

**MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Doutorado em Biodiversidade e Saúde

**“SEGURANÇA E EFICÁCIA DE EXTRATOS OBTIDOS DE  
*Pouteria mammosa* (L.) CRONQUIST PARA O CONTROLE  
DE DÍPTEROS MUSCOIDES”**

**CARLOS MANUEL DUTOK SÁNCHEZ**

Rio de Janeiro  
Novembro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde**

*CARLOS MANUEL DUTOK SÁNCHEZ*

SEGURANÇA E EFICÁCIA DE EXTRATOS OBTIDOS DE *Pouteria mammosa*  
(L.) CRONQUIST PARA O CONTROLE DE DÍPTEROS MUSCOIDES

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como  
parte dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Biodiversidade e Saúde.

**Orientadores:** Prof. Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz.  
Prof. Dr. Bernardo Reyes Tur.

**RIO DE JANEIRO**  
Novembro de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

D977 Dutok Sánchez, Carlos Manuel

Segurança e eficácia de extratos obtidos de *Pouteria mammosa* (L.)  
Cronquist para o controle de dípteros muscoides / Carlos Manuel Dutok  
Sánchez. – Rio de Janeiro, 2015.

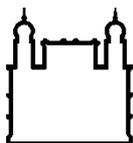
xvii, 125 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Biodiversidade e Saúde, 2015.

Bibliografia: f. 110-125

1. *Pouteria mammosa*. 2. Diptera Muscomorpha. 3. Controle de  
vetores. 4. Avaliação de extratos naturais. 5. Calliphoridae. 6. Muscidae.  
I. Título.

CDD 595.774



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde**

***AUTOR: CARLOS MANUEL DUTOK SÁNCHEZ***

**SEGURANÇA E EFICÁCIA DE EXTRATOS OBTIDOS DE *Pouteria mammosa* (L.)  
CRONQUIST PARA O CONTROLE DE DíPTEROS MUSCOIDES**

**ORIENTADORES: Prof. Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz.  
Prof. Dr. Bernardo Reyes Tur.**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Rubens Pinto de Mello - Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ)  
**Prof<sup>a</sup>. Dra. Marise Maleck** (Universidade Severino Sombra (USS) – Vassouras RJ)  
**Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Claudia Fernandes Amaral** (Farmanguinhos/FIOCRUZ)  
**Prof<sup>a</sup>. Dra. Marina Vianna Braga** (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ)  
**Prof. Dr. José Mario d'Almeida** (Universidade Federal Fluminense (UFF) - RJ)

Rio de Janeiro, 16 de novembro de 2015.

*A Margareth M.C. Queiroz minha orientadora e mãe por adoção no Brasil.*

*As minhas avós Juana e María por cuidarem sempre de mim desde onde estejam.*

*A todas e todos que me deram forças e colocaram esperança em mim, sendo o apoio para conquistar  
mais felicidade.*

## AGRADECIMENTOS

Agradecer, es un acto de amor genuino muy poderoso, no todos poseen la virtud de expresar la gratitud. Para otros agradecer es una fuerza o flujo de buenas energías que se desprende del pecho, pero este necesita ser conducido. Expresar abiertamente gratitud, así como hablar de si mismo, resulta uno de los actos más difíciles para todos, es por eso que pido disculpas pues solo en mi lengua nativa podré expresarles una ínfima parte de toda mi gratitud.

A mi orientadora Margareth Maria de Carvalho Queiroz, por haber sido mucho más que eso, mucho más que una simple orientadora. Por depositar su confianza en mí y haberme ayudado a levantar en los momentos en que he precisado. Por enseñarme a tomar decisiones importantes y a correr riesgos por alcanzar metas que parecían imposibles de lograr. Por regalarme su amor detrás de tanta dureza, esa dureza que muchos hijos precisan y que muy pocas veces comprendemos. Gracias mamãezinha por dejarme entrar en tu vida. Así como también agradezco a Rómulo por dejarme robar tanto tiempo de tí para ayudarme a alcanzar esta meta y por su estimación hacia mí. ¡Estoy y estaré eternamente agradecido a ambos!

A mi orientador, Bernardo Reyes Tur por haber aceptado este reto. Por abrir todos los caminos y saltar burocracias en pos de que todo mi proceso de inscripción de doctorado y todo lo relacionado al proyecto en Cuba pudiera ser viable. Y por haberse convertido en más un amigo. ¡Muchas gracias professor!

Agradezco a mi familia por tantas fuerzas, por tanto amor y por toda admiración. A mis abuelas, porque desde donde quiera que estén se que están cuidando de mí. A mi mamá y mi papá por todo el orgullo que me muestran, por haber sido tan locos y por no haber pensado en nada más en aquel mágico momento en que fui concebido y haberme traído a este mundo. Por hacer de mí aquella partícula triunfadora. A mis tías, los mayores pilares de mi vida, a quienes debo todos los grandes logros de mi carrera profesional y personal. A mis abuelos, que aunque con ideales bien diferentes, supieron darme cada uno los mejores ejemplos desde su punto de vista, uno me enseñó disciplina, horadez, equilibrio y capacidad de análisis; el otro la capacidad de soñar y de confiar en que existe un más allá, que estamos aquí con un propósito y una razón, que nuestro paso por la tierra y de esta forma no es en vano. A mis hermanos y hermana, por ser motivo de alegría en mi vida y porque sé que puedo y podré contar con ustedes en todo momento. A mis primas y primos por toda la complicidad invaluable. A mis tíos por haber cuidado siempre de mí y haberme suministrado tantos conocimientos. A mis dos ángeles guardianes (Juana y Dulce María), que tan celosamente cuidan de mí todo el tiempo, por ayudarme a triunfar y por los dones transmitidos.

A mi esposa, por ser lo mejor que ha acontecido en mi vida. Por darme tanto amor, y ser la paz que siempre precisé. Por ser mi control en momentos de turbulencia, mi hombro para llorar y mi mayor orgullo más allá de cualquier título. ¡Te amo! Además por venir acompañada de una familia maravillosa de la cual me siento muy feliz de formar parte, mi suegro y mi suegra linda por dejarme poseer una de sus tres joyas, mis cuñadas maravillosas y sobrino que tanto me quiere, a todos los quiero mucho.

**En Cuba** a mis amigos y amigas por darme tanto amor y tanta alegría. Rey, Eni, Betty, Andrés, Anay, Silvita, Yuli y Ángel mis amigos para todo, mi familia adquirida los quiero mucho. Ide, mi mamazota, mi hermana (¡menor!), ¡Gracias por ayudarme con esto! Sin tí y sin mi Flaca ahora mismo no estaría lista esta tesis. Mi hermanito Fernando por haberme ayudado siempre en todo incondicionalmente, por haberme enseñado a reconocermé así como mi Profe Ana Iris Frías, más una madre en esta mi vida. ¡Todas y todos ustedes son la familia que Dios me dió y es perfecta!

Mis colegas del Departamento de Farmacia, personas que llevaré siempre conmigo: Julio César (más que el jefe, el hermano aquel que fue hecho para confiarle todo), Ania (por enseñarme precaución y quererme tanto), Aurora (toda dulcura y respaldo para su osito como dice ella), Thais (mi organización y alegría), Niurky (mi hermanita bella), Pupi (un abrazote grande y gracias por toda ayuda y consejos allá y aquí), Marita (Por nuestra amistad de siempre y darme aliento y fuerzas el tiempo que estuvimos juntos aquí en Río de Janeiro en que llorábamos juntos jajaja), Chicha (por estar siempre dispuesta a ayudarme y decir siempre ¡Profe lo que necesite!), Tania (por toda su locura convertida en amor hacia mí), Jesús (mi exalumno y excelente amigo), Leo (por enseñarme los trucos de una clase, del médio universitário, por la confianza que nos tenemos y por nuestro trabajo juntos), Yamilé, Lourdes, Imilci, Liana, Ariadna, Evelyn, Dorge, Jimmy y Maury a todos muchas gracias por esa familia linda que somos en ese nuestro rincón. A Ivette e Isis que desde México oraron tanto para que me fuera muy bien en la tesis y en todo lo logrado.

Agradezco eternamente a mi amiga Clarita Azalea, por toda la ayuda en los experimentos, porque siempre estuvo ahí cuando no pensé que fuese a conseguir llevar todo a cabo, por toda gestión que fue precisa en función de ayudarme. ¡Muchas gracias!

**En Brasil** a todas esas personas lindas que hacen que cada día sea soportable lejos de los míos y de mi tierra. Aquellos que con solo un gesto y una sonrisa me han proporcionado una estancia grata en este maravilloso país.

A mi amiga Cristiane, aunque a veces sin vernos por tiempos, sabemos que estamos ahí, y que aparece en aquel preciso momento cuando más me desespero, cuando tengo que tomar decisiones difíciles y de cabeza fría. Porque se preocupa para que yo no pase trabajo y este feliz todo el tiempo. Porque es incondicional conmigo, y el universo ha querido que seamos hermanos. También le agradezco por integrarme a personas tan maravillosas, que han hecho de mi suerte hasta su responsabilidad. Personas lindas que pusieron fe para que mi futuro fuera mejor, estas son la Dra. Nazaré Soeiro, una magnífica persona que me abrió no solo las puertas de su laboratório sino las puertas de su corazón y toda amistad incondicional, mi amiga Denise por esa dulzura mágica y contagiosa que lo llena a uno de buenas energías y ganas de luchar, mi amiga Maria Alice, siempre con una sonrisa al aire para alegrar el día, levantar los ánimos y así sonriente demostró, y siempre dejó claro, que está ahí para que pueda contar con su ayuda siempre que me sienta perdido. A todas (ángeles de Charly) miles de gracias, gracias por haber depositado tanta confianza e impregnado fuerza en mí. ¡Es mi mayor orgullo haber podido cumplir con esa responsabilidad!

En el Laboratorio de Entomología Médica e Forense (LEMEF/FIOCRUZ), agradezco a todos por haberme permitido ser parte del equipo, a Vítor por toda ayuda y enseñanzas, Viviane por las peleas de comportamiento y cultura y por reír conmigo, a Marina por estar ahí siempre sonriente cuando más se le necesita, a Titi por tantas atenciones conmigo y por su amistad, a Jonathan por su amistad y ayuda, a todos los que me desean buenos días, me desean suerte o simplemente me regalan una sonrisa: Lorraine, Jéssica, Isadora, Raquel, Daiana, Alexandre y Marcio. Agradecimiento especial a los amigos que formamos equipo de trabajo: Paloma, Lucas, Lili y meu novo irmão Luiz Eduardo, a quienes debo infinitamente la realización de los experimentos, finales de semanas, días feriados, días de huelga, madrugadas y salidas a altas horas hasta el último momento de la conclusión de este trabajo. A todos muchas gracias. Quiero agradecer incluso a aquellos que ya no están en el Laboratorio y que de ellos alguna cosa pude haber aprendido.

Agradezco a mis amigos de apartamento, por haberme proporcionado un verdadero hogar de paz y armonía, una familia de momentos buenos y no tan buenos, como toda familia, pero siempre prevaleciendo el respeto, la amistad, la reciprocidad. Les agradezco por toda la preocupación cuando ya

era tarde y yo no llegaba en casa, por ser mis guías para buenas decisiones en el día a día y hasta por haber cuidado de mí (ya hasta amarrarme los zapatos) durante mis inmovilizantes y desagradables crisis de gotas. Gracias Ciro, Addinsson y en especial a Miguel, ha sido un placer que hayamos morado juntos durante este año. Muchas gracias de todo corazón. Espero que nuestros lazos de amistad prevalezcan por siempre.

Agradezco a Luciana Mara (Mi amiga liiiiinda da FIOCRUZ) – Secretaria del Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Saúde y al Doctor Cleber Galvão (Excelente persona) – Coordinador del Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Saúde, a ambos por el magnífico trabajo, optima atención y su siempre disponibilidad para con los pósgraduandos y en especial conmigo.

En el estado de Amapá, todas las personas que siempre me apoyaron y fueron mi sostén para que pudiera presentarme al Concurso Público para Profesor de Magisterio Superior de la Universidad Federal de Amapá. Mi amigo el Dr. Nonato Raimundo Nonato siempre a mi disposición, para lo que fuera. A mi amiga Telma Adriana Lobato y a su maravillosa familia que me acogieron en su casa como uno más de ellos, estaré siempre agradecido de ser uno más de ustedes. A Mauro, Sueño y Leidiane, por su gran apoyo y por haberme presentado a Doña Raimunda, muy humilde persona que corpatió lo poco que tenía conmigo cuando precisé hacer mis exámenes en el Campus Oiapoque, por darme su casa, su cama y todo lo que fue necesario, por poner todo lo poco que poseía a mi entera disposición. A mis amigos Tiago Lima y Gildo Siqueira por haberme acogido en su casa, por su amistad infinita, por mover cielo y tierra para que todo con respecto a mi y mi vida futura diera cierto.

Agradezco eternamente a los miembros de la banca por aceptar evaluar mi tesis y realizar todas las críticas y sugerencias que con certeza han de dar calidad a este trabajo. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro com a bolsa de estudos e pelo financiamento do Projeto (Nº 130/11) de Cooperação Internacional CAPES/MES-Cuba. Agradezco eternamente a este país y espero dar todo lo mejor de mí en función de servir a la formación de nuevos profesionales.

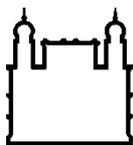
Agradezco al Universo, por permitirme ser tan feliz, por permitirme alcanzar mis metas, sueños y hasta caprichos. Porque todos los caminos aunque siempre irregulares me resultan fáciles de recorrer. Por la dicha de conocer y convivir con tantas personas lindas. Gracias por los días, las noches, la lluvia el sol y todo aquello que parece insignificante por el simple hecho de siempre estar ahí. Gracias por permitirme superar y controlar mis miserias humanas (todos llevamos un poco dentro) y permitirme el placer de ayudar a quien precise de un mejor día, una sonrisa o una palabra alentadora para ponerse en pie y seguir adelante.

Gracias a Dios, en cualquiera de las formas en que pueda manifestarse, y como dice mi esposa:

-Por descuidarse un poco del mundo para estar exclusivamente pendiente de mí.

Eternamente agradecido

Carlos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### SEGURANÇA E EFICÁCIA DE EXTRATOS OBTIDOS DE *Pouteria mammosa* (L.) CRONQUIST PARA O CONTROLE DE DÍPTEROS MUSCOIDES

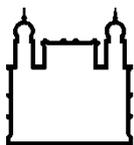
#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

**Carlos Manuel Dutok Sánchez**

O uso comum como alimento e na medicina etnobotânica do Zapote ou Mamey, classificado taxonomicamente como *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist (Sapotaceae), tem demonstrado um baixo ou ausente nível de toxicidade como fruta e nos extratos preparados a partir das suas sementes. Entretanto é essencial que sejam feitos ensaios que demonstrem a sua segurança para sustentar cientificamente seu uso na terapia com dorgas e outras aplicações. O presente estudo teve como objetivo: avaliar a segurança e a eficácia dos extratos, aquoso e hidroalcoólico a 25%, de sementes de *P. mammosa* (L.) Cronquist para o controle alternativo de dípteros muscoides da família Calliphoridae e da espécie *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). Foi feita a triagem fitoquímica dos extratos e foram usadas as Diretrizes 402, 404 e 405 que preconizam os estudos de Toxicidade Dérmica Aguda e Irritação Aguda Dérmica e Oftálmica, assim como foi usada a diretriz 423 Toxicidade Aguda Oral segundo o método das classes de toxicidade emitidas pela Organização para o Desenvolvimento e a Cooperação Econômica (OECD). Foi determinado em ambos os extratos (aquoso e hidroalcoólico a 25%) a presença em intensidades similares de cumarinas, saponinas, fenóis e taninos, sugerindo quantidades similares destes. Os metabólitos que marcaram as maiores diferenças entre os dois extratos foram os lipídeos e/ou óleos essenciais, aminoácidos, e açúcares redutores que estavam unicamente contidos no extrato aquoso. Alcaloides, quinonas, triterpenos e esteroides foram evidentes somente no extrato hidroalcoólico a 25% of *Pouteria mammosa*. O extrato aquoso foi classificado na categoria: “não classificado como tóxico” (CTA 5), entretanto o extrato hidroalcoólico a 25% foi classificado como “perigoso” (CTA 4). Ambos os extratos podem ser utilizados sem que reações colaterais apareçam quando colocados em contato com a pele, o que permitiu classificá-los como “potencialmente não irritantes”. Os dois extratos de *P. mammosa* provocaram uma irritação reversível e leve dos olhos, sendo classificados como “ligeiramente irritantes”. Os resultados, além disso, demonstraram que o tratamento tópico com *P. mammosa* pode alterar o desenvolvimento pós-embrionário de todas as espécies de dípteros testadas, gerando diminuição na massa larval das espécies *Chrysomia megacephala*, *Chrysomya putoria* e *M. domestica*. Houve um aumento do período pós-embrionário em três das espécies testadas, por até três dias em uma delas, sem variar o período total de *Chrysomya albiceps* e *Cochliomyia macellaria* e reduzindo o tempo de desenvolvimento de *C. putoria*. Foram alcançadas porcentagens de mortalidade acima de 40% sendo as espécies *C. macellaria* (72%) e *M. domestica* (61%) as mais sensíveis. Malformações após emergência foram observadas em quatro das seis espécies testadas. Não houve efeito sobre a razão sexual dos muscoides tratados com *P. mammosa*.

**Palavras chaves:** *Pouteria mammosa*, Diptera Muscomorpha, Controle de vetores, Avaliação de extratos naturais, Calliphoridae, Muscidae.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### SAFETY AND EFFICACY OF EXTRACTS OBTAINED FROM *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist FOR DIPTERA MUSCOIDS CONTROL

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Carlos Manuel Dutok Sánchez

Common use in food and ethnobotanic medicine of Zapote or Mamey taxonomically classified as *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist (Sapotaceae), shows its low or absent toxicity as fruit extracts prepared from seeds. However, it is essential to conduct security trials to scientifically support their use in drug therapy and other applications. This study aimed to evaluate the safety and efficacy of the aqueous and hydroalcoholic extract at the concentration of 25% from the seeds of *P. mammosa* (L.) Cronquist for alternative control of muscoid flies of the family Calliphoridae and of the species *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). Phytochemical screening of the extracts was carried out and the 402, 404 and 405 Acute Dermal Toxicity, Acute Dermal and Eye Irritation/Corrosion guidelines were used, as well as the 423 Acute Oral Toxicity guideline, Acute Toxic Class Method of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). It was determined that both extracts (aqueous and hydroalcoholic at 25%) contained, in similar intensities, coumarins, saponins, phenols, and tannins, suggesting similar amounts. Metabolites which caused most differences between the two extracts were lipids and/or essential oils, amino acids, and reducing sugars that are only contained in the aqueous extract. Alkaloids, quinones, and triterpenes, and steroids were evident only in the hydroalcoholic extract at 25% of *P. mammosa*. The aqueous extract was located in the category: “not classified as toxic” (CTA 5), while the hydroalcoholic extract at 25% was classified as “dangerous” (CTA 4). Both extracts can be used without irritation of the the skin which permitted its classification as “potentially not irritant”. Both extracts of *P. mammosa* caused mild and reversible eye irritation, and were classified as slightly irritating. The results also demonstrated that topic treatment with *P. mammosa* can alter the post embryonic development of all tested species. Decrease in the body weight of the species *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* e *M. domestica* was observed. There was an increase in the post-embryonic development in three of the studied species, for up to three days in one of them. There was no change in the total development period of *Chrysomya albiceps* and *Cochliomyia macellaria*, but a reduction in the development time of *C. putoria*. Mortality percentages were over 40%, beings the species *C. macellaria* (72%) and *M. domestica* (61%) were the most sensitive. Malformations after emergence were observed in four of the six tested species. There was no effect on the sex ratio of muscoids treated with *P. mammosa*.

