiram desses ovos e surgiram pupas com tamanho menor e com taxas de mortalidade variando de 96 a 100%. Os impactos secundários verificados no presente estudo e por Pavela (2007) tem, juntamente com a ação direta sobre o estágio tratado, papel importante na diminuição da densidade populacional de mosca doméstica, já que contribuem diminuindo a prole. Entretanto, análises comparativas mais aprofundadas tornam-se difíceis, levando-se em conta as diferenças entre os estágios e metodologia de aplicação empregados.

O efeito dos monoterpenos timol e carvacrol sobre a mortalidade de fêmeas adultas de *M. domestica* já foi descrito na literatura. Pavela (2008) relatou a toxicidade aguda desses compostos através da aplicação tópica em fêmeas adultas. Dos monoterpenos avaliados, esses foram os que alcançaram os menores valores para a DL_{50} e DL_{90} nessa metodologia de aplicação. Entretanto, os resultados no experimento de fumigação mostraram que esses compostos não foram eficazes comparados aos outros testados. Em outro experimento, este mesmo autor encontrou 100% de mortalidade em fêmeas adultas que tiveram contato tópico com esses compostos aplicados em uma dose elevada (500 μ g/mosca). Novamente o timol e carvacrol apresentaram os menores valores para a DL_{50} e DL_{90} os diversos fenóis testados

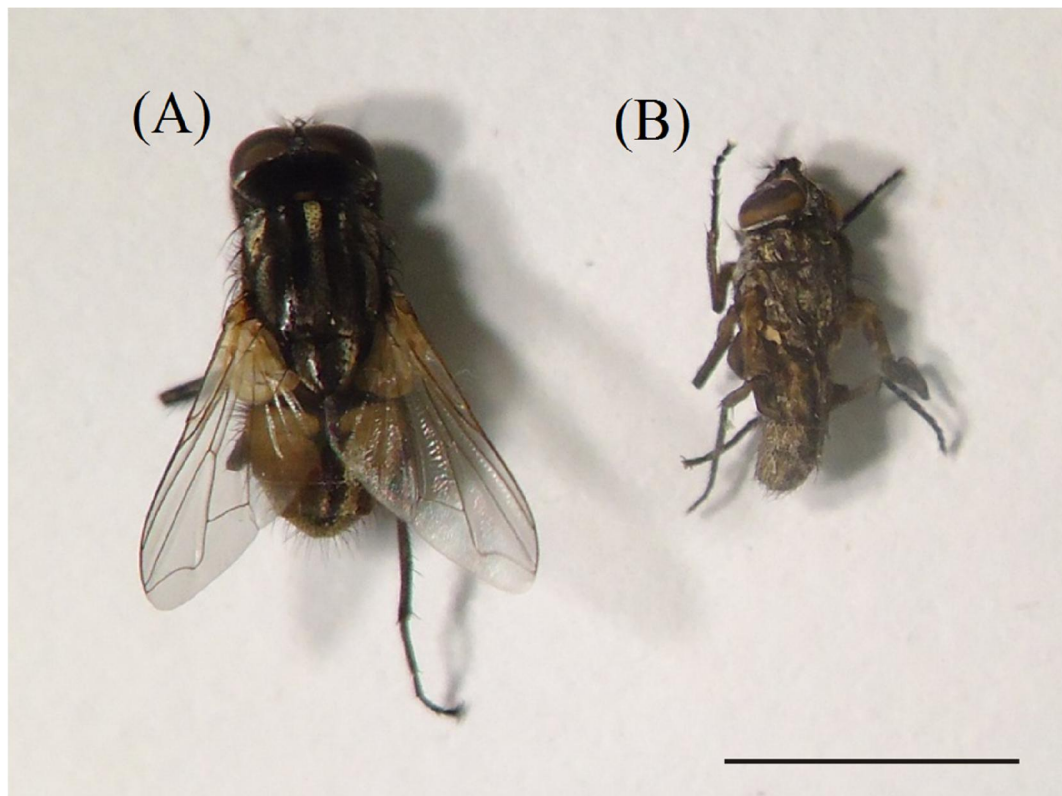


Figura 1. Má formação do adulto de *Musca domestica* após tratamento pupal com timol e óleo essencial de *Lippia sidoides*: (A) controle e (B) tratado. Barra de escala horizontal = 0,5 cm. Fonte: autor.