**Key words:** *Pouteria mammosa*, Diptera Muscomorpha, Pest control, Natural extracts, Calliphoridae, Muscidae.

# ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Caracterização morfológica da ordem Diptera	3
1.2 Família Calliphoridae: Caracterização morfológica	5
1.3 Histórico da introdução do gênero <i>Chrysomya</i> (Calliphoridae) no Brasil	6
1.4 Flutuação populacional da família Calliphoridae	7
1.5 Importância médica veterinária dos califorídeos (Diptera: Calliphoridae)	7
1.5.1 <i>Chrysomya albiceps</i>	9
1.5.2 <i>Chrysomya megacephala</i>	10
1.5.3 <i>Chrysomya putoria</i>	11
1.5.4 <i>Cochliomyia macellaria</i>	12
1.6 Subfamília Calliphorinae	13
1.6.1 <i>Lucilia cuprina</i>	13
1.7 Família Muscidae (CALYPTRATAE: MUSCIDAE)	14
1.7.1 <i>Musca domestica</i> . Características	15
1.8 Controle de insetos	17
1.8.1 Controle químico	17
1.8.2 Controle botânico	19
1.8.3 Controle biológico	22
1.9 <i>Pouteria mammosa</i>	24
1.9.1 Classificação taxonômica	25
1.9.2 Características do fruto	26
1.9.3 Outras sapotáceas e a atividade inseticida	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Material Vegetal	29
3.2 Obtenção e caracterização dos extratos de Zapote	29
3.3 Manuseio de animais de laboratório e considerações éticas	30
3.4 Provas para determinação da segurança dos extratos	31
3.4.1 Avaliação <i>in vitro</i> dos extratos aquoso bruto e hidroalcoólico a 25% de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> sobre culturas de cardiomiócitos	31
3.4.2 Toxicidade aguda oral pelo Método das Classes (CTA)	32
3.4.3 Teste de irritabilidade dérmica	34
3.4.4 Teste de toxicidade dérmica aguda	37
3.4.5 Teste de irritabilidade oftálmica	38
3.5 Criação e manutenção no laboratório das colônias de dípteros muscoides	39
3.6 Bioensaio de atividade inseticida em dípteros muscoides	40
3.7 Obtenção, registro e análise estatística dos dados	44

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	Controle de qualidade física, físico-química e químico-qualitativa dos extratos aquoso e hidroalcoólico 25% de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> .	45
4.2	Segurança da aplicabilidade dos extratos aquoso bruto e hidroalcoólico a 25% de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> .....	47
4.2.1	Efeito dos extratos aquoso bruto e hidroalcoólico a 25% de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> sobre células cardíacas .....	47
4.2.2	Toxicidade aguda oral em ratos tratados com os extratos aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> pelo Método das Classes de Toxicidade (CTA).....	49
4.2.3	Potencial irritante do contato com a pele de ratos tratados com os extratos, aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> .....	53
4.2.4	Potencial tóxico agudo do contato com a pele de ratos tratados com os extratos, aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> .....	54
4.2.5	Efeitos do tratamento por contato com os olhos de ratos dos extratos aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> .....	55
4.3	Avaliação da atividade inseticida de <i>Pouteria mammosa</i> em cinco espécies de Calliphoridae ( <i>Chrysomya albiceps</i> , <i>Chrysomya megacephala</i> , <i>Chrysomya putoria</i> , <i>Cochliomyia macellaria</i> e <i>Lucilia cuprina</i> ) e <i>Musca domestica</i> (Muscidae): parâmetros determinantes e significação.....	57
4.3.1	Efeitos do tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> sobre o desenvolvimento pós-embrionário de <i>Chrysomya albiceps</i> .....	58
4.3.2	Efeitos do tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> sobre o desenvolvimento pós-embrionário de <i>Chrysomya megacephala</i> .....	64
4.3.3	Efeitos do tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> sobre o desenvolvimento pós-embrionário de <i>Chrysomya putoria</i> .....	73
4.3.4	Efeitos do tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> sobre o desenvolvimento pós-embrionário de <i>Cochliomyia macellaria</i> .....	81
4.3.5	Efeitos do tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> sobre o desenvolvimento pós-embrionário de <i>Lucilia cuprina</i> .....	88
4.3.6	Efeitos do tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> sobre o desenvolvimento pós-embrionário de <i>Musca domestica</i> .....	95
4.4	Análise comparativa do efeito de <i>Pouteria mammosa</i> sobre o desenvolvimento pós-embrionário das seis espécies de dípteros muscoides estudadas: <i>Chrysomya albiceps</i> , <i>Chrysomya megacephala</i> , <i>Chrysomya putoria</i> , <i>Cochliomyia macellaria</i> , <i>Lucilia cuprina</i> e <i>Musca domestica</i> . ....	103
5	CONCLUSÕES	109
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
7	ANEXOS	126

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Vista dorsal dos adultos de *Chrysomya albiceps* evidenciando a posição dos olhos utilizada na caracterização sexual. A: Fêmea caracterizada por apresentar olhos dicópticos, (separados da linha média do corpo em vista dorsal). B: Macho caracterizado por apresentar olhos holópticos, (próximos da linha média do corpo na vista dorsal). 10
- Figura 2. Vista dorsal dos adultos de *Chrysomya megacephala* evidenciando a posição dos olhos utilizada na caracterização sexual. A: Fêmea caracterizada por apresentar olhos dicópticos, (separados da linha média do corpo em vista dorsal). B: Macho caracterizado por apresentar olhos holópticos, (próximos da linha média do corpo na vista dorsal). 10
- Figura 3. Vista dorsal dos adultos de *Chrysomya putoria* evidenciando a posição dos olhos utilizada na caracterização sexual. A: Fêmea caracterizada por apresentar olhos dicópticos, (separados da linha média do corpo em vista dorsal). B: Macho caracterizado por apresentar olhos holópticos, (próximos da linha média do corpo na vista dorsal). 11
- Figura 4. Vista dorsal dos adultos de *Cochliomyia macellaria* evidenciando a posição dos olhos utilizada na caracterização sexual. A: Fêmea caracterizada por apresentar olhos dicópticos, (separados da linha média do corpo em vista dorsal). B: Macho caracterizado por apresentar olhos holópticos, (próximos da linha média do corpo na vista dorsal). 12
- Figura 5. Vista dorsal dos adultos de *Lucilia cuprina* evidenciando a posição dos olhos utilizada na caracterização sexual. A: Fêmea caracterizada por apresentar olhos dicópticos, (separados da linha média do corpo em vista dorsal). B: Macho caracterizado por apresentar olhos holópticos, (próximos da linha média do corpo na vista dorsal). 14
- Figura 6. Vista dorsal dos adultos de *Musca domestica* evidenciando a posição dos olhos utilizada na caracterização sexual. A: Fêmea caracterizada por apresentar olhos dicópticos, (separados da linha média do corpo em vista dorsal). B: Macho caracterizado por apresentar olhos holópticos, (próximos da linha média do corpo na vista dorsal). 16
- Figura 7. Imagens do Zapote (*Pouteria mammosa*). A: Folhas e frutos na árvore. B: Medição do fruto e mostra da forma interior que deixa ver a semente e a polpa. 25
- Figura 8. Diagrama de fluxo para obtenção dos extratos aquoso bruto e hidroalcoólico a 25% de *Pouteria mammosa*. 29
- Figura 9. Diagrama de fluxo para avaliação in vitro dos extratos aquoso bruto e hidroalcoólico a 25% de sementes de *Pouteria mammosa* sobre culturas de cardiomiócitos. 32
- Figura 10. Diagrama de fluxo para determinação da Toxicidade Aguda oral pelo Método das Classes (CTA). 33
- Figura 11. Ratos Sprague Dawley. 34

Figura 12. Coelhos da linha Nova Zelândia.	35
Figura 13. Diagrama de fluxo para o Teste de irritabilidade dérmica.	35
Figura 14. Diagrama de fluxo no Teste de toxicidade dérmica aguda.	37
Figura 15. Diagrama de fluxo no Teste de irritabilidade oftálmica.	38
Figura 16. Condições para criação e manutenção das colônias de Dípteros muscoides. A: Gaiola para contenção; B: Dieta para básica para alimentação e indução da cópula e postura.	40
Figura 17. Fluxo de trabalho no bioensaio de atividade inseticida em dípteros muscoides.	42
Figura 18. Tabela de registro de dados primários utilizada na avaliação de substâncias e extratos para controle alternativo de dípteros.	43
Figura 19. Comportamento da viabilidade de células cardíacas após tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> .	48
Figura 20. Comportamento da viabilidade de células cardíacas após tratamento com o extrato hidroalcoólico a 25% de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> .	48
Figura 21. Comportamento da massa corporal dos ratos no ensaio de Toxicidade Aguda Oral pelo Método das Classes (CTA) do extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> (L.) Cronquist (Mammey ou Zapote). Os números sobre as linhas horizontais representam as médias do ganho de massa corporal em miligramas.	51
Figura 22. Comportamento da massa corporal dos ratos no ensaio de Toxicidade Aguda Oral pelo Método das Classes (CTA) do extrato hidroalcoólico a 25% bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> (L.) Cronquist (Mammey ou Zapote). Os números sobre as linhas horizontais representam as médias do ganho de massa corporal em miligramas.	51
Figura 23. Comportamento da razão sexual de <i>Chrysomya albiceps</i> após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> .	60
Figura 24. Efeito do extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> sobre o tempo de desenvolvimento de <i>Chrysomya albiceps</i> . A: Estágio larval; B: Estágio pupal; C: Período neolarva-adulto. Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatisticamente significativas no Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey ( $p < 0,01$ ) após ANOVA simples.	62
Figura 25. Mortalidade larval, pupal e do período neolarva-adulto de <i>Chrysomya albiceps</i> após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> . Valores em porcentagem são exibidos acima de cada barra.	63
Figura 26. Comportamento da razão sexual de <i>Chrysomya megacephala</i> após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> .	66
Figura 27. Efeito do extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> sobre o tempo de desenvolvimento de <i>Chrysomya megacephala</i> . A: Estágio larval; B: Estágio pupal;	

C: Período neolarva-adulto. Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatisticamente significativas no Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey ( $p < 0,01\%$ ) após ANOVA simples. 68

- Figura 28. Mortalidade larval, pupal e do período de neolarva-adulto de *Chrysomya megacephala* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. Valores em porcentagem são exibidos acima de cada barra. 70
- Figura 29. Efeitos pós-emergência de *Chrysomya megacephala* após a aplicação tópica do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. A: Número de indivíduos com malformações nas asas por cada 200 larvas contadas inicialmente em cada tratamento. B: Representação comparativa entre a porcentagem de mortalidade e a porcentagem de mortalidade acumulada frente ao grupo controle. 72
- Figura 30. Comportamento da razão sexual de *Chrysomya putoria* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. 74
- Figura 31. Efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o tempo de desenvolvimento de *Chrysomya putoria*. A: Estágio larval; B: Estágio pupal; C: Período neolarva-adulto. Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatisticamente significativas no Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey ( $p < 0,01\%$ ) após ANOVA simples. 76
- Figura 32. Mortalidade larval, pupal e do período neolarva-adulto de *Chrysomya putoria* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. Valores em porcentagem são exibidos acima de cada barra. 78
- Figura 33. Efeitos pós-emergência em *Chrysomya putoria* após a aplicação tópica do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. A: Número de indivíduos com malformações nas asas por cada 200 larvas contadas inicialmente em cada tratamento. B: Representação comparativa entre a porcentagem de mortalidade e a porcentagem de mortalidade acumulada frente ao grupo controle. 80
- Figura 34. Comportamento da razão sexual na espécie *Cochliomyia macellaria* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. 82
- Figura 35. Efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o tempo de desenvolvimento de *Cochliomyia macellaria*. A: Estágio larval; B: Estágio pupal; C: Período neolarva-adulto. Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatisticamente significativas no Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey ( $p < 0,01$ ) após ANOVA simples. 84
- Figura 36. Mortalidade larval, pupal e do período neolarva-adulto de *Cochliomyia macellaria* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. Valores em porcentagem são exibidos acima de cada barra. 86
- Figura 37. Efeitos pós-emergência de *Cochliomyia macellaria* tratadas topicamente com extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. A: Número de indivíduos com malformações nas asas por cada 200 larvas inicialmente em cada tratamento. B: Representação comparativa entre a porcentagem de mortalidade e a porcentagem de mortalidade acumulada frente ao grupo controle. 87

- Figura 38. Comportamento da razão sexual de *Lucilia cuprina* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. 89
- Figura 39. Efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o tempo de desenvolvimento de *Lucilia cuprina*. A: Estágio larval; B: Estágio pupal; C: Período neolarva-adulto. Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatisticamente significativas no Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey ( $p < 0,01$ ) após ANOVA simples. 91
- Figura 40. Mortalidade larval, pupal e do período neolarva-adulto de *Lucilia cuprina* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. Valores em porcentagem são exibidos acima de cada barra. 95
- Figura 41. Comportamento da razão sexual de *Musca domestica* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. 97
- Figura 42. Efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o tempo de desenvolvimento de *Musca domestica*. A: Estágio pupal; B: Período neolarva-adulto. Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatisticamente significativas no Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey ( $p < 0,01$ ) após ANOVA simples. 99
- Figura 43. Mortalidade, pupal e do período neolarva-adulto de *Musca domestica* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. Valores em porcentagem são exibidos acima de cada barra. 100
- Figura 44. Efeitos pós-emergência na espécie *Musca domestica* após a aplicação tópica do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. A: Número de indivíduos com malformações nas asas por cada 200 larvas contadas inicialmente em cada tratamento. B: Representação comparativa entre a porcentagem de mortalidade e a porcentagem de mortalidade acumulada frente ao grupo controle. 102

## LISTA DE TABELAS

Tabela I. Classificação taxonômica do Zapote. ....	26
Tabela II. Classificação toxicológica das substâncias segundo a Diretriz 423 da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento (OECD/OCDE 423, 2012). ....	33
Tabela III. Grau de formação das lesões na pele. ....	36
Tabela IV. Faixas do Índice de Irritação Primária estabelecidos por Draize et al. em 1944 para a classificação do efeito irritante das substâncias na pele. ....	36
Tabela V. Faixas do Índice de Irritação Ocular estabelecidos pelos critérios do Anteprojeto do Método Cubano para classificação da irritabilidade oftálmica. ....	39
Tabela VI. Parâmetros do controle de qualidade física e físico-química do extrato aquoso bruto e do extrato hidroalcoólico a 25% de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> (L.) Cronquist. (Zapote). ....	45
Tabela VII. Triagem fitoquímica (químico-qualitativa) dos extratos, aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> (L.) Cronquist. (Zapote). ....	46
Tabela VIII. Avaliação do comportamento da massa corporal e do aparecimento de eritema e edema em coelhos (fêmeas) da linha Nova Zelândia durante o ensaio de Irritabilidade Dérmica dos extratos, aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de Zapote ( <i>Pouteria mammosa</i> (L.) Cronquist). ....	53
Tabela IX. Variação da massa corporal individual dos ratos tratados com os extratos, aquoso bruto e hidroalcoólico de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> (L.) Cronquist no ensaio de Toxicidade Dérmica Aguda. ....	55
Tabela X. Número de danos oftálmicos em coelhos (fêmeas) da linha Nova Zelândia causados pelos extratos, aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> (L.) Cronquist (Zapote) no Teste de Irritabilidade Oftálmica para determinação do Índice de Irritação Ocular. ....	56
Tabela XI. Comportamento da massa corporal dos coelhos (fêmeas) da linha Nova Zelândia entre o início e final do estudo de Irritabilidade Oftálmica dos extratos aquoso bruto e hidroalcoólico a 25% de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> (L.) Cronquist. ....	56
Tabela XII. Efeito sobre a massa corporal das larvas de <i>Chrysomya albiceps</i> após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> . ....	59

Tabela XIII. Efeito sobre a massa corporal das larvas de <i>Chrysomya megacephala</i> após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> . ..65	65
Tabela XIV. Efeito sobre a massa corporal das larvas de <i>Chrysomya putoria</i> após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> . ..... 74	74
Tabela XV. Efeito sobre a massa corporal das larvas de <i>Cochliomyia macellaria</i> após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> . ..82	82
Tabela XVI. Efeito sobre a massa corporal das larvas de <i>Lucilia cuprina</i> após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> . ..... 89	89
Tabela XVII. Efeito sobre o peso das pupas de <i>Musca domestica</i> após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> . .....96	96
Tabela XVIII. Resumo extenso do comportamento, em forma comparativa, do efeito da aplicação tópica dose única do extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> sobre o desenvolvimento pós-embriônico de cinco espécies da família Calliphoridae ( <i>Chrysomya albiceps</i> , <i>Chrysomya megacephala</i> , <i>Chrysomya putoria</i> , <i>Cochliomyia macellaria</i> e <i>Lucilia cuprina</i> ) e a espécie <i>Musca domestica</i> (Muscidae). Indivíduos por concentração: 200. Amostra tratada independente da dose: 1200 indivíduos. .... 105	105
Tabela XIX. Resumo simplificado do comportamento, em forma comparativa, do efeito da aplicação tópica dose única do extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> sobre o desenvolvimento pós-embriônico de cinco espécies da família Calliphoridae ( <i>Chrysomya albiceps</i> , <i>Chrysomya megacephala</i> , <i>Chrysomya putoria</i> , <i>Cochliomyia macellaria</i> e <i>Lucilia cuprina</i> ) e a espécie <i>Musca domestica</i> (Muscidae). Indivíduos por concentração: 200. Amostra tratada independente da dose: 1200 indivíduos. .... 108	108

# 1 INTRODUÇÃO

Os insetos da ordem Diptera são caracterizados por possuírem duas asas e o segundo par de asas traseiras são reduzidos (foram modificados e são chamados de halteres ou balancins), ou seja, que têm apenas duas asas membranosas e não quatro como outros insetos. Esta ordem inclui animais familiares, tais como moscas, mosquitos, simulídeos, flebotomíneos, mutucas etc. Cento e vinte mil espécies foram descritas, mas são calculadas aproximadamente 240.000 (Brusca e Brusca 2003; Mavárez-Cardozo et al. 2005)

Os dípteros muscoides são responsáveis pela transmissão de enterobactérias patogênicas, vírus, fungos, helmintos e protozoários, tais como ameba e giárdia. Esses organismos são responsáveis pela maioria dos casos de diarreia em crianças, e algumas espécies de moscas podem produzir miíases. Há mais de duas centenas de bactérias e patógenos que as moscas podem transmitir, alguns dos mais comuns são: *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Shigella* sp. Estes microorganismos podem transmitir a os seres humanos e animais vários agentes etiológicos de doenças tais como: cólera, hepatite, poliomielite, tuberculose e estes patógenos podem também causar diarreia, febre entre outras. Sempre que uma mosca pousa em algum lugar, pode depositar milhares de bactérias e outros microorganismos (Greenberg 1971 e 1973).

As moscas são responsáveis por causarem ou produzirem miíases, uma infestação por larvas de moscas em tecidos humanos ou animal. As miíases cutâneas incluem doenças da pele e danos do tecido subcutâneo causado por estas larvas. Podem ser classificadas em várias formas a partir do ponto de vista clínico e entomológico. As miíases cutâneas são comuns em países tropicais das Américas do Sul e Central assim como na África do Sul, pois afetam principalmente o gado e pastores, mas também podem afetar animais de estimação, indivíduos deficientes, incapazes, pacientes em estado avançado de câncer e as pessoas que visitam áreas rurais onde habitam essas moscas. Os animais fortemente infestados mostram uma redução significativa no peso e na produção de leite, e suas peles são danificadas por perfuração, de modo que eles perdem o seu valor comercial (Zumpt 1965; Guimarães e Papavaro 1999; Sukontason et al. 2005).

Além disso, os insetos são importantes decompositores de carcaças de animais e cadáveres, assim como fungos e bactérias. Esses animais se alimentam, vivem ou se reproduzem na carcaça, dependendo de suas preferências biológicas e do estágio de decomposição. Desta forma, os dípteros muscoides apresentam grande importância na

entomologia forense, pois contribuem para uma estimativa da datação do intervalo pós-morte (IPM), que é uma técnica mais acurada utilizada em investigações médico-criminais (Benecke 2004).

Devido à grande importância destes insetos na saúde pública, houve um crescimento no interesse sobre o controle destes organismos visando buscar métodos alternativos de controle que sejam menos agressivos ao homem e ao ambiente. Os produtos mais comumente utilizados como meio de controle para os insetos sinantrópicos são inseticidas químicos (sintéticos), especialmente os organofosforados e organoclorados (Liu et al. 2000).

Até agora, o controle dessas moscas foi feito principalmente com inseticidas químicos, que são considerados muito eficazes. Mas, apresentam custos elevados, podem se tornar prejudiciais e causar danos para a população humana e a pecuária, tanto a curto, como em longo prazo, podem danificar o equilíbrio de microrganismos, assim como gerar deficiência de nutrientes. O controle químico deve ser utilizado como último recurso, uma vez que existem outras opções eficientes e menos prejudiciais para o meio ambiente, e que não danificam espécies que agem como controladores naturais (Mörner et al. 2002).

Em resposta a estes fatores, a Organização Mundial da Saúde - OMS - tem promovido nos últimos anos, a procura por novas estratégias para o controle de vetores de agentes patogênicos (Mörner et al. 2002). Um dos objetivos é a procura de inseticidas naturais, como, por exemplo, os produtos de origem vegetal, que são estáveis e de fácil extração. Várias substâncias sintéticas têm sido utilizadas como repelentes, inseticidas e inibidoras da alimentação destes insetos (Van e de Groot 1986; Vieira et al. 2001). Portanto, uma boa alternativa é o estudo de plantas por serem conhecidas como uma fonte rica de metabólitos secundários bioativos. A diversidade da flora apresenta um enorme potencial para a produção de compostos secundários. O uso de plantas para tratar doenças tem como origem as culturas indígenas e populações migrantes. Metabólitos secundários são atraentes para a indústria devido à grande aplicabilidade destes na agricultura e na saúde pública. Assim os extratos podem atuar como inseticidas, fungicidas, nematicidas, repelentes, dependendo da planta utilizada (Feinstein 1952; Mathew 2009).

Zapote (*Pouteria mammosa*), também conhecido como mamey, abricote, mamey sapote ou mata serrano é uma árvore comum em todas as regiões tropicais da América. Do talo e galhos é extraído o látex, geralmente utilizado como inseticida e frequentemente utilizado como uma camada protetora contra mosquitos. Misturado com manteiga, pode evitar infecções da pele, e

também ser utilizado no tratamento para doenças do couro cabeludo. Para a fruta foram atribuídas propriedades antibióticas, porém, é sabido que não é tolerada por todas as pessoas (Cíntia et al. 2009). Apresenta um elevado conteúdo energético sendo sugerida como complemento nutricional para pessoas enfraquecidas e convalescentes, além de ser utilizada para tratar transtornos digestivos e da visão (Stanley 1923). Na literatura não há relatos de avaliação da atividade inseticida, embora seja um dos principais usos etnobotânicos atribuídos à espécie *P. mammosa*, portanto é de grande interesse o estudo dessa atividade.

## 1.1 Caracterização morfológica da ordem Diptera

A ordem Diptera possui mais de 151.000 espécies descritas, sendo a segunda maior ordem da classe Insecta, apenas sendo menos representativa que Coleoptera (Thompson 2008; Wiegmann et al. 2011), entretanto o número atual de espécies pode ser muito maior. Essa ordem de insetos contém todas as moscas, mosquitos e mutucas de importância veterinária, se caracterizam por possuírem um par de asas funcionais. Algumas são importantes por serem ectoparasitas, enquanto em outras, são as larvas que parasitam os tecidos do hospedeiro ou por serem vetores de doenças. Todas as espécies são holometabólicas (Rafael et al. 2013). De acordo com Carvalho et al (2012), no mundo, o número de espécies desta ordem, poder chegar a aproximadamente 400 mil, com uma estimativa de 60 mil para o Brasil. E segundo Amorim 2009, atualmente o número de espécies descritas no Brasil está em torno de 8.700, sendo um total de 31.000 reconhecidas na Região Neotropical.

Os dípteros são caracterizados por possuírem um par de asas membranosas anteriores bem desenvolvidas e um segundo par reduzido, o qual é transformado em estruturas de equilíbrio chamadas de halteres ou balancins. Os adultos apresentam o corpo dividido em três segmentos cabeça, tórax e abdome. Cabeça distinta do tórax, um par de antenas, um par de olhos compostos, um a três ocelos e o aparelho bucal. Mesotórax mais desenvolvido que o pró e o metatórax. É onde estão situadas as pernas e asas membranosas. As asas membranosas apresentam as estruturas chamadas veias, as primárias chamadas de costal (C), subcostal (Sc), rádio (R), média (M), cubital (Cu) e anal (A), cujas ramificações se conectam e formam áreas denominadas células. Às vezes apresenta junto à base da asa, na parte posterior, um lobo acessório e dobrado sobre si mesmo, a caliptra (Rafael et al. 2013).

Segundo McAlpine et al. (1981), esta ordem é dividida em duas subordens: Nematocera e Brachycera. Os nematóceros são os dípteros que possuem as antenas formadas por mais de

seis artículos livremente articulados e palpos maxilares com três a cinco segmentos. Os Brachycera são os dípteros genericamente conhecidos por moscas, que se caracterizam por apresentarem corpo robusto quando comparado aos nematóceros, com antenas formadas por três segmentos, sendo o último anelado e palpos maxilares com no máximo dois segmentos (Rafael et al 2013).

A subordem Brachycera é dividida em três infraordens: Asilomorpha e Tabanomorpha que formavam a antiga subordem Ortorrhapha e a infraordem Muscomorpha que corresponde a antiga subordem Cyclorrhapha. Esta última (Muscomorpha) é dividida em duas divisões: Aschiza, as quais não apresentam ptilíneo e a sutura frontal é praticamente ausente; e Schizophora. Os adultos de Schizophora apresentam uma sutura ptilíneo e são classificados em duas seções: Calyptratae e Acalyptratae (Rafael et al 2013). Os adultos da seção Acalyptratae possuem caliptritos muito reduzidos ou simplesmente não apresentam (Serra-Freire e Mello, 2006)

A infraordem Muscomorpha é separada em duas divisões, em função da presença e/ou ausência de uma sutura localizada no mesonoto. As moscas são insetos holometabólicos, pois seu ciclo de vida é composto por três instares larvais, pupa e adulto. A duração de cada estágio varia de acordo com a temperatura, umidade e fator de agregação larval (Von-Zuben et al. 1998). As fêmeas preferem depositar os seus ovos em substratos já contendo outros ovos, caracterizando assim uma postura agregada (Esser 1990, 1991).

Von-Zuben (1998) observou que apenas 77% das fêmeas fizeram postura total, enquanto 23% fizeram postura parcial, sendo capazes de depositar seus ovos em mais de um momento. Este autor sugeriu ainda, que isso pode estar relacionado ao tipo e à quantidade de substrato oferecido, podendo estas espécies serem capazes de perceber que sua massa de ovos necessitará de uma maior quantidade de substrato para nutrir suas larvas.

Algumas horas após a ovipostura as larvas de primeiro instar eclodem, estas se alimentam vorazmente e sofrem duas ecdises até atingir o terceiro instar. Após completarem sua alimentação, estas larvas de terceiro instar (larvas maduras) abandonam a dieta em busca de um sítio de pupação, e algumas espécies como os muscídeos, pupam no resto da dieta alimentar e alguns dias depois os adultos emergem do pupário, reiniciando seu ciclo de vida (Greenberg e Szyska, 1984).

## 1.2 Família Calliphoridae: Caracterização morfológica

As moscas da família Calliphoridae apresentam distribuição mundial. Existem mais de 1000 espécies e cerca de 150 gêneros reconhecidos. Dentre essas espécies seis são espécies conhecidas: *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818), *Lucilia eximia* (Wiedemann, 1830), *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius, 1805) e *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775). Entretanto, as espécies mais conhecidas e estudadas são *C. megacephala*, *C. albiceps* e *C. putoria*. São dípteros de médio a pequeno porte, de modo geral azulados, violáceos, esverdeados ou cúpreos, com reflexos metálicos. Arista plumosa (principalmente nos 2/3 basais). Duas cerdas notopleurais. Quarta veia longitudinal (M) fortemente curvada distalmente; célula apical (R5) estreita, porém raramente fechada distalmente. Caliptra bem visível. Escudo podendo apresentar tres faixas pretas longitudinais; pós-escutelo ausente ou pouco desenvolvido (Carvalho e Mello-Patiu 2008).

Diferem dos Muscidae por apresentarem uma fila de cerdas merais e dos Sarcophagidae pela coloração metálica e por apresentarem 2 cerdas notopleurais, raramente três. Esta familia é conhecida pelas moscas varejeiras. Os gêneros *Cochliomyia*, *Lucilia* e *Chrysomya* são de importância veterinária por serem produtoras de miíases (Ahid 2009).

Os califorídeos neotropicais estão agrupados em quatro subfamílias: Mesembrinellinae, Chrysomyinae, Calliphorinae e Toxotarsinae, com aproximadamente 27 gêneros e 125 espécies (James 1970). As espécies causadoras de miíases na Região Neotropical pertencem aos gêneros: *Cochliomyia* Tonwsend, *Compsomyiosps* Townsend, *Lucilia* Robineau-Desvoidy (incluindo *Phaenicia* Robineau-Desvoidy), *Calliphora* Robineau-Desvoidy e *Chrysomya* Robineau-Desvoidy. Enfatizando que nas Américas somente *Cochliomyia hominivorax* (Cocquerel 1858) é o agente causador de miíases primárias obrigatórias, todas as outras espécies mencionadas são invasoras secundárias de ferimentos ou facultativas (Francesconi e Lupi 2012).

Os califorídeos são dípteros muscoides pertencentes a subseção Calyptratae, pois possuem uma expansão membranosa em forma de concha na base de suas asas (Guimarães e Papavero 1999; Zucchi et al. 1993). A fase imatura destes dípteros é formada por larvas do tipo vermiforme. As larvas de Calliphoridae possuem espiráculos anteriores com ranhuras em forma de brânquias; têm o corpo dividido em 12 segmentos, a maioria com anéis de espinhos pigmentados paralelos ou irregulares que podem cobrir todo o segmento ou somente uma parte. Algumas espécies de larvas apresentam placas laterais de espinhos

localizadas entre os segmentos perto da região posterior chamadas de áreas fusiformes. Os espiráculos posteriores não são aproximados nem fusionados ou situados em uma cavidade, eles são formados por um anel externo chamado peritrema, que pode ser fechado ou não, o qual ocasionalmente pode terminar ou levar a um botão; já larvas maduras apresentam três aberturas estigmáticas mais ou menos transversais (Florez e Wolff 2009). As equipes de Carvalho e Linhares (2001) descrevem que esse grupo tem preferência por estágios iniciais de decomposição.

### 1.3 Histórico da introdução do gênero *Chrysomya* (Calliphoridae) no Brasil

Espécies do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy 1830 pertencentes à família Calliphoridae, são vulgarmente conhecidas como moscas-varejeiras. Originalmente, sua distribuição compreendia o Velho Mundo, sendo introduzida no Brasil em meados da década de 1970 (Guimarães et al. 1978). Os primeiros relatos deste gênero no país foram feitos por Imbiriba et al. (1977) ao identificar *C. putoria* no Paraná - PR e por Guimarães et al. (1978) ao registrar a ocorrência de *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria* em São Paulo - SP.

Atualmente estas espécies apresentam ampla distribuição por todo o território brasileiro e o sucesso da rápida dispersão, em poucos anos, está relacionado, principalmente, à elevada capacidade adaptativa verificada nas regiões invadidas, bem como, à elevada tolerância às variações climáticas e também, ao comportamento sexual r-estrategista (Pianka 1970; Mello et al. 2007).

Até recentemente, as moscas pertencentes ao gênero *Chrysomya* estavam restritas ao Velho Mundo, onde se encontravam entre as mais abundantes e economicamente importantes. A introdução involuntária de quatro espécies desse gênero, nas últimas três décadas, no novo mundo, tem tido sucesso no estabelecimento e adaptação. *C. megacephala*, *C. albiceps* e *C. putoria* foram introduzidas em duas áreas, por volta de 1975, no Sul do Brasil. O período de 1975-76 coincidiu com êxodo de refugiados angolanos para o país, em que muitos fizeram a travessia em navios, trazendo consigo animais domésticos (Guimarães et al. 1978; Laurence 1986), desde então a dispersão pela América do Sul tem sido rápida (Mariluis 1981; Baumgartner e Greenberg, 1984; Baumgartner 1988; Wells 1991). A quarta espécie, *Chrysomya rufifacies* (Macquart, 1842), foi coletada na Costa Rica em 1978 (Jirón 1979).

Atualmente apresentam-se amplamente distribuídas pelo território brasileiro, principalmente, ao longo da costa, onde populações com alta densidade mantêm-se preferencialmente em zonas urbanas (Prado e Guimarães 1982; Carraro e Milward-de-Azevedo 1999). Mello et al. (1997) ressaltam que os fatores climáticos das regiões tropicais favoreceram o curto período de desenvolvimento destas espécies contribuindo assim, com a intensa dispersão populacional.

#### **1.4 Flutuação populacional da família Calliphoridae**

Considera-se que os principais fatores envolvidos na regulação dos eventos comportamentais, fisiológicos e bioquímicos dos dípteros muscoides estão associados às variações de temperaturas e fotoperíodos, os quais agem interferindo direto e/ou indiretamente na resposta biológica do relógio circadiano (Takeda 1997). Sabe-se que a flutuação populacional sazonal nos califorídeos (Costa et al. 1992; Ferreira et al. 1995; Vianna et al. 2004; Mello et al. 2007) é estritamente relacionada as variações de temperatura, umidade relativa do ar, fotoperíodo e intensidade de chuvas (Mello et al. 2007).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos, em diferentes condições de temperatura, com intuito de observar as respostas comportamentais das diferentes fases de desenvolvimento pós-embrionário dos califorídeos a esta variável (Byrd e Butler 1996, 1997; Queiroz 1996; Grassberger e Reiter 2001; Silva et al. 2004; Berkebile et al. 2006). Tem se observado que a taxa de desenvolvimento dos califorídeos aumenta à medida em que se eleva a temperatura, apresentando um desenvolvimento pós-embrionário mais acelerado em todas as fases de desenvolvimento (Queiroz 1996; Silva et al 2004; Berkebile et al. 2006)

#### **1.5 Importância médica veterinária dos califorídeos (Diptera: Calliphoridae)**

Recentes modificações climáticas têm ocorrido em todo o planeta com o crescente aumento de temperatura. Durante o século XX, a temperatura do planeta subiu em torno de 0,6°C, tendo essas modificações iniciado por volta de 1910. Dois principais períodos de aquecimento são relatados na literatura: entre 1910 e 1945, período das grandes guerras mundiais e desde 1976 até os dias atuais, período da grande revolução industrial (Turchetto e Vanin 2004). Há grande evidência de que o aquecimento global influencia uma variedade de organismos, havendo migração de espécies entre áreas com grande variação de latitudes, de

modo a deslocar espécies nativas (Turcheto e Vanin 2004). Assim, como consequências deste fenômeno podem ocorrer perdas de habitat, extinção de algumas espécies e/ou aumento populacional de outras, especialmente para aquelas que têm sua taxa de crescimento aumentada em condições de aquecimento, como é o caso das moscas varejeiras, o que pode trazer consequências desastrosas para a saúde pública.

Os califorídeos já foram incriminados como veiculadores de diversos patógenos. Por exemplo, *C. albiceps* já foi relatada como vetor de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Providencia* sp., *Citrobacter* sp. e *Klebsiella* sp. (Paraluppi et al. 1996); *C. megacephala* como vetor de *Aeromonas sobria*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Providencia alcalifaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter* sp., *Proteus mirabilis*, *Salmonella agona*, *Morganella* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. e *Enterobacter* sp. (Sukontason et al. 2000; Oliveira et al. 2006) e *C. putoria* como vetor de: polivírus tipos I e III, vírus *Coxsackie*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *E. coli* e *Giardia lamblia* (Furlanetto et al. 1984). Além disso, estas espécies podem causar miíases facultativas no homem e animais (Zumpt 1965; Guimarães et al. 1999; Francesconi e Lupi 2012).

A elevada capacidade disseminadora de doenças, somada à alta prevalência do gênero *Chrysomya* sp. em ambientes urbano e rural, tornam estes dípteros, grandes pragas (Guimarães et al. 2001). Portanto, estes insetos são considerados como um problema real em locais com infra-estrutura inadequada de água, esgoto e acúmulo de material orgânico em decomposição, pois se tornam criadouros naturais, ocasionando por consequência transmissão de patógenos e propagação de doenças a humanos e animais, implicando em elevados prejuízos sócio-econômicos para o país (Carvalho et al. 2005a).

Estima-se que os prejuízos econômicos em decorrência das miíases provocadas em bovinos, ovinos, equinos, caprinos e cães foram da ordem de 120 milhões de dólares nos Estados Unidos da América na década de 1960 (Baumhover 1966). Atualmente, a principal espécie, *Cochliomyia homivorax* (Coquerel 1858), responsável por perdas econômicas neste país, foi erradicada (Moya-Borja 2003). Os custos relacionados com medidas preventivas e controle na América Central e Panamá atingem cerca de 43 milhões por ano (Snow et al. 1985) No Brasil, as perdas provocadas por estas pragas têm sido calculadas nas cifras de 150 milhões de dólares por ano (Grisi et al. 2002).

### 1.5.1 *Chrysomya albiceps*

Mosca de cor verde metálica, com espiráculo mesotorácico branco. Suas larvas apresentam uma fileira de tubérculos que contém pequenas cerdas apicais e escamas na base que não são pigmentadas. Seu espiráculo posterior tem peritrema aberto e pigmentado. Dependendo da temperatura, as larvas eclodem entre 24-36 horas e as larvas inicialmente se alimentam de exsudatos da carne fresca decomposta, porém no segundo e terceiro instares, podem se tornar predadores ou mesmo canibais. É considerado um útil indicador forense (Oliveira-Costa 2003).

De acordo com Queiroz et al. 1997, as larvas de *C. albiceps* são descritas da seguinte forma: primeiro instar (L1): os segmentos de 2 a 8 apresentam anel de espinhos completo; 9 a 12 com espinhos por  $\frac{1}{4}$  do segmento. Espiráculos posteriores com peritrema aberto. Esqueleto cefalofaríngeo inferior a 3 mm de comprimento e levemente pigmentado. Segundo instar (L2): os segmentos 2 a 5 com anel de espinhos completo, 6 a 12 com espinhos somente por  $\frac{1}{2}$  do segmento, os segmentos de 5 a 11 com linhas de tubérculos nas regiões dorsal e lateral localizado no centro do segmento; os segmentos de 6 a 11 apresentam alguns tubérculos pequenos ventralmente. Peritrema aberto. Esqueleto cefalofaríngeo com diafragma tentorial completo; o 10º segmento com espinhos por  $\frac{3}{4}$  do segmento, algumas vezes completo; 11º segmento com anel por  $\frac{1}{2}$  do segmento e o 12º segmento incompleto. Parte posterior dos segmentos 5 a 8 com áreas fusiformes e com mandíbula em gancho. Terceiro instar (L3): os segmentos 3 a 12 com linhas de tubérculos conspícuos dorsalmente; 3º e 4º segmentos com tubérculos menores e o tubérculo ventral de menor tamanho; do 2º ao 4º segmentos com anel de espinho completo, espiráculos posteriores com peritrema incompleto muito pigmentado e o botão imperceptível. Cornos dorsal e ventral de comprimentos iguais. Segmento caudal com tubérculos fortemente pronunciados (Flores e Wollf 2009) (Figura 1).

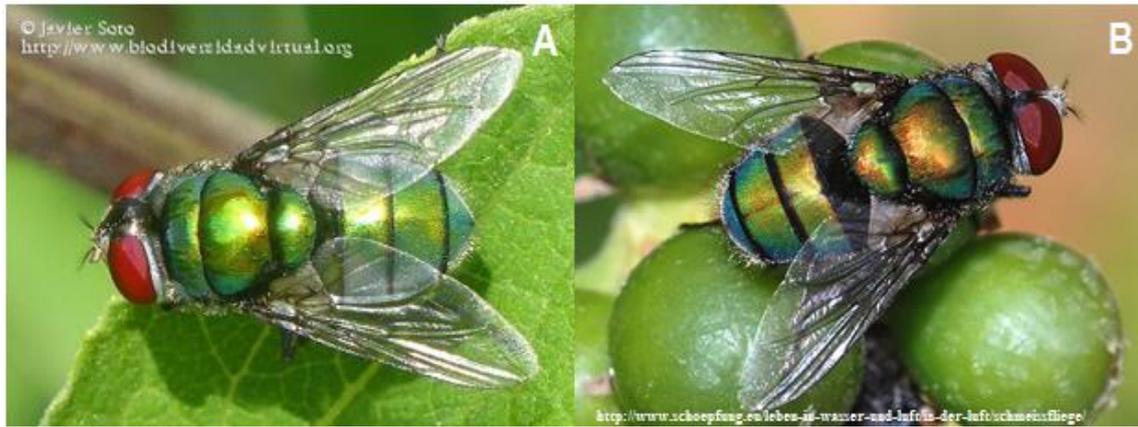


Figura 1. Vista dorsal dos adultos de *Chrysomya albiceps* evidenciando a posição dos olhos utilizada na caracterização sexual. A: Fêmea caracterizada por apresentar olhos dicópticos, (separados da linha média do corpo em vista dorsal). B: Macho caracterizado por apresentar olhos holópticos, (próximos da linha média do corpo na vista dorsal).

### 1.5.2 *Chrysomya megacephala*

A espécie *C. megacephala* se distingue das outras espécies do mesmo gênero, por apresentar um conjunto de características de difícil visualização (Guimarães et al. 1978). De acordo com Ribeiro e Carvalho (2000) e Carvalho de Souza (2006), os adultos apresentam uma coloração azul esverdeada podendo ser violácea metálica, de corpo alongado, medindo entre 6 e 11 mm. Apresenta o espiráculo anterior acastanhado, as antenas com arista plumosa e as genas vermelhas-acastanhadas, além destas características, os olhos dos machos apresentam uma área definida de pequenos omatídeos inferiores (Figura 2).



Figura 2. Vista dorsal dos adultos de *Chrysomya megacephala* evidenciando a posição dos olhos utilizada na caracterização sexual. A: Fêmea caracterizada por apresentar olhos dicópticos, (separados da linha média do corpo em vista dorsal). B: Macho caracterizado por apresentar olhos holópticos, (próximos da linha média do corpo na vista dorsal).