(PAVELA, 2011). Os resultados do presente estudo corroboram os encontrados nesses dois trabalhos no que diz respeito ao impacto na mortalidade das larvas tratadas através do contato. Também foi observado para o carvacrol e timol os menores valores para DL_{50} para o controle de larvas e pupas, embora a atividade pupicida dessas substâncias tenha sido baixa. Contudo, apesar dos monoterpenos testados terem sido os mesmos, os estágios de desenvolvimento e o modo de aplicação utilizados diferiram, o que dificulta um exame mais apurado com a finalidade de determinar possíveis semelhanças, diferenças ou relações entre os resultados encontrados.

Os valores obtidos para a DL_{50} mostram que existe diferença de sensibilidade entre os estágios de desenvolvimento da mosca doméstica para as substâncias testadas. Esse fato foi constatado pela baixa atividade pupicida, que levou a altos valores referentes as doses letais quando comparados com os obtidos para o estágio larval. Isso condiz com o exposto por Malik *et al.* (2007) em estudo de revisão sobre as estratégias de controle da mosca doméstica. Segundo esses autores, o estágio de desenvolvimento das moscas também exerce influência no efeito das

substâncias. Assim como no presente estudo, Pavela (2007) encontrou diferenças de sensibilidade entre os estágios de desenvolvimento de *M. domestica*. Este autor observou que a DL₅₀ e DL₉₉ para larvas de último instar apresentaram os maiores valores ($\mu\text{g}/\text{mosca}$) em relação ao estágio adulto em testes de aplicação tópica com o óleo de *T. vulgaris*, que tem o timol como componente majoritário.

Tong & Coats (2010) demonstraram o mecanismo de ação do timol e carvacrol em *M. domestica*. Esses monoterpenos agem ligando-se ao neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA), que se une a receptores transmembrana específicos da membrana plasmática dos neurônios. Esta ligação causa a abertura dos canais de cloro (Cl^-) permitindo o fluxo desse íon no interior dos neurônios. A ligação do timol e carvacrol a esse neurotransmissor aumenta o fluxo de íons Cl^- ativados pelo GABA no interior dos neurônios. Como consequência, ocorre a morte da mosca devido a alterações na transmissão do impulso nervoso. Muitos inseticidas tem como alvo importante os receptores GABA associados aos canais de íons cloro (WAFFORD *et al.*, 1989; BLOOMQUIST, 1994; COLE *et al.*, 1993; HAINZL & CASIDA, 1996), embora o sítio de ligação seja diferente e a afinidade de ligação seja muito menor nesses monoterpenos (TONG & COATS, 2010). Estes produtos atuam da mesma maneira que o carvacrol e o timol, porém podem levar tanto a uma diminuição quanto a um aumento do fluxo de Cl^- para o interior dos neurônios. Como consequência o inseto morre devido a superexcitação ou inibição do sistema nervoso (BLOOMQUIST, 2003). Essa pode ser a provável explicação da causa da morte das larvas de *M. domestica* tratadas com as substâncias do presente estudo. Porém, para os impactos secundários, tais quais inibição no desenvolvimento de algumas das pupas recuperadas e adultos com alteração de crescimento e desenvolvimento alar, não é possível afirmar que esses efeitos estejam relacionados a esse mecanismo de ação.

Devido a variação do modo do experimento, diferentes regimes/tempos de exposição e concentrações empregadas, torna-se difícil fazer comparações com outros estudos (Kumar *et al.*, 2011b), pois variando qualquer um desses componentes, a atividade inseticida de uma determinada substância irá alterar-se substancialmente (Kumar *et al.*, 2012a). O modo de aplicação, o sexo e o estágio de desenvolvimento das moscas também exercem influência no efeito das substâncias (MALIK *et al.*, 2007). Desta forma, a padronização de testes em diferentes estágios de *M. domestica* para minimizar tais variações que influenciam na atividade de princípios ativos e, conseqüentemente, impedem comparações deve ser considerada.

3.6. Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram o elevado potencial do óleo essencial de *L. sidoides* e dos monoterpenos timol e carvacrol no controle de larvas de *M. domestica* através do contato. Essas substâncias, portanto, devem ser melhor investigadas para o desenvolvimento de produtos ambientalmente seguros e não tóxicos para o controle de larvas de mosca doméstica e que, apesar de não terem sido totalmente efetivas no controle de pupas, seu uso para esse estágio pode ser indicado em um programa de Manejo Integrado de Pragas.

3.7. Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), a Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e ao prof. Dr. Ronaldo Rocha Bastos (Departamento de Estatística/ICE/UFJF) pela análise das fórmulas de eficiência.