As larvas apresentam o corpo vermiforme, de coloração branca a amarelada, medindo entre 12 e 18 mm (em média 14 mm). O tórax é composto por três segmentos, onde, no protórax, está localizado o espiráculo anterior. No abdômen, compostos por oito segmentos, o espiráculo posterior encontra-se no último segmento. Este espiráculo é grande e as aberturas espiraculares são curtas, além de o peritrema apresentar-se grosso e incompleto (Ribeiro e Carvalho 2000; Pujol-Luz e Santana 2004; Carvalho de Souza 2006).

### 1.5.3 *Chrysomya putoria*

*Chrysomya putoria* foi introduzida na América Latina (Guimarães et al. 1978), porém é nativa da África, com habitat da Tânzania ao Congo (Zumpt 1965), *C. putoria* seria idêntica a *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann 1818). De acordo com Zumpt (1965), as terminálias do macho de *C. chloropyga* e *C. putoria* são idênticas, mas Paterson (1977) atribuiu diferenças morfológicas nas formas estruturais do cerco, harpes e nos segmentos pré-genitais. Laurence (1988) realizou estudos com *C. putoria* e relatou na discussão de seus estudos que corrobora as conclusões de Paterson (1977) e ainda que *C. chloropyga* e *C. putoria* representam duas espécies distintas, onde cada uma delas ocupa nichos ecológicos também distintos. Recentemente Wells et al. (2004) confirmaram a parafilia dessas duas espécies confirmando assim que são duas espécies diferentes (Figura 3).



Figura 3. Vista dorsal dos adultos de *Chrysomya putoria* evidenciando a posição dos olhos utilizada na caracterização sexual. A: Fêmea caracterizada por apresentar olhos dicópticos, (separados da linha média do corpo em vista dorsal). B: Macho caracterizado por apresentar olhos holópticos, (próximos da linha média do corpo na vista dorsal).

Tendo importância médica e veterinária por ser vetor mecânico de agentes patogênicos (Greenberg 1971 e 1973), também é mencionada como produtora de miíases secundárias no homem e nos animais domésticos. Em nível de descrição taxonômica a *C. putoria*, pertence à família Calliphoridae, subfamília Chrysomyinae e as estruturas chaves para identificação são as cerdas pró-pleuras e a cerda estigmática que se localizam na lateral do tórax do inseto (Carvalho e Ribeiro 2000).

#### 1.5.4 *Cochliomyia macellaria*

O gênero *Cochliomyia* inclui a “mosca da bicheira”, “vareja” ou “mosca varejeira”. Califorídeos de tamanho médio, cor verde-metálico ou azul esverdeado. Cabeça, com palpos e antenas amarela ou alaranjada, palpos filiformes. Asas hialinas, nervura basicosta de cor preta e sem pêlos na base (Figura 4). Escudo com três faixas pretas longitudinais bem visíveis. Existem 5 espécies, duas das quais são causadoras de miíases no homem e animais: *C. macellaria* e *C. hominivorax*, que devem ser diferenciadas por chaves dicotômicas segundo Guimaraes e Papavero 1999 e Guimarães et al 2001.

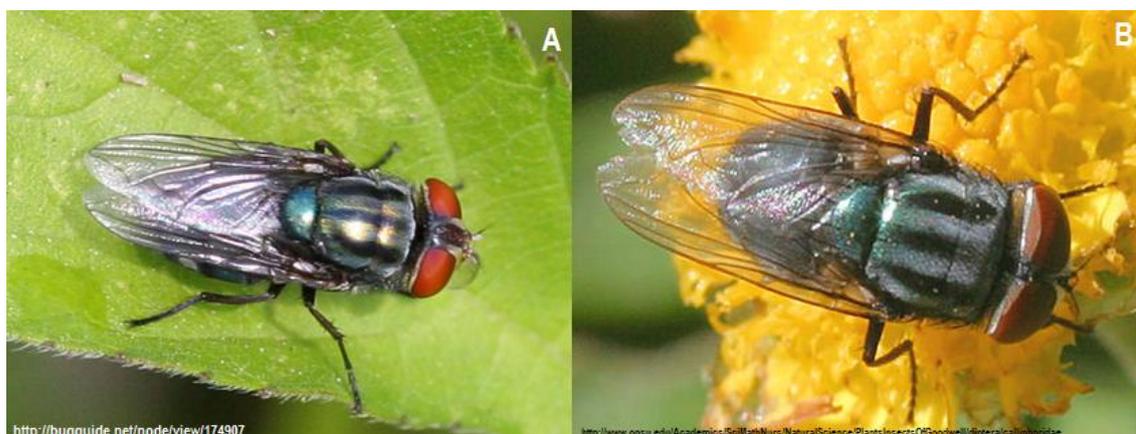


Figura 4. Vista dorsal dos adultos de *Cochliomyia macellaria* evidenciando a posição dos olhos utilizada na caracterização sexual. A: Fêmea caracterizada por apresentar olhos dicópticos, (separados da linha média do corpo em vista dorsal). B: Macho caracterizado por apresentar olhos holópticos, (próximos da linha média do corpo na vista dorsal).

*Cochliomyia macellaria* é uma espécie autóctone do Brasil, vulgarmente conhecido como mosca-varejeira. Sua distribuição é restrita às Américas, ocorrendo tanto na região neotropical como na neártica, desde a Patagônia até o sul do Canadá incluindo as ilhas Galápagos e Antilhas (Ferreira 1983; Baumgartner e Greenberg 1985). É uma das principais

espécies causadoras de miíases secundárias no Brasil, feridas conhecidas popularmente como bicheiras, contribuindo assim para agravar um quadro infeccioso já estabelecido (Gomes et al. 2000) sendo também reconhecida como veiculadora de ovos de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr. 1781) responsável pela miíase furuncular cutânea (Moya-Borja 2003).

Após a introdução do gênero exótico *Chrysomya* (Robineau-Desvoidy 1830) no Brasil, a espécie *C. macellaria*, antes muito comum nas áreas urbanas e rurais, vem tornando-se rara nesses ambientes (Guimarães et al. 1978; Marinho et al. 2003). Diversos estudos sugerem que esta queda se deve à competição durante a fase imatura com espécies desse gênero exótico (Aguiar-Coelho e Milward-de-Azevedo 1996). Os adultos de *C. macellaria* são atraídos por vários substratos para alimentação ou postura como resíduos de origem humana e animal, carcaças, entre outros. Neste sentido esta espécie tem sido implicada como veiculadora mecânica de enteropatógenos em humanos (Thyssen et al. 2004; Graczyk et al. 2005; Ribeiro et al. 2011) e em animais (Greenberg 1971).

## **1.6 Subfamília Calliphorinae**

De acordo com Mello (2003), a subfamília Calliphorinae engloba gêneros e espécies que não se comportam tipicamente como moscas varejeiras na América do Sul. No entanto as larvas de *Lucilia eximia* (Wiedemann, 1819), *L. cuprina* e *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) se alimentam de tecido necrosado (Ahid 2009) Waterhouse e Paramonov 1950 relatam em seus estudos que a espécie *L. cuprina* é considerada como potencial produtora de miíases em ovinos na Austrália, sendo responsável por cerca de 60 a 90% dos casos de miíases e mais de 90% na África do Sul, se tornando um problema de saúde.

Carvalho e Ribeiro 2000 referem que Hall e Wall 1995; Stevens e Wall 1996 relataram em sus publicações que todas as espécies que anteriormente eram tratadas como *Phaenicia* Robineau-Desvoidy, são sinônimas do gênero *Lucilia* Robineau-Desvoidy sendo o último o que está valendo.

### **1.6.1 *Lucilia cuprina***

Estudos prévios sugerem que a espécie *L. cuprina* teve sua origem na região afro-tropical e oriental. Atualmente, encontra-se difundida em diferentes habitats por todo o mundo

devido a padrões de movimentos naturais e dispersão artificial através de humanos e da pecuária (Stevens e Wall 1997; Paes et al. 2005).

Esta espécie é caracterizada por apresentar coloração metálica com reflexos acobreados, genitália bem desenvolvida, frontália enegrecida e triângulo ocelar que possui dois pares de cerdas ocelares (Mello 1961 e 2003). De acordo com Oliveira-Costa e Queiroz (2007), o tamanho médio da mosca adulta varia de 8,0 a 10,0 mm (Figura 5).

Segundo Linhares 1981; Ferreira e Lacerda 1993 os representantes do gênero *Lucilia*, na fase adulta, são encontrados em lixos urbanos, frutos caídos e néctar de flores (Mariconi et al. 1999). *L. cuprina* é responsável pela transmissão de microorganismos patogênicos, sendo encontrada também em carcaças e fezes de animais e mantém alto grau de sinantropia (associação com ambientes modificados pelo homem). Dessa forma, assim como o gênero *Chrysomya*, esse gênero também possui grande importância na saúde pública.

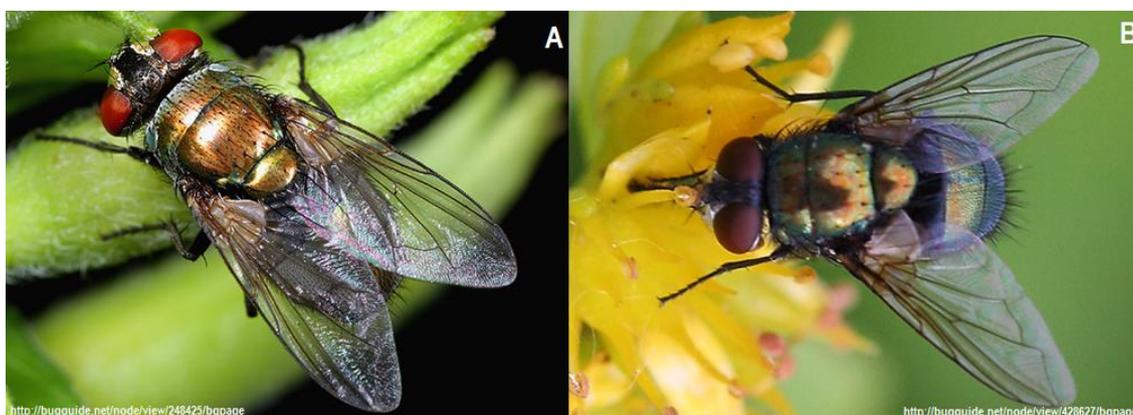


Figura 5. Vista dorsal dos adultos de *Lucilia cuprina* evidenciando a posição dos olhos utilizada na caracterização sexual. A: Fêmea caracterizada por apresentar olhos dicópticos, (separados da linha média do corpo em vista dorsal). B: Macho caracterizado por apresentar olhos holópticos, (próximos da linha média do corpo na vista dorsal).

### 1.7 Família Muscidae (CALYPTRATAE: MUSCIDAЕ)

Inclui moscas de tamanho médio, corpo cinza a amarelo escuro, algumas de cor azul a verde metálica. Compreendem os gêneros de aparelho bucal funcional, quatro faixas negras no mesonoto. Quarta nervura longitudinal da asa recurvada formando um cotovelo, em ângulo reto. M1 geralmente curvada para a margem anterior da asa. Arista nua ou plumosa. Três estágios larvares, sendo que a larva é vermiforme e geralmente é esbranquiçada. Possui reflexos amarelados no abdome. A larva, na extremidade anterior possui ganchos (para captar alimentos)

e na posterior possui estigmas respiratórios com 1, 2 ou 3 aberturas, de acordo com a fase larvar (L1, L2, L3).

De acordo com Serra-Freire e Mello 2006, a família apresenta uma subfamília Muscinae com os gêneros de interesse a *M. domestica* (mosca doméstica), *Stomoxys calcitrans* (mosca-dos-estábulo) e *Haematobia irritans* (mosca-dos-chifres).

### **1.7.1 *Musca domestica*. Características**

*Musca domestica*, é uma espécie cosmopolita que teve sua dispersão e distribuição pelo mundo favorecida pela capacidade da espécie em se adaptar às transformações do ambiente natural causadas pelo homem e à habilidade de proliferar tanto no meio urbano quanto no meio rural. Nas cidades, a mosca doméstica infesta residências e locais de trabalho, causando incômodos e danos para a população, enquanto que no meio rural atua como vetor biológico e mecânico de uma série de agentes patogênicos, além de funcionar como forético para os ovos de *Dermatobia hominis*.

*Musca domestica* apresenta alta sinantropia e tem sido apontada como responsável pela transmissão de mais de 60 categorias de patógenos para o homem, animais domésticos e silvestres e por isso, é uma espécie de grande interesse médico-sanitário. Sua ocorrência, distribuição e predominância nas áreas urbanas e rurais são favorecidas pela capacidade de se desenvolver em quase todos os tipos de matéria orgânica em fermentação. Não são parasitos obrigatórios, mas se nutrem de secreções e são atraídos por feridas (Ahid 2009).

Os adultos de *M. domestica* apresentam grande capacidade de vôo e têm hábitos diurnos, procurando locais bem iluminados e quentes para se estabelecerem. A mosca doméstica é atraída tanto pelo lixo e esterco, bem como pelo leite, substâncias açucaradas, frutas e outros alimentos humanos, sendo um inseto comensal que frequenta uma série de substratos como carniças, secreções biológicas e fezes, acaba por contaminar a água e o alimento, que muitas vezes são consumidos pelo homem. Tem importância como: transporte forético de microorganismos que levam à febre tifóide, desintéria, cólera e mastite bovina, e de protozoários como *Entamoeba*, *Giardia* e helmintos como *Taenia sp* e *Dipylidium*. É também veiculadora de ovos de *D. hominis*. Hospedeiro intermediário de endoparasitos como *Habronema* em cavalos e *Raillietina* em aves (Ahid 2009).

Aos animais domésticos, sejam aves ou mamíferos, a mosca doméstica é incriminada na transmissão de vírus e bactérias, além de atuar como vetor intermediário de *Habronema muscae* e *Habronema megastona* (Rudolphi, 1819), helmintos intestinais de equinos, em cujas fezes são eliminados os ovos (Carreira 1991).

De acordo com Serra-Freire e Mello 2006, os adultos de *M. domestica* apresentam tórax com coloração cinza-amarelado a cinza-escuro e quatro faixas longitudinais negras no mesotono; 4 a veia longitudinal alar (M1+2) curvada, formando cotovelo; abdômen amarelado com uma faixa mediana longitudinal dorsal negra. A diferenciação sexual entre os adultos se faz de forma simples e rápida através dos olhos, uma vez que os machos apresentam olhos holópticos, isso é se apresentam bem próximos em vista dorsal, enquanto que nas fêmeas, os olhos são dicópticos, se apresentam separados em vista dorsal (Figura 6).

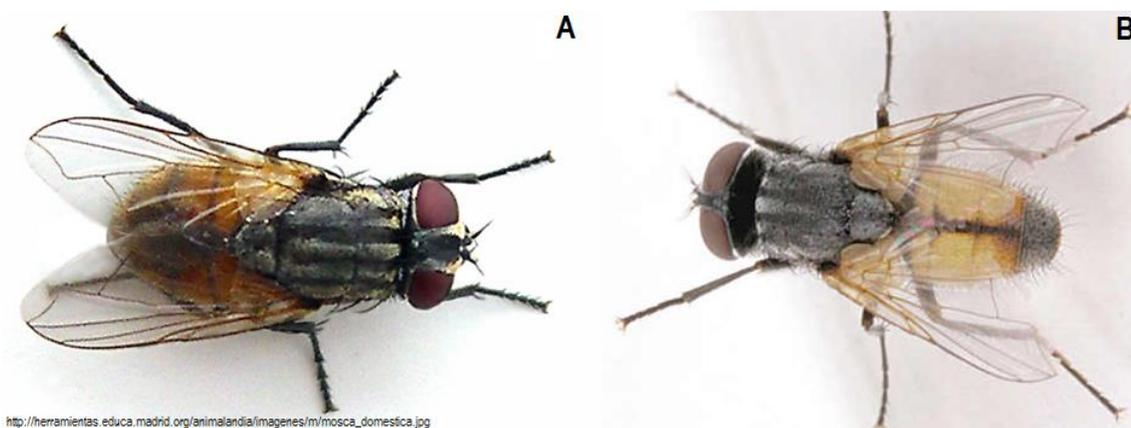


Figura 6. Vista dorsal dos adultos de *Musca domestica* evidenciando a posição dos olhos utilizada na caracterização sexual. A: Fêmea caracterizada por apresentar olhos dicópticos, (separados da linha média do corpo em vista dorsal). B: Macho caracterizado por apresentar olhos holópticos, (próximos da linha média do corpo na vista dorsal).

Com relação ao ciclo biológico, cada fêmea de *M. domestica* é capaz de depositar, em média, 120 ovos a cada postura, sendo que esta se repete cerca de seis vezes durante a sua vida, cuja duração oscila entre 15 e 70 dias. O acasalamento e as posturas ocorrem de três a 20 dias após a emergência do adulto e nas regiões tropicais se verifica um grande número de gerações anuais.

De acordo com a temperatura, o desenvolvimento embrionário e a consequente eclosão das larvas ocorrem entre oito e 24 horas e o desenvolvimento larval se dá em matéria orgânica

fermentada. As larvas passam por duas ecdises e se verifica a presença de três instares larvais que se processam entre três e sete dias. Pouco antes de completar seu estágio larval, as larvas param de se alimentar e tendem a abandonar o local de criação, entretanto a maioria não abandona o substrato alimentar, pupando neste e as que abandonaram enterram-se no solo ou outro substrato para passarem a forma de pupa. Após um período de três a seis dias, em temperaturas ambiente elevadas, a mosca adulta emerge do pupário se utilizando da bolsa ptilinal (Brito et al. 2008). Nos meses de temperaturas mais amenas, o período pupal pode se prolongar por várias semanas. O ciclo completo de ovo a adulto dura em média de dez a 14 dias.

## **1.8 Controle de insetos**

O uso de inseticidas é uma das principais técnicas utilizadas no controle de pragas e vetores e seu uso foi o que permitiu alguns dos principais avanços na agricultura e no controle de doenças como a malária, tifo e a febre amarela (Van Emden e Peakall 1996). Os métodos de controle de insetos mais empregados se classificam em químicos e alternativos.

Quando se compara a qualidade de inseticidas sintéticos com os naturais, nota-se que os naturais apresentam inúmeras vantagens, podendo citar a sua obtenção, que é feita através de recursos renováveis, além de sua rápida degradação (Vieira et al. 2001), diminuindo a probabilidade de gerar resistência por parte do inseto (Roel 2001). Mesmo com esses benefícios, os inseticidas botânicos precisam ser utilizados com a mesma precaução que os compostos químicos (Brechelt 2004).

### **1.8.1 Controle químico**

Os inseticidas químicos de origem sintética surgiram em meados da década de 1940. Atuam no sistema nervoso dos insetos causando sua morte (Buss e Park-Brown 2006). É o meio de controle mais utilizado para dípteros sinantrópicos, constituído principalmente por organoclorados e organofosforados (Vieira et al. 2001). Estes possuem diversas propriedades que os tornavam próprios para o uso em grande escala, como baixo custo de produção, longa ação residual e a toxicidade para um amplo espectro de pragas e vetores (Sethajintanin e Anderson 2006), sendo o Brasil, o maior produtor e consumidor de pesticidas na América Latina (Roel 2001).

O uso de inseticidas químicos (sintéticos) para o controle de insetos é perigoso, afetando especificamente o homem e outros animais, podendo poluir o ar, a água e a cadeia alimentar (Mendonça et al. 2011). São tóxicos tanto para animais vertebrados quanto para insetos polinizadores (Aktar et al. 2009). Devido à alta lipossolubilidade que apresentam, os compostos clorados são biocumulativos, ficando retidos no tecido vivo (FUNASA 2001; Ritter et al. 1995). Concentram-se em tecidos e fluidos animais com alta quantidade na gordura como a carne, o leite e seus derivados (Klaassen e Rozmam 1991), podendo gerar danos toxicológicos à população humana e a animais domésticos, tanto a curto quanto em longo prazo (Eyer et al. 2004; Faria 2003).

Vários estudos realizados na América Latina observaram que a acumulação de organoclorados no sangue, tecido adiposo e leite materno são muito superiores aos níveis observados nos países desenvolvidos (Carvalho 1991).

Dentre as vantagens dos inseticidas, destacam-se: ação rápida; único método de controle prático quando a população de insetos causa danos econômicos a um cultivo comercial; disponíveis numa variedade de propriedades; efetivos contra várias espécies e métodos de aplicação; relativamente baratos (Kuramoto e Shimazu 1997).

O uso excessivo desses tipos de inseticidas também resultou em uma progressiva resistência das pragas a esses químicos, diminuindo sua efetividade e gerando consequências com potenciais negativos, como o aumento da frequência de uso, da dose e de misturas com compostos mais tóxicos (Hemingway e Ranson 2000). Perdem sua efetividade à medida em que as populações-alvo adquirem resistência genética contra seus compostos (Gullan e Cranston 2007). Entre os anos de 1914 a 2007, dos 7740 casos relatados de resistência a inseticidas, a ordem Diptera esteve presente em 2265 (Whalon et al. 2008).

A resistência está estendida por todo o mundo e afeta a maioria das classes químicas disponíveis. Há referências de resistência de *M. domestica* a organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, benzoilureas, ciromazina, neonicotinoides (imidacloprid, tiametoxam), fenilpirazois (fipronil), avermectinas, espinosades, etc. É certo que a resistência às classes químicas mais modernas (neonicotinoides, fenilpirazoles, spinosad etc.) é relativamente pouco frequente, pois estes compostos não têm sido muito utilizados (Campbell et al. 1997).

As populações multirresistentes aumentam cada vez mais. Estas são resistentes simultaneamente a mais de uma classe química (ex. organofosforados, carbamatos e piretroides ao mesmo tempo) (Brindley e Selim 1984).

O desenvolvimento de resistência em várias espécies de pragas e vetores, com baixa especificidade, aliado ao impacto ambiental, elevada toxicidade para vertebrados e o alto custo e eficiência questionável dos inseticidas sintéticos de última geração, demonstraram que o controle de vetores com o uso exclusivo desse tipo de inseticida não garantiria sua eficiência. Como resposta a esses fatores limitantes, a OMS tem incentivado, nos últimos anos, a busca de novas estratégias de controle de insetos vetores de agentes etiológicos causadores de doenças humanas, dos animais domésticos e silvestres (Mörner et al. 2002).

Todo o exposto até agora incrementa o interesse pelos inseticidas alternativos (Almeida e Batista Filho 2001). Segundo a FUNASA (2001), o controle químico deve ser utilizado como última alternativa, uma vez que existem outras formas mais eficazes e menos agressivas ao meio ambiente.

### **1.8.2 Controle botânico**

Algumas substâncias naturais extraídas de plantas apresentam propriedades repelentes frente a insetos, impedindo sua alimentação. Apresentam componentes tóxicos que impedem o desenvolvimento dos insetos (Feinstein 1952; Cabral et al. 2007a; Mendonça et al. 2011), além de apresentarem hormônios e anti-hormônios que podem ser úteis à proteção de plantas agrícolas de pragas e controle de vetores causadores de doenças (Bowers 1984; Bell et al. 1990).

Apesar deste amplo conhecimento, o conjunto de produtos de controle de pragas obtidos diretamente das plantas, isto é, os inseticidas botânicos, estão em uso somente em países desenvolvidos. As plantas representam uma variedade de produtos naturais potencialmente úteis e de fato, muitos laboratórios mundiais têm pesquisado milhares de espécies de plantas superiores, não só em busca de produtos farmacêuticos, mas também para o controle de pragas (Cabral et al. 2008).

São produtos de metabolismo secundário destas plantas, segundo Coley e Barone (1996) e Catehouse (2002), estes metabólitos estão relacionados ao mecanismo de defesa quando associados às plantas (Coley e Barone 1996; Cathouse 2002). Rattan (2010) cita diversas classes de substâncias químicas com atividades inseticidas e diferentes fontes botânicas, como a nicotina, a azadiractina, o timol, silfinenos, rianodinas, sabadilhas e a piretrina. Destas, vários compostos já tiveram sua eficácia testada e comprovada em *M. domestica* (Pohlit et al. 2011) e diversos inseticidas comerciais já foram elaborados e têm tido seu uso aumentado ao passar dos

anos, como por exemplo, o óleo de Nim, extraído de *Melia azedarach* L. que é considerada uma das plantas com atividade inseticida mais importante (Brunherotto e Vendramim 2001). Essas substâncias apresentam uma variada gama de atividades biológicas nesses insetos assim como atividade sinérgica (Bell et al. 1990) como a azadiractina que apresenta efeitos endócrinos, tóxicos (Mordue e Blackell 1993) e inibidores de alimentação (Dethier 1982), os rianoides, que causam paralisia imediatamente após a aplicação (Fill e Coronado 1988) e as sabadilhas, que matam por perdas das funções nervosas (Cloyd 2004).

Através de estudos sobre os mecanismos de defesa das plantas, vem se desenvolvendo novos inseticidas que atendam ao requisito de eficácia, segurança e seletividade (Viegas Júnior 2003). O piretro, por exemplo, é um dos inseticidas botânico mais utilizado. O mecanismo de ação das piretrinas são qualitativamente similar ao DDT e muitos inseticidas organoclorados sintéticos, são moderadamente tóxicos para mamíferos (DL<sub>50</sub> aguda oral em ratos vão de 350 a 500 mg/kg) (Isman 2005).

No ano de 1996 foi avaliado o efeito inseticida de uma lectina, obtida a partir de sementes de *Ricinus communis* (higuereta), sobre moscas domésticas provenientes de San José de las Lajas, Cuba. Os ensaios foram realizados com larvas e adultos. Foi observado aumento da mortalidade em função do aumento do tempo de exposição frente ao extrato, a DL<sub>50</sub> após 72 h de exposição foi de 353,4 ppm. Além disso, houve uma diminuição altamente significativa no desenvolvimento pupal na presença do extrato, o que representa sua atividade inseticida (Álvarez et al. 1996).

Ferreira em 2009 investigou a bioatividade de extratos de *Rheedia xanthochymus*, *Garcinia longifolia*, *Plumbago scandens*, *Hovenia dulcis*, *Euphorbia tirucalli* L., *Nerium oleander* e *Malpighia glaba* em ovos de *Anocentor nitens* (Neumann, 1897). Esta espécie é um ectoparasita, o hospedeiro principal são os equinos. As fêmeas grávidas de *A. nitens* foram coletadas de cavalos (*Equus caballus* Linnaeus, 1758). Os resultados de *A. nitens* mostraram que *M. glaba* foi mais efetiva na actividade ovicida. *H. dulcis*, *E. tirucalli* L., *R. xanthochymus*, *G. longifolia*, *P. scandens* geraram ovos inviáveis de *A. nitens* em 98,9, 98,4, 97,4, 96,0 y 93,2 %, respectivamente. O extrato de *Nerium oleander* apresentou o menor efeito ovicida 84,9 % (Ferreira 2009).

Dois tipos de inseticidas botânicos podem ser obtidos a partir de sementes da árvore de Margosa índia a *Azadirachta indica* (Meliaceae). O azeite de nim, obtido por prensagem de sementes, são eficazes contra insetos e ácaros de corpo macio, mas também são úteis no

controle de fitopatógenos. Além dos efeitos físicos do azeite de nim sobre pragas e fungos, provavelmente contribuem a bioatividade que se refere a resina oleosa extraída das flores secas de piretro margarita, *Tanacetum cinerariaefolium* (Asteraceae) (Schmutterer 2002). Os extratos de sementes de *Melia azedarach* e sua actividade contra *M. domestica*, foram avaliadas em 2008, onde os bioensaios mostraram inibição no desenvolvimento pós-embriónico da mosca e aumento significativo no período larva-adulto. Além disso, o peso da pupa foi reduzido e a proporção de sexos alterados (Cabral et al 2008).

Leyva et al. 2008 utilizaram óleos essenciais das espécies botânicas *Eugenia melanadenia* (Myrtales: Myrtaceae); *Psidium rotundatum* Griseb (Myrtales: Myrtaceae) e *Piper aduncum* (Piperales: Piperaceae) na determinação de potencial atividade inseticida. Foram preparadas várias concentrações de cada óleo para avaliar a mortalidade, entre 10 e 100 %, aplicando 1 µL no tórax, para *E. melanadenia* foi obtido valores de  $DL_{50}= 0,21$  % e  $DL_{95}= 1,33$  % e regressão linear  $y= 4,82 + 2,05x$ . Os valores das doses letais ( $DL_{50}$  e  $DL_{95}$ ) para o óleo de *P. rotundatum* corresponderam a 0,18 e 2,4 % respectivamente e o óleo de *P. aduncum* mostrou  $DL_{50}= 0,04$  % e  $DL_{95}= 0,33$  % respectivamente (Leyva et al. 2008).

Abdel et al. 2009 revelaram que os óleos voláteis botânicos utilizados (pilar de oro, *Cupressus macrocarpa* e *Alpinia galanga officinarum*), têm efeitos morfogênicos contra as etapas de desenvolvimento de *Synthesiomyia nudiseta* (Wulp, 1883). Estes incluem estados deformes intermediários de pupa-adulto, adultos deformados com asas enrugadas e/ou deformidade torácica e abdominal. Alguns adultos não emergiram e se mantiveram na pupa. Os efeitos histológicos induzidos pelo tratamento com óleos na parede do corpo foram degeneração e desprendimento da hipoderme. Os efeitos histopatológicos que apareceram no intestino médio foram contração em algumas células e inflamação de outras células epiteliais (Abdel et al. 2009).

Fathy (2009) avaliou o efeito inseticida de feno-grego (*Trigonella foenum-graecum*), aipo (*Apium graveolens*), rabanete (*Raphanus sativus*) e mostarda (*Brassica compestris*) nos 3 estágios larvais de *L. sericata*, pela primeira vez, através de ensaios de ingestão. Os valores da  $DL_{50}$  foram de 2,81; 4,60; 6,93 e 7,92 % para o feno-grego, o aipo, o rabanete e a mostarda, respectivamente. A taxa de pupas diminuiu fortemente após tratamento com 16 % feno-grego e aipo. A emergência de adultos foi suprimida depois do tratamento das larvas com 8% de mostarda, 12% de rabanete, e 16% de feno-grego e aipo. Os resultados sugerem que os óleos representam novos e seguros potenciais inseticidas para o controle de *L. sericata* (Fathy 2009).

Urzúa em 2010 analisou por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (GC/EM) a composição dos óleos essenciais, procedentes da destilação aquosa das folhas frescas de *Haplopappus foliosus* e *Bahia ambrosoides*. A atividade inseticida de cada óleo foi avaliada contra *M. domestica*, sendo o óleo essencial de *H. foliosus* inseticida mais potente, o qual é promissor como inseticida natural contra as moscas domésticas (Urzúa 2010).

Nas investigações realizadas por Mendonça em 2011 a atividade do látex liofilizado de *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (Apocynaceae) no desenvolvimento pós-embriônico de *C. megacephala* (F) relataram que larvas tratadas com 1,0% de látex apresentaram um período mais curto de desenvolvimento pós-embriônico, no entanto, larvas tratadas com 3,0% de látex induziu um aumento deste período. A viabilidade (53%) foi também muito baixa para o período de neolarva a adulto quando tratadas com 3,0% de látex, o que indica que este látex de *P. amapa* em altas concentrações poderia afetar o desenvolvimento de *C. megacephala*.

Remón et al. 2012 realizaram uma triagem fitoquímica e determinaram a atividade antibacteriana dos extratos secos da tintura a 20% das folhas e cascas do caule de *Mammea americana* L. Foram coletadas folhas e cascas do caule da planta objeto de estudo, que foram lavadas, desinfetadas, secas e pulverizadas. Após foi elaborado as tinturas a 20% pelo método de maceração. Foi comprovada a existência de uma alta diversidade de metabólitos secundários, com predomínio de alcaloides, cumarinas, fenois ou taninos, quinonas e flavonoides. Os extratos secos mostraram atividade antibacteriana *in vitro* frente à cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC) (Remón et al. 2012).

### **1.8.3 Controle biológico**

O controle biológico é um processo no qual as populações existentes e ecossistemas são regulados (mantendo dentro dos limites máximo e mínimo), devido à ação de inimigos naturais (Debach e Rosen, 1991). A utilização de microrganismos para o controle de insetos não é um método novo, foi utilizado principalmente a partir da década de 1970, por problemas provocados pela utilização de inseticidas químicos (Azevedo 1998).

Segundo FUNASA (2001), existem dois tipos de controle biológico, o natural, quando é feito através de inimigos naturais específicos sem a intervenção do homem e o artificial, que ocorre quando há interferência humana.

O processo de seleção e produção em grande escala destes inimigos naturais pelo homem permitiu o controle de pragas em ecossistemas agrícolas. Os inimigos naturais mais utilizados como praguicidas biológicos são microrganismos como: bactérias, fungos, vírus, parasitas de insetos como vespas. O controle biológico de pragas melhora a qualidade dos produtos, reduzem a contaminação ambiental e contribuem para a conservação dos recursos naturais. É uma ferramenta importante para sustentabilidade na agricultura (Van e Bellows 1996).

Uma das espécies alternativas de controle, utilizados de forma limitada, constituem fungos que afetam as larvas e as moscas adultas. Um exemplo deste grupo de fungos a constitui *Entomophthora* (Legner 1995). Por outro lado, Geden et al. (1995) sugerem que *Beauveria bassiana* pode ser combatida com condições de produção de sistemas agrícolas e animais, os quais são candidatos para o controle biológico de moscas domésticas, o mesmo para *Metarhizium anisopliae*, que é patógeno para este inseto (Barson et al. 1994). A infecção do fungo entomopatógeno sobre os seus hospedeiros se realiza quando o conídio fica em contato com o tegumento do inseto (Rivera et al. 2003). Os fungos são os mais frequentemente encontrados atacando insetos, e acredita-se que eles sejam os responsáveis por aproximadamente 80% das doenças de insetos (Coutinho 1996).

Atualmente, são conhecidas em torno de 700 espécies de fungos entomopatogênicos (Azevedo 1998). Eles contaminam os insetos penetrando principalmente pelo tegumento, mas podem agir por via oral, anal, dentre outras (Gallos et al. 2002). Um problema para este tipo de controle é o fato dos inimigos biológicos serem espécies vivas e apresentarem oscilações em sua população, tornando-se necessário, na maior parte do tempo, a participação humana nesse processo (FUNASA 2001).

No mercado atual já se tem formulações comerciais a base de fungos em vários países. Dentre elas, seis formulações a base do fungo *M. anisopliae*, tais como: Biomex, Biocontrol, Combio, Metabiol, Metapol e Metaquino, no Brasil e Alemanha. Estes consideraram o potencial de utilizar *M. anisopliae* no programa de controle biológico (Rhodes 1993).

De acordo Azevedo (1998), tanto as bactérias que esporulam quanto as que não, podem infectar um inseto. Elas contaminam preferencialmente por via oral e uma vez dentro do inseto alvo, elas se multiplicam liberando toxinas e levando a morte do mesmo. As bactérias entomopatógenas, particularmente as do gênero *Bacillus*, especificamente

*Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* constituem alternativa de controle (Hodgman et al. 1993; Ignoffo e Gard 1970).

Apesar de muito escassos, relatos relacionados com bactérias com atividade tóxica à *M. domestica* são encontrados, como por exemplo, cepas de *B. thuringiensis* apresentam alta toxicidade atribuída à JB-exotoxina. Mais recentemente foi isolada uma cepa com atividade larvicida, mostrando ação tóxica causada pela 5-endotoxina (Legner 1995). Em estudos realizados foi utilizado cepas de *B. thuringiensis* (Bt) que produzem exotoxina. Entretanto, as exotoxinas desenvolvidas rapidamente pelas moscas domésticas já estavam criando resistência aos inseticidas biológicos. Foram identificadas várias cepas com boa atividade frente às moscas adultas. Posteriormente outras cepas com atividade contra as moscas domésticas e determinaram a Cry1B, endotoxina que foi encontrada em todas as cepas de *M. domestica*. A qual pode ser o elemento chave para a atividade destas cepas contra as moscas (Geden et al. 1995).

Por sua vez, os vírus formam parte de outro grupo de agentes de controle biológicos principalmente a família Baculoviridae, que é onde se encontram os mais importantes vírus do controle biológico (Azevedo 1998). Eles contaminam o inseto por via oral e sua aplicação é feita através da maceração de indivíduos infectados e pulverização no campo (Gallos et al. 2002). Também há relatos de um baculovírus dentro deste grupo de organismos. Foi relatada uma partícula viral, envolta de forma oval, com duas cadeias de DNA, associado com sintomas de "Hiperplasia das glândulas salivares (HGS)". O efeito deste vírus é uma redução importante no desenvolvimento do oválico, aspermia e oligospermia, o qual resulta num efeito negativo sobre os aspectos reprodutivos do hospedeiro (Cooler et al. 1993).

### **1.9 *Pouteria mammosa***

A espécie *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist pertencente à família das sapotáceas tem sido denominada comumente com os termos "Zapote ou Mamey" estes nomes comuns possuem origem na palavra azteca "tzapotl" (Cíntia et al. 2009). Mesmo assim existem outras conotações de nomes atribuídos: zapote, zapote mamey, mamey, mamey colorado, mamey de tierra, mamey sapote, mamey zapote, sapota, sapote, sapote colorado, sapote de montaña. A árvore pode chegar até 30 metros de altura, com sementes robustas, pubescentes o aveluadas. Possui folhas cartáceas, compridas e grossas nas extremidades, ovaladas ou elípticas, com nervuras fortes de 13 a 25 cm de comprimento, pubescentes no lado ventral, e o ápice agudo,

abruptamente acuminado, obtuso ou redondo, a base cuneada; os pecíolos de 2 a 4 cm de largo com frequência pubescentes. As flores são pequenas, densamente acumuladas nos galhos. Sépala ao redor de 10, densamente imbricadas em 3 a 4 serie; redondas, sedosas de aproximadamente 3 mm de comprimento. Corola 5-partida de 10 mm de comprimento. Estames 5, com frequência anteríferos, opostos aos lóbulos da corola, os filamentos pontiagudos, as anteras cordadas. Ovário 5-locular, disco aveludado; estilo cônico. O fruto é uma grande monosperma, rugosa, como de 5 cm de comprimento (Roig 2012) (Figura 7).

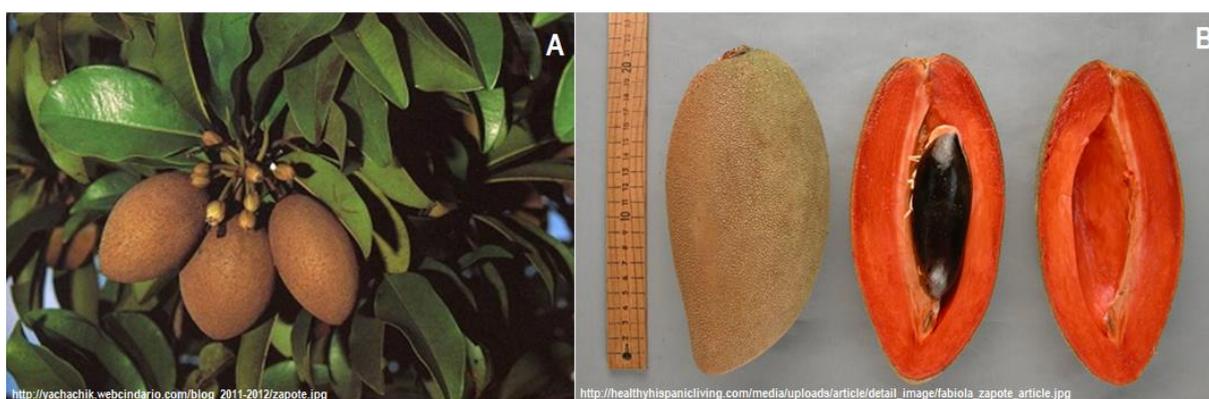


Figura 7. Imagens do Zapote (*Pouteria mammosa*). A: Folhas e frutos na árvore. B: Medição do fruto e mostra da forma interior que deixa ver a semente e a polpa.

### 1.9.1 Classificação taxonômica

A espécie *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist possui várias sinonímias taxonômicas mostradas na “*Tervuren Xylarium Wood Database*” 2015 e que se listam a continuação: *Achradelpha mammosa* (L.) O.F. Cook, *Achras mammosa* L., *Achras zapota major* Jacq., *Bassia jussiae* Tussac, *Calocarpum huastecanum* Gilly, *Calocarpum mammosum* (L.) Pierre, *Calocarpum mammosum* var. *bonplandii* (Kunth) Pierre, *Calocarpum mammosum* var. *candollei* (Pierre) Pierre, *Calocarpum mammosum* var. *ovoideum* (Pierre) Pierre, *Calocarpum sapota* (Jacq.) Merr., *Calospermum mammosum* var. *bonplandii* (Kunth) Pierre., *Calospermum mammosum* var. *candollei* Pierre, *Calospermum mammosum* var. *ovoidea* Pierre., *Lucuma bonplandii* Kunth, *Lucuma mammosa* (L.) C.F. Gaertn., *Sapota mammosa* Mill., *Sideroxylon sapota* Jacq., *Sideroxylum sapota* Jacq., *Itellaria mammosa* (L.) Radlk. y *Calospermum parvum* Pierre. A classificação científica se resume na Tabela I.

Tabela I. Classificação taxonômica do Zapote.