3.8. Referências bibliográficas

- AHMED, S. M.; EAPEN, M. Vapour toxicity and repellency of some essential oils to insect pests. **Indian Perfumer**, v. 30, p. 273 - 278, 1986.
- ANSARI, M. A.; VASUDEVAN, P.; TANDON, M.; RAZDAN, R. K. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 267 - 271, 2000.
- ARNASON, J. T.; PHILOGENE, B. J. R.; MORAND, P. Insecticides of plant origin. **American Chemical Society Symposium series**, v. 387, p. 1-213, 1989.
- AXTELL, R. C. Arthropod pests of poultry, in *Livestock Entomology*. Ed by WILLIAMS, R. E.; HALL, R. D.; BROCE, A. B.; SSCHOLL, P. J. **Wiley & Sons**, NewYork, p. 269 - 296, 1985.
- AXTELL, R. C. Status and the potential of biological control in livestock and poultry pest management systems. In: Biological Control of Muscoid flies. PATTERSON, R. S.; RUTZ, D. A. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v. 61, p. 1 - 9, 1986.
- AYRES M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. **Instituto Mamirauá**. Belém, Pará. 2007.
- BLOOMQUIST, J. R. Cyclodiene resistance at the insect GABA receptor/chloride channel complex confers broad cross resistance to consultants and experimental phenylpyrazole insecticides. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 26, p. 69 - 79, 1994.
- BLOOMQUIST, J. R. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 54, p. 145 - 156, 2003.
- BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 349 - 356, 2007.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 288 – 294, 2007.
- CARVALHO, C. J. B. Revisão das espécies e posição sistemática de *Palpibracus* Rondani (Diptera, Muscidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 6, p. 325 - 375, 1989.
- CARVALHO, C. J. B. **Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: taxonomy**. Editora UFPR, 2002.
- CARVALHO, C. J. B.; COURI, M. S.; PONT, A. C.; PAMPLONA, D.; LOPES, S. M. Part II. Muscidae, p. 201. In: CARVALHO, C. J. B. A Catalogue of the Faniidae and Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region. **Sociedade Brasileira de Entomologia**, 1993.

COATS, J. R.; KARR, L. L.; DREWES, C. D. Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids in insects and earthworms. In: HEDIN, P. Natural occurring pest bioregulators. **American Chemical Society Symposium series**, v. 449, p. 305-16, 1991.

COLE, L.; NICHOLSON, R.; CASIDA, J. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 46, p. 47 - 54, 1993.

CRAWFORD, J. Observations on the seats and causes of diseases. In 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, n. 2, p. 278, 1916.

DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O.; ROSA, L. S.; CLEMENTE, M. A.; ARCOVERDE, A. Evaluation of the acaricide activity of thymol on engorged and unengorged larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 105, p. 495 - 497, 2009.

DE VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VINCENZI, A.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, p. 801 - 804, 2004.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA VIII. **Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED)**. Lisboa: 1357 p. 2005.

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

FOTEDAR, R. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) in the transmission of *Vibrio cholerae* in India. **Acta Tropica**, v. 78, p. 31 - 34, 2001.

GEORGHIOU, G. P. The magnitude of the resistance problem. In Pesticide resistance: strategies and tactics for management. Washington, DC. **National Academy Press**, p. 14 - 43, 1986.

GEORGHIOU, G. P.; MELLON, R. B. Pesticide resistance in time and space. In Pest resistance to pesticides. New York. **Plenum Press**, p. 1 - 46, 1985.

GOMES, G.A.; MONTEIRO, C. M. O.; JULIÃO, L. S.; MATURANO, R.; SENRA, T. O. S.; ZERINGÓTA, V.; CALMON, F.; MATOSs, R. S.; DAEMON, E.; CARVALHO, M. G. Acaricidal activity of *Lippia sidoides* on unengorged larvae and nymphs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 137, p. 41 - 45, 2014.

HAINZ, D.; CASIDA, J. E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 93, p. 12764 - 12767, 1996.

HAMMOCK, B. D.; SODERLUND, D. M. Chemical strategies for resistance management. In Pesticide resistance: strategies and tactics for management. Washington, DC. **National Academy Press**, p. 111 - 129, 1986.

HENNING, W. Vorarbeiten zu ainem phylogenetischen System der Muscidae (Diptera: Cyclorrapha). Stuttg Beitr Naturkd, v. 141, p. 100. In CARVALHO, C. J. B. Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: taxonomy. **Editora UFPR**, 2002.

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, n. 2, p. 278, 1916.

HU, D.; COATS, J. Evaluation of the environmental fate of thymol and phenethyl propionate in the laboratory. **Pest Management Science**, v. 64, p. 775 – 779, 2008.

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. In: RAI, M.; CARPINELLA, M. C. **Naturally occurring bioactive compounds**. 1st. Elsevier, Amsterdam. v. 3, p. 29 - 44, 2006.