Nome Científico	<i>Pouteria mammosa</i> (L.) Cronquist
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>Divisão</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Subclasse</b>	Dilleniidae
<b>Ordem</b>	Ericales
<b>Família</b>	Sapotaceae
<b>Subfamília</b>	Chrysophylloideae
<b>Gênero</b>	<i>Pouteria</i>
<b>Espécie</b>	<i>Pouteria mammosa</i>

### 1.9.2 Características do fruto

Este fruto americano e muito difundido desde a época pré-hispânica. A polpa (carne) do zapote é succulenta e tem uma cor rosa exaltado com o doce sabor que satisfaz à maioria dos gostos. As análises químicas mostram que por 100 g da polpa de zapote se obtém 65,6% de água, 1,7 g de proteínas, 0,4 g de lipídeos, 31,1 g de carboidratos, 2 g de fibras, 1,2 g de cinzas, 40 mg de cálcio, 28 mg de fósforo, 1 mg de ferro, 115 mg de vitamina A, 0,01 mg de tiamina, 0,02 mg de riboflavina, 2 mg de niacina e 22 mg de ácido ascórbico (Urzúa 2010).

O frescor natural se adapta aos climas quentes e contém vitaminas A e C, as quais são úteis para combater doenças respiratórias e manter numa boa condição o sentido da visão e a pele (Ferreira 1897). Os frutos desta planta têm sido usados tradicionalmente com fins medicinais contra erupção cutânea, a febre, a inflamação, úlcera, náuseas, vômitos e diabetes (Cíntia et al. 2009). O látex tem sido utilizado para destruir verrugas, entretanto o extrato obtido de sementes se usou como cataplasma emoliente para doenças dolorosas da pele (Grosourdy 1864). Além disso, a infusão da semente foi usada em Cuba e Costa Rica para tratar as doenças do peito como tosse e bronquites (Stanley 1923).

### 1.9.3 Outras sapotáceas e a atividade inseticida

Muitas espécies da família das Sapotáceas têm sido usadas por diferentes populações como medicina tradicional para o controle de patógenos, é o caso do efeito do Dubard frente à gonorreia e sífilis (Chhabra et al. 1993). Também foram descritas diferentes atividades

biológicas da *Pouteria venosa* (Mart.), incluída a atividade inseticida. Os quatros triterpenos isolados de Baehni, (taraxerol, ácido ursólico, ácido 3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,23-trihidroxiurs-12-en-28-oico e ácido 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,19 $\alpha$ ,23-tetrahidroxiurs-12-en-28-oico) e o fitosteroide (espinasterol), mostraram atividade larvicida no 4<sup>to</sup> instar do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), atividade antimalárica contra a cepa NK-65 de *Plasmodium berghei*; antiradical (DPPH) e anticolinesterásica (Montenegro et al. 2006). Os extratos da madeira e o córtex de *Pouteria guianensis* Aubl. possuem compostos químicos com propriedades repelentes frente a *Nasutitermes* sp. (Barbosa et al. 2007). A Pouterina, uma proteína isolada de sementes de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk. resultou ser tóxica para as larvas do inseto *Callosobruchus maculatus* Fabricius 1775 (Coleoptera) quando se incorporou de maneira artificial na sua dieta (concentração final 0.12%, w/w), causando 50% de mortalidade (Boleti et al. 2007). Segundo Boleti et al. 2009, esta proteína também mostrou efeito inseticida frente às larvas de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) (Boleti et al. 2009).

Recentemente Carriço et al. (2014) mostraram o efeito inseticida do extrato aquoso de folhas de *Pouteria sapota* (sinonímia dada a *P. mammosa*) na espécie *Chrysomya putoria*, a partir das evidências de que a aplicação tópica deste extrato bruto possui a capacidade de reduzir as percentagem de viabilidade no estágio larval e do período de neolarva a adulto.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a segurança e a eficácia dos extratos, aquoso e hidroalcoólico a 25%, de sementes de *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist para o controle alternativo de dípteros muscoides da família Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria*, *Lucilia cuprina* e *Cochliomyia macellaria*) e *Musca domestica* (Diptera: Muscidae).

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar os parâmetros de controle de qualidade e a composição química dos extratos, aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de *P. mammosa*, através das técnicas de caracterização fitoquímica.
2. Determinar os efeitos indesejáveis do contato e ingestão dos extratos, aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de *P. mammosa* através da realização dos testes de: Toxicidade *in vitro* em células cardíacas, Toxicidade Aguda Oral pelo Método das Classes (CTA), Irritabilidade Dérmica, Toxicidade Dérmica Aguda e Irritabilidade Oftálmica.
3. Caracterizar o efeito do extrato de sementes de *P. mammosa* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de cinco espécies de Calliphoridae (*C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *L. cuprina* e *C. macellaria*) e uma espécie de Muscidae (*M. domestica*) mediante o estudo do comportamento das variáveis de cada estágio e alterações morfológicas macroscópicas evidenciadas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material Vegetal

Os frutos de *P. mammosa* foram coletados no mês de fevereiro do ano 2012 no povoado “El Caney” de Santiago de Cuba, Cuba. As folhas e sementes foram identificadas por taxonomistas especializados do “Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO)” do Museu de Historia Natural “Tomás Romay” da Cidade de Santiago de Cuba. Este material seco também foi depositado no herbário desta instituição sob o número de registro Hac 468 (Anexo I).

#### 3.2 Obtenção e caracterização dos extratos de Zapote

O endocarpo de sementes de *P. mammosa* foi removido e o endosperma pulverizado. Os extratos, aquoso e hidroalcoólico (25%) foram preparados por maceração numa proporção de 40 g em 100 mL de água destilada ou etanol 25% com agitação em “shaker” durante oito horas, posteriormente foram filtrados e concentrados até 50 mL em rotoevaporador (Figura 8).

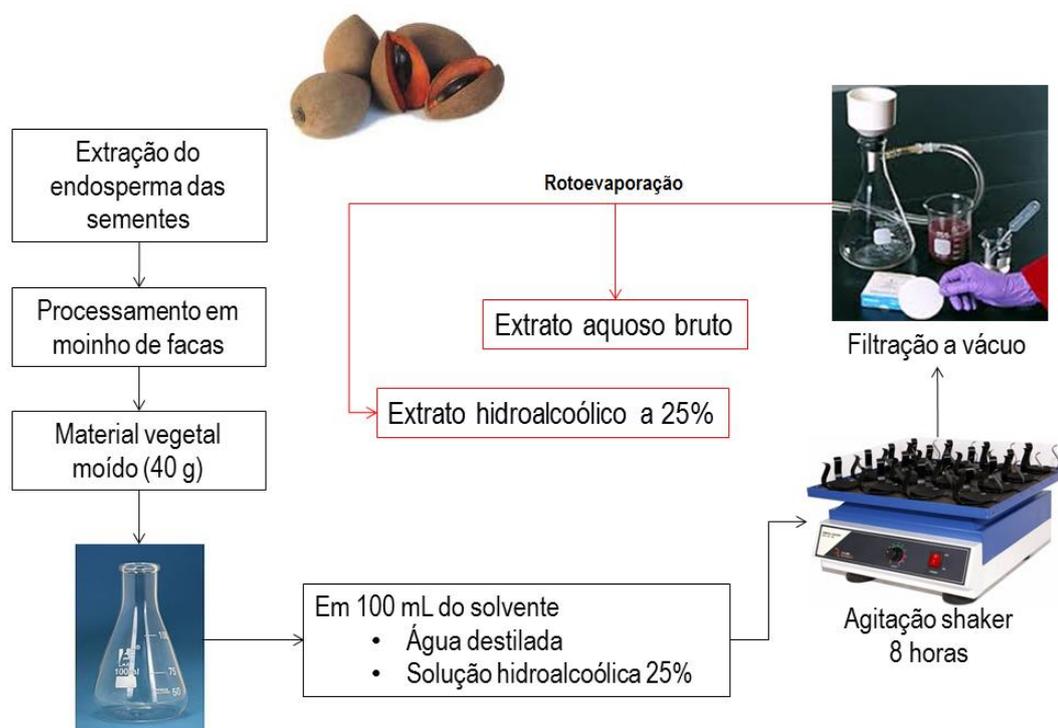


Figura 8. Diagrama de fluxo para obtenção dos extratos aquoso bruto e hidroalcoólico a 25% de *Pouteria mammosa*.

Foram realizados os controles de qualidades físico e físico-química dos extratos segundo a “*Norma Ramal de Salud Pública 312 - (NRSP: 312) (1991). Extractos fluidos y tinturas. Métodos de ensayos*”.<sup>1</sup> (Determinação do pH, a densidade e o valor dos sólidos totais) e finalmente foram estocados a 4°C em frascos de cor âmbar.

O controle da qualidade químico qualitativa foi feito para determinar a presença de alcaloides, triterpenos e/ou esteroides, quinonas, cumarinas, lipídeos e/ou óleos essenciais, mucos, saponinas, fenóis e/ou taninos, aminoácidos, açúcares redutores glicosídeos cardiotônicos, glicosídeos cianogênicos e resinas (Domínguez 1979) (Anexo II).

### 3.3 Manuseio de animais de laboratório e considerações éticas

Todos os animais incluídos no estudo receberam água e comida *ad libitum* durante todo o período de vida. Foram mantidos em condições ambientais favoráveis com temperatura de 25°C, umidade relativa variando entre 40 e 70% e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro. Os experimentos foram conduzidos seguindo as diretrizes internacionais estabelecidas para o manuseio de animais de laboratório baseadas nos princípios de redução do número de animais e refinamento no trato do mesmo. A execução dos estudos foi aprovada pelo Comitê de Ética da “*Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente – Cuba*”<sup>2</sup> (Anexo III) para serem realizados no “*Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED) - Cuba*”<sup>3</sup> centro de pesquisa credenciado para tais fins (Anexo IV).

Para o teste de Toxicidade Aguda Oral foram utilizados seis ratos fêmeas *Sprague Dawley* (que nunca tiveram contato sexual) com idade entre cinco e seis semanas de vida e com massa corporal entre 170 e 206 gramas. No caso do teste de Toxicidade Dérmica Aguda foram utilizados dez ratos (cinco fêmeas e cinco machos) com mesma idade, também *Sprague Dawley* com massa corporal entre 200 e 300 g, fornecidos em todos os casos pelo “*Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) – Cuba*” com Certificado de Saúde N°. 08001414.

Para os testes de Irritabilidade Dérmica e Irritabilidade Oftálmica usaram-se três coelhos fêmeas da linha Nova Zelândia em cada caso, com idade de 11 a 12 semanas e massa corporal

---

<sup>1</sup> Norma Ramal de Saúde Pública 312 - (NRSP: 312) (1991). Extratos fluidos e tinturas. Métodos de ensaios.

<sup>2</sup> Faculdade de Ciências Naturais da Universidade de Oriente – Cuba.

<sup>3</sup> Centro de Toxicología e Biomedicina (TOXIMED) – Cuba.

de 2 a 3 Kg. Estas foram fornecidas sob o Certificado de Saúde N°. 0314 pelo “*Centro para la Reproducción de Conejos de El Modelo en Santiago de Cuba – Cuba*”<sup>4</sup>

### **3.4 Provas para determinação da segurança dos extratos**

#### **3.4.1 Avaliação *in vitro* dos extratos aquoso bruto e hidroalcoólico a 25% de sementes de *Pouteria mammosa* sobre culturas de cardiomiócitos**

A obtenção de culturas primárias de músculo cardíaco foi realizada a partir de embriões de camundongos retirados de fêmeas grávidas com 18 a 20 dias de gestação. Após eutanásia das fêmeas grávidas, os corações dos embriões foram removidos e dissecados em solução salina. Os ventrículos foram submetidos a sucessivas etapas de dissociação mecânica e enzimática (0,05% de tripsina e 0,01% de colagenase por cinco min a 37°C). As suspensões celulares foram centrifugadas e o sedimento (*pellet*) resuspenso em meio suplementado com soro (5% de fetal bovino (SFB) e 15% de cavalo), 2% de extrato embrionário de pinto, 1mM de L-glutamina e 5mM de cloreto de cálcio. A progressão da dissociação foi monitorada por microscopia óptica de contraste de fase, para análise de morfologia, densidade e viabilidade celular. Em seguida foi feito o plaqueamento das células em diferentes substratos previamente revestidos por 0,01% de gelatina. Inicialmente as culturas foram mantidas por 30 minutos em garrafas a 37°C para a adesão de fibroblastos, sendo então o sobrenadante (rico em cardiomiócitos) transferido para novos substratos também revestidos por gelatina (Da Silva et al. 2008).

Culturas primárias de células de mamífero foram analisadas em microscópio óptico (observação da morfologia, densidade e contratilidade das células); as células foram cultivadas a 37°C por 24 horas e então incubadas por 24 a 48 horas a 37°C com diferentes concentrações dos extratos (0 -1200 µg/mL) diluídas em meio de cultura. Os controles foram realizados com omissão das drogas e adição DMSO (na concentração final relativa à dose de 1200µg/mL µM) (Figura 9).

O teste de viabilidade foi realizado pelo método de Presto Blue: as culturas expostas aos compostos foram incubadas com o substrato por seis horas e em seguida, realizada a leitura no espectrofotômetro (às amplitudes de onda 570 e 600nm), segundo recomendação dos fabricantes e como descrito anteriormente (Timm et al. 2014).

---

<sup>4</sup> Centro para a Reprodução de Coelhoos de “*El Modelo*” em Santiago de Cuba – Cuba.

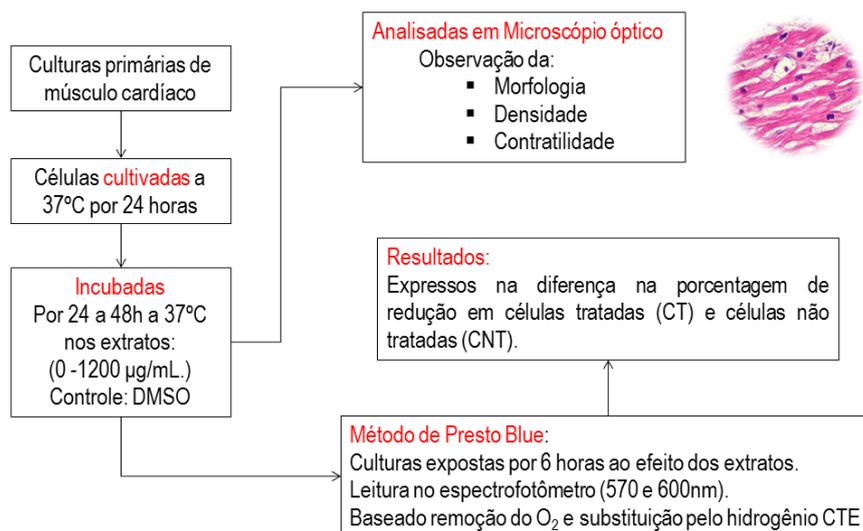


Figura 9. Diagrama de fluxo para avaliação in vitro dos extratos aquoso bruto e hidroalcoólico a 25% de sementes de *Pouteria mammosa* sobre culturas de cardiomiócitos.

O teste identifica o potencial citotóxico dos extratos pela medida da metabolização celular, o princípio do ensaio é a reação de oxi-redução (REDOX) através sistema de transporte de elétrons (remoção do oxigênio e substituição pelo hidrogênio) e citocromos (Xu et al. 2015). Os resultados foram expressos na diferença na porcentagem de redução em células tratadas (CT) e células não tratadas (CNT), através da seguinte equação:

$$\text{Diferença na porcentagem} = \frac{(117,216)(\text{Abs } 570 \text{ CT}) - (80,586)(\text{Abs } 600 \text{ CT})}{(117,216)(\text{Abs } 570 \text{ CNT}) - (80,586)(\text{Abs } 600 \text{ CNT})} \times 100$$

### 3.4.2 Toxicidade aguda oral pelo Método das Classes (CTA)

Para determinar os possíveis efeitos tóxicos de *P. mammosa* utilizou-se a Diretriz para a avaliação de substâncias químicas emitida pela Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico, seguindo o Método das Classes de Toxicidade Aguda (CTA) (OECD/OCDE 423, 2012) (Figura 10). Resultados publicados (Anexo V).

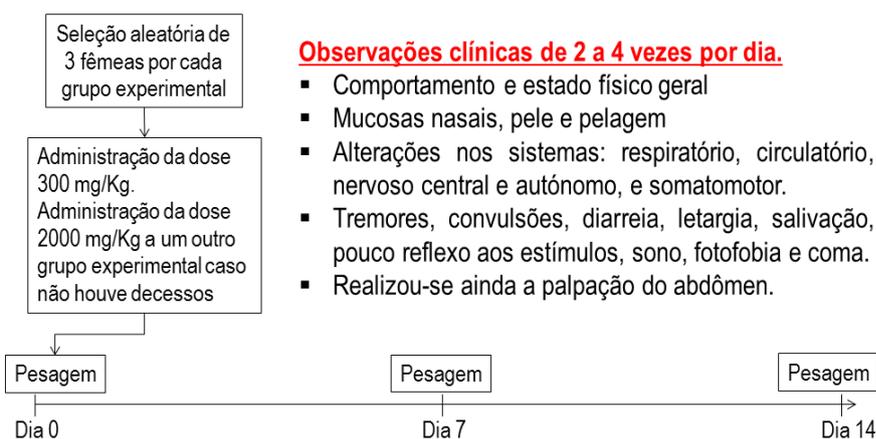


Figura 10. Diagrama de fluxo para determinação da Toxicidade Aguda oral dos extratos aquoso bruto e hidralcoólico a 25% de *Pouteria mammosa* pelo Método das Classes (CTA).

Este permite a estimação da  $DL_{50}$  com um intervalo de confiança e a classificação da substância de ensaio de acordo ao Sistema Globalmente Harmonizado donde se estabelecem as faixas das substâncias em classes tóxicas desde: Não Classificada, Perigosa, Tóxica, Muito Tóxica e Altamente Tóxica (Tabela II).

Tabela II. Classificação toxicológica das substâncias segundo a Diretriz 423 da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento (OECD/OCDE 423, 2012).

Faixa da $DL_{50}$ (mg/Kg)	CTA	Classificação
$DL_{50} > 2000$ mg/Kg de peso	CTA 5	Não Classificada
$300 < DL_{50} \leq 2000$ mg/Kg de peso	CTA 4	Perigosa
$50 < DL_{50} \leq 300$ mg/Kg de peso	CTA 3	Tóxica
$5 < DL_{50} \leq 50$ mg/Kg de peso	CTA 2	Muito Tóxica
$DL_{50} < 5$ mg/Kg de peso	CTA 1	Altamente Tóxica

Os animais foram selecionados aleatoriamente e colocados em dois grupos de três ratos por caixa (Figura 11), um grupo controle e um grupo experimental tratado com o extrato correspondente a cada caso. Foi retirado o alimento a todos os animais 12 horas antes de iniciar o estudo e se determinou a massa corporal momentos antes numa balança *Sartorius* de origem alemã.



Figura 11. Ratos Sprague Dawley.

Ao grupo experimental foi administrada uma dose de 300 mg/Kg com ajuda de uma Sonda gástrica N° 10 Vygón de origem francesa. As observações clínicas dos animais realizaram-se de 2 a 4 vezes por dia, prestando atenção ao: comportamento, estado físico geral, as mucosas nasais, mudanças na pele e na pelagem, sinais que mostrassem alterações nos sistemas respiratório, circulatório, nervoso central e autônomo e a atividade somatomotora. Além de possíveis aparecimentos de sinais como tremores, convulsões, diarreia, letargia, salivação, pouco reflexo aos estímulos, sono, fotofobia e coma. Realizou-se ainda a palpação do abdômen.

Após 48 horas de observação clínica sem nenhum sinal evidente de toxicidade se procedeu a administração 2000 mg/Kg a um segundo grupo experimental. No sétimo e décimo quarto dia se determinou novamente a massa corporal dos animais. Ao chegar ao ponto final do estudo, os animais foram sacrificados de forma humanizada por administração de uma superdose do anestésico ketamina por via intraperitoneal. Posteriormente foram estudados macroscopicamente os órgãos internos.

### **3.4.3 Teste de irritabilidade dérmica**

Os animais, coelhos (fêmeas) da linha Nova Zelândia (Figura 12) foram raspados ou tricotomizados 24 horas antes da aplicação dos extratos no lombo (dorso) e a ambos os flancos (10% da superfície corporal) tendo cuidado de não ferir a pele. Utilizaram-se animais com pele intacta e saudável. Lavou-se essa área do animal com água estéril e se deixou repousar por um

período o de 24 horas. Posteriormente foi aplicado 0,5 mL do extrato de estudo em um dos flancos, numa área de seis cm<sup>2</sup> aproximadamente.



Figura 12. Coelhos da linha Nova Zelândia.

Os animais foram mantidos expostos à ação dos extratos durante quatro horas, fixados em suporte de PVC, passado este tempo os emplastos foram retirados e a zona de aplicação foi lavada com água estéril. As leituras foram realizadas a 1, 24, 48 e 72 horas após a retirada dos emplastos. Avaliou-se o comportamento, a conduta, o estado geral, a postura e reflexos, atitude relacionada com a vontade de se alimentar, ingerir água e os hábitos de higiene. Registrou-se e comparou-se a massa corporal ao início e fim do estudo (Figura 13).

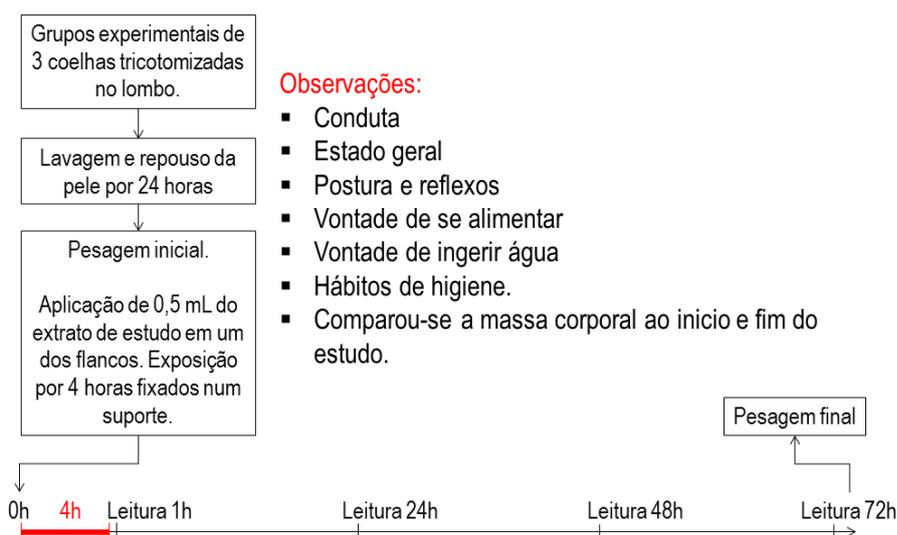


Figura 13. Diagrama de fluxo do Teste de Irritabilidade Dérmica realizado aos extratos aquoso bruto e hidralcoólico a 25% de *Pouteria mammosa*.

Realizou-se a avaliação de edema e eritema seguindo os aspectos relacionados na (Tabela III) para calcular o Índice de Irritação Primária (IIP) mediante a seguinte fórmula:

$$IIP = \frac{\text{Valor (eritema + edema)}}{\text{Número de animais x Número de observações}}$$

Tabela III. Grau de formação das lesões na pele.

<b>Eritema e formação de escaras</b>	<b>Desenvolvimento do edema</b>	<b>Grau</b>
Ausência de eritema	Ausência de edema	0
Eritema muito ligeiro	Edema muito ligeiro (Escassamente perceptível)	1
Eritema bem definido	Edema ligeiro (Bordes da área bem definido por uma elevação definida)	2
Eritema de moderado a severo	Edema moderado (Elevação de aproximadamente um milímetro)	3
Eritema severo hasta formação de escaras	Edema severo (Elevação de más de um milímetro que se estende além do local da exposição)	4

A interpretação dos resultados se realizou seguindo a escala proposta por Draize et al. em 1944 (Tabela IV) e a Diretriz para a Avaliação de Substâncias Químicas emitida pela Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico, através da Metodologia para Determinação do Grau de Irritação/corrosão Dérmica Aguda (OECD/OCDE 404, 2000). Resultados publicados (Anexo V).

Tabela IV. Faixas do Índice de Irritação Primária estabelecidos por Draize et al. em 1944 para a classificação do efeito irritante das substâncias na pele.

<b>Faixa do índice de Irritação Primária</b>	<b>Classificação da Irritabilidade</b>
$0 < IIP < 0,4$	Não Irritante
$0,4 \leq IIP < 2,0$	Ligeiramente Irritante
$2,0 \leq IIP < 5,0$	Moderadamente Irritante
$5,0 \leq IIP \leq 8,0$	Severamente Irritante

### 3.4.4 Teste de toxicidade dérmica aguda

Os ratos *Sprague Dawley* foram raspados ou tricotomizados 24 horas antes da aplicação dos extratos no lombo (dorso) e a ambos os flancos (10% da superfície corporal) tendo cuidado de não ferir a pele. Utilizaram-se animais com pele intacta e saudável. Lavou-se essa área do animal com água estéril e se deixou repousar por um período o de 24 horas. Posteriormente se aplicou uma dose de 2000 mg/Kg de peso do extrato de estudo em um dos flancos.

Os animais foram mantidos expostos à ação dos extratos durante 24 horas, com emplastos fixos contendo o extrato sem ser imobilizados. Passado este tempo se retiraram os emplastos e foi lavada a zona de aplicação com água estéril. As observações clínicas foram realizadas até por volta de 14 dias depois de retirados os emplastos. Avaliou-se ainda o comportamento, a conduta, o estado geral, a postura e reflexos, atitude relacionada com a vontade de se alimentar, ingerir água e os hábitos de higiene. Registrou-se a massa corporal no início do estudo e se comparou com a dos sete dias e a do fim do estudo como principal indicador de injúria nos estudos com animais.

Este estudo complementar ao de Irritabilidade Dérmica refere-se aos efeitos adversos produzidos em um curto período de tempo após a aplicação a dose única de uma determinada substância segundo a Diretriz Nº. 402 da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (Figura 13).

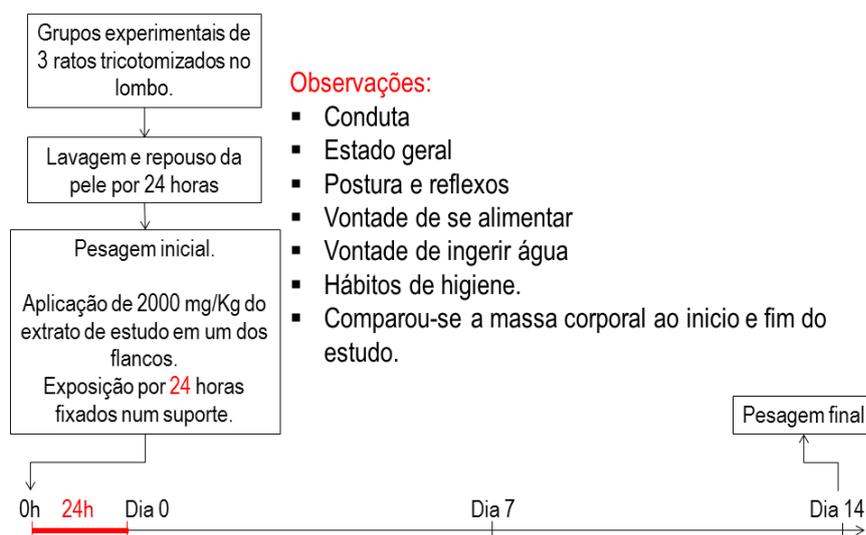


Figura 14. Diagrama de fluxo do Teste de Toxicidade Dérmica Aguda realizado aos extratos aquoso bruto e hidralcoólico a 25% de *Pouteria mammosa*.

### 3.4.5 Teste de irritabilidade oftálmica

Utilizou-se a Diretriz para a Avaliação Substâncias Química emitida pela Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico, seguindo a Metodologia para a Determinação do grau de Irritação/corrosão Oftálmica Aguda (OECD/OCDE 405, 2002) (Figura 15). Resultados publicados (Anexo V).

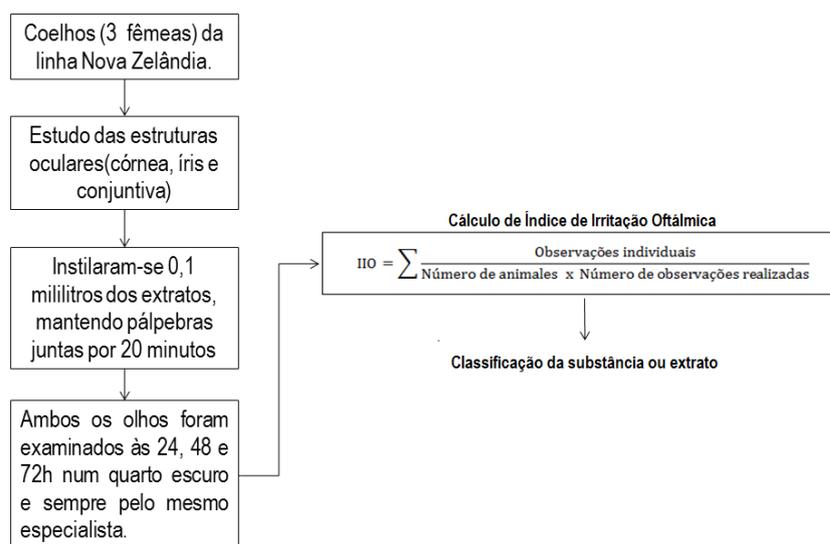


Figura 15. Diagrama de fluxo do Teste de Irritabilidade Oftálmica realizado aos extratos aquoso bruto e hidralcoólico a 25% de *Pouteria mammosa*.

Um total de três coelhos (fêmeas) da linha Nova Zelândia para cada lote de ensaio foram submetidos a um rigoroso estudo das suas estruturas oculares (córnea, íris e conjuntiva), rejeitando qualquer um que tivesse a mínima irritação, defeito ocular ou lesão na córnea.

Instilaram-se 0,1 mililitros dos extratos em cada caso no fundo do saco conjuntival direito, depois de projetada ligeiramente a pálpebra inferior para fora do olho do animal. Mantiveram-se as pálpebras juntas durante 20 minutos após a instilação. Foram examinados ambos os olhos de cada animal às 24, 48 e 72 horas, sempre pelo mesmo especialista. O dano da córnea determinou-se em um quarto escuro com o uso de uma solução de fluoresceína sódica a 2% para aumentar o contraste, irrigou-se logo com solução salina para eliminar restos de extrato e fluoresceína e foi utilizada uma lâmpada de luz ultravioleta para auxiliar na observação. Realizaram-se e registraram observações (Anexos VI e VII) até 5 dias após aplicação para avaliar reversibilidade dos efeitos e se determinou mais uma vez a massa

corporal no final do estudo para comparar variações neste parâmetro. Realizou-se o somatório de todas as áreas orbitais afetadas (córnea, íris e conjuntiva) e se dividiu pelo múltiplo do número dos animais e as observações realizadas (Draize et al. 1944) para determinar o Índice de Irritação Ocular (IIO).

$$IIO = \frac{\sum \text{Observações individuais}}{\text{Número de animais} \times \text{Número de observações realizadas}}$$

O valor obtido se comparou com as faixas estabelecidas na Tabela V para dar os resultados de aprovação ou rejeição, sob o critério do Anteprojeto do Método Cubano (García-Simón et al. 1988) para a avaliação. Os índices instituídos como limites de aprovação do IIO vão de 0 até 19 e de rejeição valores do IIO desde 20 até 110.

Tabela V. Faixas do Índice de Irritação Ocular estabelecidos pelos critérios do Anteprojeto do Método Cubano para classificação da irritabilidade oftálmica.

Faixas do Índice de Irritação Ocular	Classificação da Irritabilidade
$0 < IIO < 10$	Não Irritante
$10 \leq IIO < 20$	Ligeiramente Irritante
$20 \leq IIO < 30$	Moderadamente Irritante
$30 \leq IIO \leq 110$	Severamente Irritante

### 3.5 Criação e manutenção no laboratório das colônias de dípteros muscoides

A criação dos dípteros muscoides incluídos no estudo foi estabelecida a partir de adultos coletados em diferentes pontos do Brasil: Campus da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP (*C. albiceps* e *C. megacephala*), no Campus da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, no Rio de Janeiro – FIOCRUZ (*C. putoria* e *C. macellaria*) e numa caçamba de lixo encontrada no Bairro do Amorim, próximo ao campus da FIOCRUZ/RJ (*L. cuprina* e *M. domestica*). A metodologia utilizada para o estabelecimento e manutenção das colônias foi a estabelecida por Queiroz e Milward-de-Azevedo (1991), que consiste em manter os adultos em gaiolas de madeira, com telas de náilon nas laterais e uma abertura frontal contendo uma manga de tecido preto para o manuseio dos insetos, o volume da gaiola é de aproximadamente 2,7 m<sup>3</sup> (30x30x30 cm) (Figura 16 A). Esta mesma metodologia preconiza uma alimentação à base de sacarose

oferecida na forma de açúcar refinado que atualmente se dispõe numa solução em forma de xarope simples a uma concentração de  $83\% \pm 2\%$  e água provida em garrafas com um pavio feito de gaze para difusão por coesão (Figura 16 B).

Os dípteros utilizados foram provenientes de novas colônias, feitas a partir da primeira geração dos adultos coletados. Para substrato de postura e maturação das fêmeas da família Calliphoridae foi oferecida carne moída putrefata e no caso especial da espécie *M. domestica*, uma mistura de carne bovina moída putrefata e farelo de trigo na proporção 5g de carne/1g de farelo, dieta preconizada no Laboratório de Entomologia Médica e Forense do Instituto Oswaldo Cruz – LEMEF/FIOCRUZ.

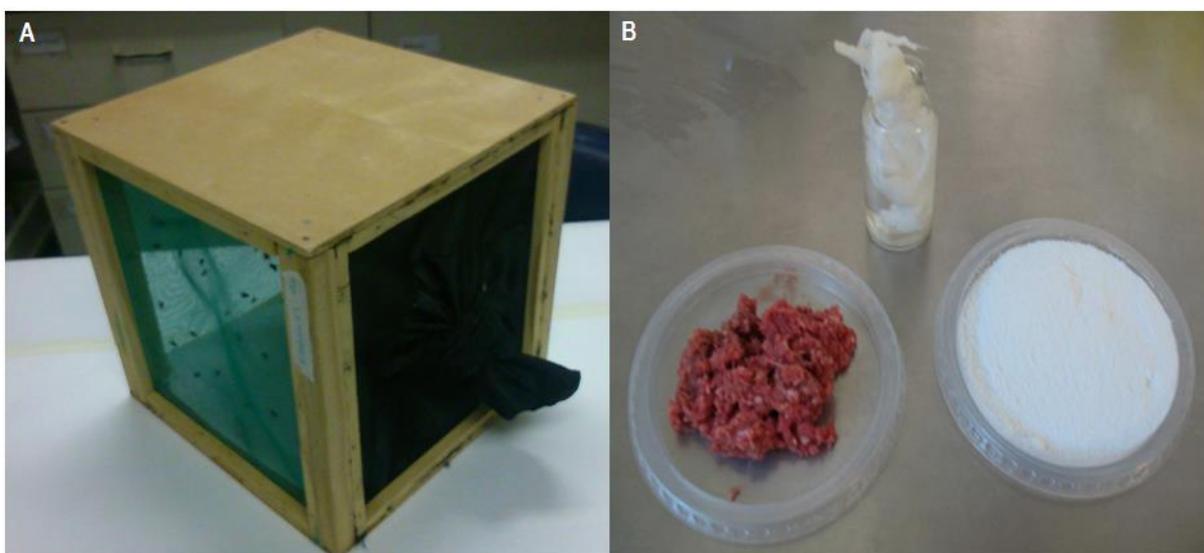


Figura 16. Condições para criação e manutenção das colônias de Dípteros muscoides. A: Gaiola para contenção; B: Dieta para básica para alimentação e indução da cópula e postura.

### 3.6 Bioensaio de atividade inseticida em dípteros muscoides

Após aproximadamente 12 horas de induzida a postura com carne bovina putrefata em cada colônia se obtiveram quantidades suficientes de larvas em instar L1 para testar seis doses (quatro repetições com 50 larvas cada) do extrato aquoso bruto de *P. mammosa* e uma dose controle (na qual nada foi aplicado), totalizando 1400 larvas em cada experimento. As doses foram estabelecidas a partir da solução matriz do extrato a uma concentração inicial de 134,0 mg/mL (100%) de sólidos totais. A partir desta por diluição se obtiveram as concentrações 6,7; 13,4; 33,5; 67,0; 100,5 mg/mL equivalentes ao 5; 10; 25; 50 e 75% da solução matriz respectivamente, sendo a aplicação feita imediatamente após a diluição.

Foram aplicados 50µL de cada concentração de extrato topicamente sobre 50 larvas recém-eclodidas a uma relação de 1µL/larva aproximadamente. Após a aplicação as larvas foram transferidas para um recipiente contendo 50g de dieta e este recipiente foi acondicionado dentro de um segundo recipiente de maior volume, contendo vermiculita como substrato de pupação. Estes foram cobertos por tecido de náilon (escaline) preso por elástico.

Em todos os tratamentos, as pupas foram coletadas, pesadas em balança de precisão e acondicionadas três por cada tubo de ensaio, contendo até ¼ de seu volume de vermiculita e tampados com escaline, para pupação e posterior emergência dos adultos (Figura 17). As observações foram registradas numa planilha adequada ao desenvolvimento dos dipteros (Figura 18). Foi calculada a viabilidade larval através da seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade larval} = \frac{\text{Número de larvas que abandonou a dieta}}{\text{Número de larvas definido para cada tratamento}} \times 100\%$$

No momento da emergência dos adultos foi calculada a viabilidade pupal e em conjunto, a viabilidade de neolarva a adulto utilizando as seguintes fórmulas respectivamente:

$$\text{Viabilidade pupal} = \frac{\text{Número de pupas das quais emergiram adultos}}{\text{Número total de pupas formadas}} \times 100\%$$

$$\text{Viabilidade neolarva a adulto} = \frac{\text{Número de adultos que emergiram}}{\text{Número de larvas definido para cada tratamento}} \times 100\%$$

Os insetos foram observados quanto à viabilidade do desenvolvimento das fases de larva, pupa e neolarva a adulto, duração de cada fase e razão sexual calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Razão sexual} = \frac{\text{Número de fêmeas emergidas}}{(\text{Número de fêmeas emergidas} + \text{Número de machos emergidos})}$$

O fluxo de trabalho do ensaio é mostrado na Figura 17 e o registro diário dos dados foi feito na planilha mostrada na Figura 18.

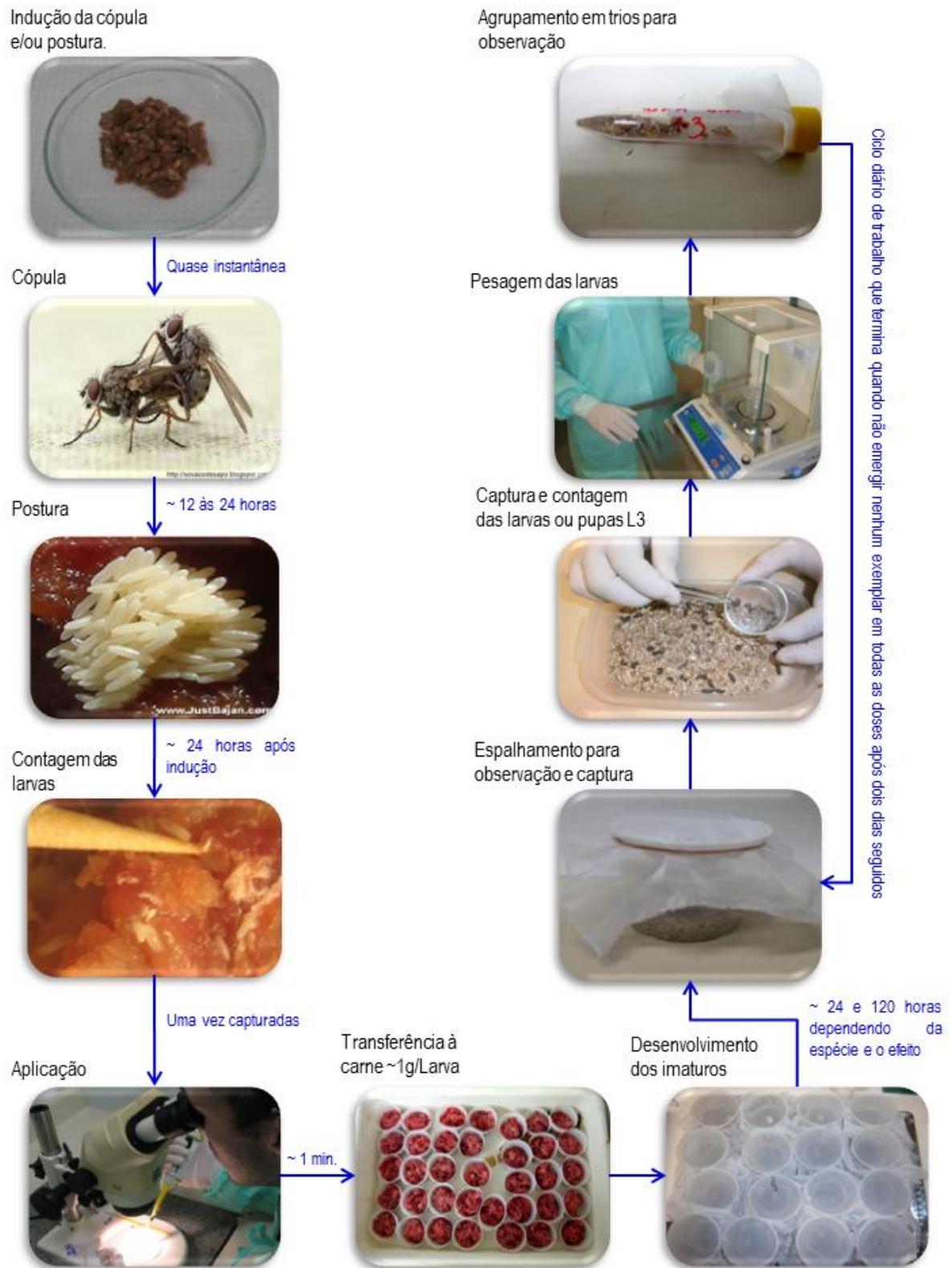


Figura 17. Fluxo de trabalho no bioensaio de atividade inseticida em dípteros muscoides.