KEIDING, J. Problems of housefly (*Musca domestica*) control due to multi-resistance to insecticides. **Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology**, v. 19, p. 340 - 355, 1975.

KEIDING, J. The housefly: biology and control. **World Health Organization Vector Control Series 63 (WHO/VBC/86.937)**. Geneva, 1986.

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, n. 3, p. 302 - 310, 2011a.

KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Insecticidal properties of *Mentha* species: a review. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n.1, p. 802 - 817, /2011b.

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, n. 0, p. 106 - 112, 2012./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, n. 2, p. 212 - 218, 2012b.

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, n. 5, p. 1929 - 1936, 2012c.

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, n.1, p. 69 - 76, 2013./2013a

KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Preparation and characterization of *Mentha x piperita* oil emulsion for housefly (*Musca domestica* L.) control. **Industrial Crops and Products**, v. 44, n. 0, p. 611 - 617. 2013b.

KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Preparation and characterization of PEG-*Mentha* oil nanoparticles for housefly control. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 707 - 713, 2013c.

- KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Biocontrol potential of essential oil monoterpenes against housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p. 1 - 6, 2014.
- LEE, S.; TSAO, R.; PETERSON, C. J.; COATS, J. R. Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae), and housefly (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology** v. 90, p. 883 - 892, 1997.
- LEIDY, J. Flies as a means of communicating contagious diseases. In Hewitt, C. G. The housefly, *Musca Domestica* Linn. Its structure, habits, development, relation to disease and control. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 151, n. 2, p. 278, 1916.
- MACDONALD, R. S.; SURGEONER, G. A.; SOLOMON, K. R.; HARRIS, C. R. Effect of four spray regimes on the development of permethrin and dichlorvos resistance in the laboratory, by the housefly (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 76, p. 417 - 422, 1983.
- MALIK, A.; SINGH, N.; 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, n. 4, p. 453 - 469, 2007.
- MATOS, F. D. A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. - farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 79, p. 84 - 87, 1998.
- MEYER, J. A.; GEORGHIOU, G. P.; HAWLEY, M. K. Housefly (Diptera: Muscidae) resistance to permethrin on southern California dairies. **Journal of Economic Entomology**, v. 80, p. 636 - 640, 1987.
- MONTEIRO, C. M. O.; DAEMON, E.; SILVA, A. M. R.; MATURANO, R.; AMARAL, C. Acaricide and ovicide activities of thymol on engorged females and eggs of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 106, p. 615 - 619, 2010.
- MOREY, R. A.; KHANDAGLE, A. J. Bioefficacy of essential oils of medicinal plants against housefly, *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1799 - 1805, 2012.
- NOSTRO, A.; ROCCARO, A. S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M. A.; PIZZIMENTI, F. C.; CIONI, P. L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 519 - 523, 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, 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, p. 1938 - 1947, 2009b.
- PAPACHRISTOS, D. P.; STAMOPOULOS, D. C. Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 38, p. 117 - 128, 2002.

- PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201 - 214, 2001.
- PAVELA, R. Lethal and sublethal effects of thyme oil (*Thymus vulgaris* L.) on the house fly (*Musca domestica* Lin.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 10, n. 5, p. 346 - 356, 2007.
- 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, n. 5, p. 451 - 459, 2008./2008a
- PAVELA, R. Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.). **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 2, p. 274 - 278, 2008b.
- PAVELA, R. Insecticidal properties of phenols on *Culex quinquefasciatus* Say and *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, v. 109, n. 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, n. 0, p. 745 - 750, 2013.
- PAVELA, R.; SAJFRTOV, M.; SOVOV, H.; BÁRNET, M. The insecticidal activity of *Satureja hortensis* L. extracts obtained by supercritical fluid extraction and traditional extraction techniques. **Applied Entomology and Zoology**, v. 43, n. 3, p. 377 - 382, 2008.
- PONT, A. C. Family Muscidae. In: SÓOS, A. S.; PAAP, L. Catalogue of the Palearctic Diptera. **Hungarian Natural History Museum, Budapest**, v. 11, p. 311, 1988.
- PONT, A. C. Family Muscidae. In: EVENHUIS, N. Catalog of the Diptera of Australasia and Oceania Regions. **Special Publications of the Bernice Pauahi Bishop Museum**, v. 86, p. 1155, 1989.
- QUARLES, W. EPA exempts least-toxic pesticides. **IPM Practitioner**, v. 18, p. 16 - 17, 1996.
- REGNAULT-ROGER, C. The potential of botanical essential oils for insect pest control. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 2, n. 1, p. 25 - 34, 1997.
- RICE, P. J.; COATS, J. R. Insecticidal properties of monoterpenoid derivatives to the housefly (Diptera: Muscidae) and red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). **Pesticide Science**, v. 41, p. 195 - 202, 1994.
- RILEY, W. The relation of insects to diseases. In: 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, n. 2, p. 278, 1916.
- 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, 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, p. 33 - 37, 2013.

SANTIAGO, G. M. P.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; ARRIAGA, A. M. C.; MATOS, F. J. A.; LIMA, M. A. S.; SANTOS, H. S.; LIMA, M. C. L.; BARBOSA, F. G. B.; LUCIANO, J. H. S.; SILVEIRA, E. R.; DE MENEZES, G. H. A. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) of essential oils of *Lippia* species from Brazil. **Natural Product Communications**, v. 1, p. 573 - 576, 2006.

SAWICKI, R. M.; FARNHAM, A. W.; DENHOLM, I.; O'DELL, K. Housefly resistance to pyrethroids in the vicinity of Harpenden. **British Crop Protection Conference: Pests and Diseases**, p. 609 - 613, 1981.

SCOTT, J. G.; ALEFANTIS, T. G.; KAUFMAN, P. E.; RUTZ, D. A. Insecticide resistance in house flies from caged-layer poultry facilities. **Pest Management Science**, v. 56, p. 147 - 153, 2000.

SENRA, T. O. S.; ZERINGÓTA, 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, p. 1461 - 1466, 2013a.

SENRA, T. O. S.; CALMON, F.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; MATOS, R. S.; MELO, D.; GOMES, G. A.; CARVALHO, M. G.; DAEMON, E. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 3471 - 3476, 2013b.

SINGH, D.; AGARWAL, S. K. Himachalol and α -himachalene: insecticidal principles of Himalayan cedarwood oil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, p. 1145 - 51, 1988.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial biotivo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, p. 109 - 123, 2013.

STROH, J.; WAN, M. T.; ISMAN, M. B.; MOUL, D. J. Evaluation of the acute toxicity to juvenile Pacific coho salmon and rainbow trout of some plant essential oils, a formulated product, and the carrier. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 923 - 30, 1998.

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, p. 1383 - 1388, 2009.

THACKER, J. M. R. An Introduction to Arthropod Pest Control. Cambridge, UK. **Cambridge University Press**, p. 343, 2002.

THOMPSON, F. C. Biosystematic information dipterists ride the third wave. In: KOSZTARAB, M.; SCHAEFER, C. W. Systematics on the North American Insects and Aracnids: status and needs. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University. **Virginia Agricultural Experiment Station Information series**, p. 90 - 1, 1990.

TONG, F. T.; COATS, J. R. Effects of monoterpenoid insecticides on [³H]-TBOB binding in house fly GABA receptor and ³⁶Cl-uptake in American cockroach ventral nerve cord. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, p. 317 - 324, 2010.

TSAO, R.; LEE, S.; RICE, P. J.; JENSEN, C.; COATS, J. R. Monoterpenoids and their synthetic derivatives as leads for new insect control agents. In: *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals IV*. BAKER, D. R.; FENYES, J. G.; BASARAB, G. S. Washington, DC. **American Chemical Society**, p. 312 – 324, 1991.

USEPA. **United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention Pesticide and Toxic Substances Program. Thymol R.E.D Facts**, 1993. Available: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/3143fact.pdf>. Accessed April 16, 2013.

WAFFORD, K. A.; LUMMIS, S. C.; SATTELLE, D. B. Block of an insect central nervous system GABA receptor by cyclodiene and cyclohexane insecticides. **Proceedings of the Royal Society of London. B. Biological Sciences**, v. 237, p. 53 - 61, 1989.

WARE, G. W. Pesticides. Theory and Application. **San Francisco: Freeman**, p. 308, 1983.

WILLIKINS, R. M.; METCALFE, R. J. Toxicity of soil applied herbicides to brine shrimp larvae (*Artemia salina*) and synergism with other pesticides. **Proceeding Righton Group Protection Conference**, v. 7, p. 163 - 168, 1993.

YIN, Q. H.; YAN, F. X.; ZU, X. Y.; WU, Y. H.; WU, X. P.; LIAO, M. C.; DENG, S. W.; YIN, L. L.; ZHUANG, Y. Z. Antiproliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. **Cytotechnology**, v. 4, p. 43 - 51, 2012.

ZUREK, L.; DENNING, S. S.; SCHAL, C.; WATSON, D. W. Vector competence of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) for *Yersinia pseudotuberculosis*. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, p. 333 - 335, 2001.