AVALIAÇÃO DIPTERA

DOSE:

REPETIÇÃO:

ESPÉCIE: [ \_\_\_\_\_ ]

TRATAMENTO: \_\_\_\_\_

DATA ESTÍMULO POSTURA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

DATA DE ECLOSÃO DAS LARVAS (L1): \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

LARVA	Peso larva em Instar L3 (mg)	Data abandono da dieta (L3)	Data da pupação	Data emerge adulto	Sexo	OBSERVAÇÕES	Estágio L1-L3 (Dias)	Estágio L3 a Adultos (Dias)	Tempo Neo-Adu (Dias)
		Dia / Mês	Dia / Mês	Dia / Mês					
01									
02									
03									
04									
05									
06									
07									
08									
09									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									
21									
22									
23									
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
41									
42									
43									
44									
45									
46									
47									
48									
49									
50									

**Legenda para a coluna observações e sexo:** LMV → Larva Morta na Vermiculita; LMT → Larva Morta no Tubo de ensaio; LMC → Larva Morta na Carne; PV → Pupa na Vermiculita; PC → Pupa na carne; NE → Não Emergiu; ME → Morreu Emergindo; EMF → Emergiu com Malformação. F → Fêmea; M → Macho; ? o \* → Sexo duvidoso. (Colocar sempre a data ao lado das siglas).

Figura 18. Tabela de registro de dados primários utilizada na avaliação de substâncias e extratos para controle alternativo de dipteros.

### 3.7 Obtenção, registro e análise estatística dos dados

Os dados para cada ensaio foram coletados em planilhas específicas (Anexos V e VI) e posteriormente digitalizados no programa Microsoft Excel onde se construíram gráficos e tabelas.

Para o processamento da variável massa corporal (0 dias, 7 dias e 14 dias) se utilizou o pacote estatístico Statgraph versão 5.1. Foi realizada uma prova estatística através do Contraste Múltiplo de Faixas com o Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey das Mínimas Diferenças Significativas (LSD) a 95% de nível de confiança.

Os resultados da atividade inseticida foram analisados através da análise de variância (ANOVA:  $P \leq 0,05$ ), foi utilizado o Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey para análise da significância estatística, e o desvio padrão foi calculado através da média dos experimentos. O pacote estatístico Graphpad® Prism foi utilizado na realização destes cálculos estatísticos.

A **mortalidade** (aqueles indivíduos que não emergiram) foi calculada através da inversão da viabilidade. Também foi calculada a **mortalidade acumulada** que se estabelece como resultado da soma da mortalidade resultante de cada tratamento mais o número de indivíduos com malformações (**mortalidade seletiva** resultado da seleção natural daqueles indivíduos que emergiram com malformações que os tornam inviáveis), com morte iminente, incapacidade para conseguir alimento, incapacidade para se reproduzir ou impossibilidade de fugir dos predadores, por exemplo, adultos que apresentaram asas atrofiadas.

Se:

$$\% \text{ Mortalidade específica de cada estágio por tratamento ou controle} = 100 - \% \text{ Viabilidade}$$

Então:

$$\% \text{ Mortalidade acumulada} = \text{Mortalidade por não emergência} + \text{Mortalidade seletiva}$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Controle de qualidade física, físico-química e químico-qualitativa dos extratos aquoso e hidroalcoólico 25% de sementes de *Pouteria mammosa*

Muito raramente uma planta inteira possui valor medicinal ou alguma outra aplicabilidade; normalmente os compostos úteis se concentram em alguma das suas partes: folhas, sementes, flores, córtex, frutos e raízes. O uso das plantas e dos produtos derivados destas deve estar acompanhado do máximo cuidado, para garantir o sucesso do tratamento ou aplicação. Contrariamente à crença geral, os melhores resultados nem sempre são obtidos com o uso das plantas frescas ou com preparações caseiras. Fazer extratos de plantas permite obter maior quantidade de princípios ativos.

Os produtos fitoterapêuticos possuem uma composição química variável e, por conseguinte são definidos pelo processo de extração. Sendo assim, dois fatores são de importância fundamental: a qualidade da matéria prima utilizada e a opção para selecionar o solvente para a extração. As plantas medicinais apresentam, normalmente, mais de uma substância ativa e diversas substâncias inativas que influem na ação dos componentes ativos.

Para satisfazer as exigências em manter constante a atividade da substância, a proporção entre os componentes deve também ser mantida, e é por isso que resulta de grande importância avaliar a qualidade dos extratos. Os casos específicos dos extratos aquoso e hidroalcoólico a 25% obtidos a partir de sementes de *P. mammosa* podem ser observados na Tabela VI.

Tabela VI. Parâmetros do controle de qualidade física e físico-química do extrato aquoso bruto e do extrato hidroalcoólico a 25% de sementes de *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist. (Zapote).

Parâmetros físicos e físico-químicos		Extrato aquoso bruto de <i>P. mammosa</i>	Extrato hidroalcoólico a 25% de <i>P. mammosa</i>
	Aroma	Amêndoas amargas	Amêndoas amargas
<b>Características organolépticas</b>	Coloração	Branco	Bege
	Transparência	Turvo	Turvo
	Homogeneidade	Sim	Sim
<b>Potencial hidrogeniônico – pH</b>		~6,0	~6,0
<b>Densidade relativa (g/cm<sup>3</sup>)</b>		1,013	1,024
<b>Sólidos totais (mg/mL)</b>		134,00	106,40

Ao realizar o estudo fitoquímico (químico-qualitativo) dos dois extratos determinou-se que ambos, aquoso e hidroalcoólico 25% evidenciam em intensidades similares: cumarinas,

saponinas, fenóis e taninos o que sugere que possuem quantidades similares destes metabolitos. Maiores quantidades de flavonoides e glicosídeos cianogênicos estiveram presentes no extrato aquoso que no extrato hidroalcoólico 25% a partir das evidências visuais. Nenhum extrato mostrou evidências da presença de resinas, glicosídeos cardiotônicos nem mucilagens (Tabela VII).

Tabela VII. Triagem fitoquímica (químico-qualitativa) dos extratos, aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist. (Zapote).

METABÓLITOS	TESTES	RESULTADOS	
		Aquoso	Hidroalcoólico 25%
Alcaloides	Dragendorff	-	++
	Mayer	-	+++
	Wagner	-	-
Triterpenos e/ou esteroides	Lieberman-Burchard	-	-
	Solkowski	-	+
Quinonas	Borntrager	-	++
	Variante ácido sulfúrico	-	-
Cumarinas	Baljet	+++	++
	Legal	+	-
Lipídeos e/ou Azeites essenciais	Sudão	+++	-
	Ensaio para óleos essenciais com papel branco sem reagente	+++	+
	Ensaio para óleos fixos	+++	+
Mucilagens	Prova para mucilagens	-	-
Saponinas	Prova de espuma	+	+
Fenóis e/ou Taninos	Prova de Cloreto Férrico	++	+
Aminoácidos	Ninhidrina	+++	-
Açúcares redutores	Fehling	+++	-
	Benedict	+++	+
Glicosídeos cardiotônicos	Kedde	-	-
Flavonoides	Ácido sulfúrico concentrado	+	+
	Shinoda	+	+
	Prova Alcalina (Álcali)	+	+
	Rosemheim	+++	+
Glicosídeos cianogênicos	Guignard	+++	+
Resinas	Prova de Resinas	-	-

Os metabólitos que marcaram as maiores diferenças entre os dois extratos foram os lipídeos e/ou óleos essenciais, aminoácidos e açúcares redutores que só estavam presentes no extrato aquoso. Alcaloides, quinonas, triterpenos e esteroides foram encontrados unicamente no extrato hidroalcoólico a 25% de *P. mammosa*.

## **4.2 Segurança da aplicabilidade dos extratos aquoso bruto e hidroalcoólico a 25% de sementes de *Pouteria mammosa***

O hábito e a prática acumulados na utilização do “Zapote” ou “Mamey colorado” desde séculos anteriores como alimento e como remédio etnobotânico, são indícios de uma baixa ou nula toxicidade do fruto e dos extratos preparados a partir de sementes desta planta da família Sapotaceae (Roig 2012). No entanto, para amparar cientificamente a aplicação e aplicabilidade de qualquer produto, metabólito ou princípio ativo torna-se indispensável realizar testes que demonstrem sua segurança (OECD/OCDE 423 2012). É por isso que a seguir se apresentam os resultados dos efeitos provocados pelos extratos obtidos a partir de sementes de *P. mammosa* ao interagir in vitro com células cardíacas, ao serem administrados por via oral, bem como ao serem colocados em contato com a pele e os olhos.

### **4.2.1 Efeito dos extratos aquoso bruto e hidroalcoólico a 25% de sementes de *Pouteria mammosa* sobre células cardíacas**

Os resultados apresentados (Figura 19 e Figura 20) refletem as médias e desvios padrão de três ensaios individuais (realizados em triplicatas). A análise da toxicidade dos extratos de sementes de *P. mammosa* sobre o cultivo primário de cardiomiócitos foi realizada com a finalidade de verificar o perfil de viabilidade celular, através de ensaio que identifica danos em nível mitocondrial.

Os resultados mostram que os extratos não apresentaram toxicidade sendo observadas algumas alterações na cultura na maior concentração de 1200µg/mL (Figura 20). Após os tempos de incubação, durante a observação ao microscópio óptico, os cardiomiócitos tratados com o extrato hidroalcoólico a 25% mostraram perda parcial de contratilidade na maior concentração testada com 24 horas de tratamento. Esta toxicidade foi revertida com o tempo de 48 horas de tratamento com a fração. Esta diferença de resultado entre um extrato e o outro é coerente com as diferenças quanto ao conteúdo de metabólitos secundários contidos em cada tipo extrato. Na caracterização químico-qualitativa preliminar do extrato aquoso não se evidenciou presença de alcaloides e que sim estiveram presentes no extrato hidroalcoólico a 25% (Tabela VII). A estimulação vagal do coração é mediada por receptores muscarínicos do tipo M<sub>2</sub>, que ao serem ativados por alguns alcaloides naturais podem induzir uma reação inibitória e reduzir a ação parassimpática (Farias et al. 2010). Mesmo quando alcaloides como a atropina aceleram o ritmo cardíaco e aumentam a velocidade de condução pelo nódulo aurículoventricular se utilizam em casos de bradicardia e bloqueio aurículoventricular de tipo I

(Caen et al. 2008), no entanto doses baixas apresentaram um efeito de bradicardia “*bradicardizante*” paradoxal devido ao bloqueio de receptores muscarínicos inibidores (Montano et al. 1998).

O conjunto de dados não revelaram toxicidade em relação a alterações morfológicas, fisiológicas e de densidade celular, bem como de viabilidade mitocondrial das frações testadas e nos tempos de 24 e 48 horas de incubação.

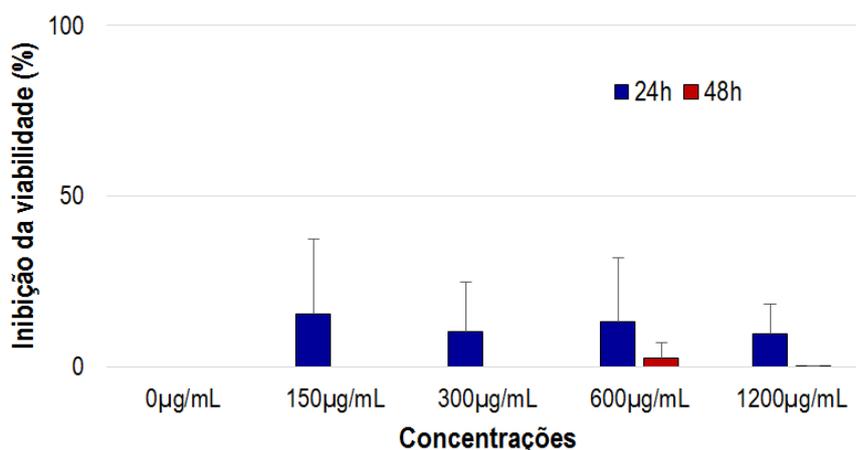


Figura 19. Comportamento da viabilidade de células cardíacas após tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*.

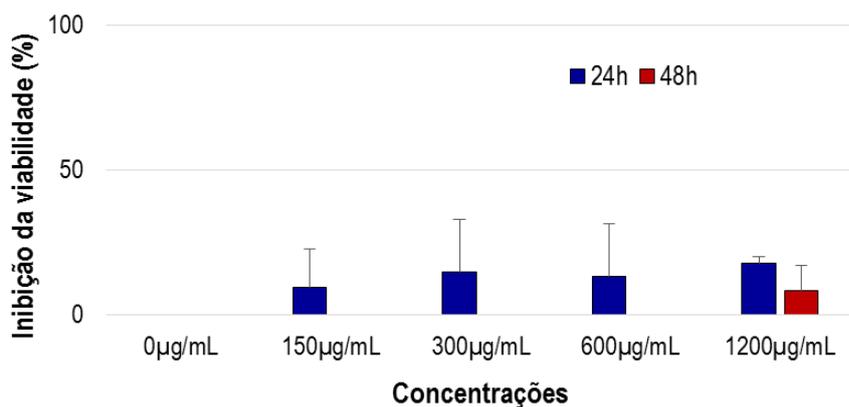


Figura 20. Comportamento da viabilidade de células cardíacas após tratamento com o extrato hidroalcoólico a 25% de sementes de *Pouteria mammosa*.

#### **4.2.2 Toxicidade aguda oral em ratos tratados com os extratos aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de *Pouteria mammosa* pelo Método das Classes de Toxicidade (CTA)**

Entre os indicadores importantes para a determinação da toxicidade de qualquer substância estão a determinação das variações da massa corporal e a avaliação das manifestações clínicas, pois permitem conhecer danos associados a lesões em órgãos e sistemas de órgãos, que trazem como resultado alterações nas funções vitais. Além disso, se descreve que toda substância tóxica produz alterações anatômicas e fisiológicas, que se manifestam em modificações no quadro clínico geral, que dependem diretamente da severidade e extensão da lesão, assim como dos sistemas de órgãos envolvidos, duração da exposição, concentração da substância no sangue, idade e saúde prévia geral do animal (Hayes 1994).

Ao realizar o ensaio foi observado que a dose administrada de *P. mammosa* (2000 mg/Kg) não provocou mudanças nos sinais clínicos dos ratos desde 24 até 72 horas após administração. Depois deste período, um dos animais apresentou pouca resposta aos estímulos e subseqüentemente foi ao óbito. Os outros dois ratos foram submetidos a uma estrita observação e rigorosa supervisão clínica durante os 14 dias do estudo. Não apresentaram nenhuma alteração, nem irregularidade nos sinais clínicos.

No caso do extrato hidroalcoólico a 25%, o primeiro nível de dose (300 mg/Kg) não resultou em mudanças significativas referente aos sinais clínicos nos ratos. Dois dias mais tarde (48 horas após a primeira administração) foi administrada a dose superior (2000 mg/Kg) a outros três animais que morreram. Um rato morreu depois das seis horas tendo apresentado cianose, pouca resposta a estímulos e fezes soltas (diarreia) antes da morte. Os outros dois ratos foram ao óbito sete e 12 horas respectivamente depois da administração, mostrando sinais clínicos de hemorragia.

Na necropsia os animais não mostraram alterações macroscópicas dos órgãos, com exceção do rato tratado com dose de 2000 mg/Kg do extrato aquoso de *P. mammosa*, que apresentava o estômago aumentado de tamanho devido a gases. Observou-se além disso exsudado fibrinoso e o ceco distendido, o que pode ser atribuído à existência de glicosídeos cianogênicos contidos neste extrato.

Segundo Alemán et al. 1998 e 2000 assim como Gad et al. 2007, a massa corporal é o indicador mais sensível em um modelo animal como resposta a um efeito adverso. Outros autores como Mosberg e Hayes (1989), têm argumentado que variações referentes à massa corporal são resultado da alta sensibilidade deste parâmetro a substâncias químicas com baixa

toxicidade. Considera-se que entre os indicadores que fornecem mais informação nos estudos toxicológicos se encontra a rápida perda de massa corporal (aproximadamente de 15 a 29% num período de cinco a sete dias) (CCAC 1993; HMA 1999).

Observou-se que a massa corporal não foi afetada após a administração dos extratos (Figura 21 e Figura 22), pois mostrou um aumento normal em correspondência com os valores de referência padrões para o uso e tratamento de animais de laboratório, em relação à espécie utilizada (CCAC 1993; Wallace-Hayes 1994; HMA 1999). Quando se analisou esta variável no extrato aquoso (Figura 21), no caso do grupo tratado com *P. mammosa*, o ganho de massa corporal foi de 47,40 g (21,61%) e um aumento na massa de 23,97 g (representando 11,31%) foi observado no grupo controle. Estes resultados foram corroborados por análise estatística sendo encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05\%$ ) no teste não pareado de “t” com a correção de Welch. O grupo tratado com *P. mammosa* a 2000 mg/Kg assimilou a dose máxima de 2000 mg/Kg.

O extrato hidroalcoólico de *P. mammosa* a 25% provou ter um nível superior de toxicidade porque a dose máxima assimilada pelos ratos foi de 300 mg/Kg (Figura 22). O grupo controle apresentou um aumento de 27,40 g até o final do estudo que representa um ganho de peso de 12,44% e os animais do grupo tratado tiveram um aumento médio de 34,53 g representando um ganho de peso 14,01%. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo de controle quando realizada a análise estatística. Quando se administrou a dose de 2000 mg/Kg do extrato hidroalcoólico a 25% de *P. mammosa* todos os animais morreram. O ganho de peso foi evidente em todos os animais incluídos no estudo e foi maior no grupo tratado com extratos de *P. mammosa* em ambas as formas, aquoso e hidroalcoólico a 25%.

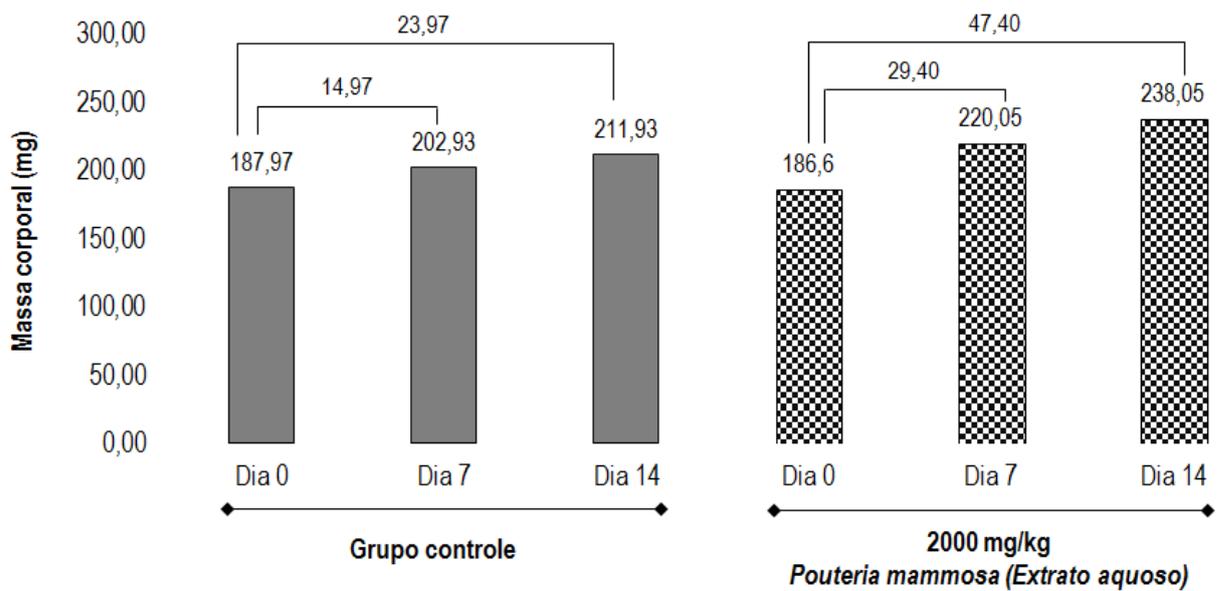


Figura 21. Comportamento da massa corporal dos ratos no ensaio de Toxicidade Aguda Oral pelo Método das Classes (CTA) do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist (Mammei ou Zapote). Os números sobre as linhas horizontais representam as médias do ganho de massa corporal em miligramas.

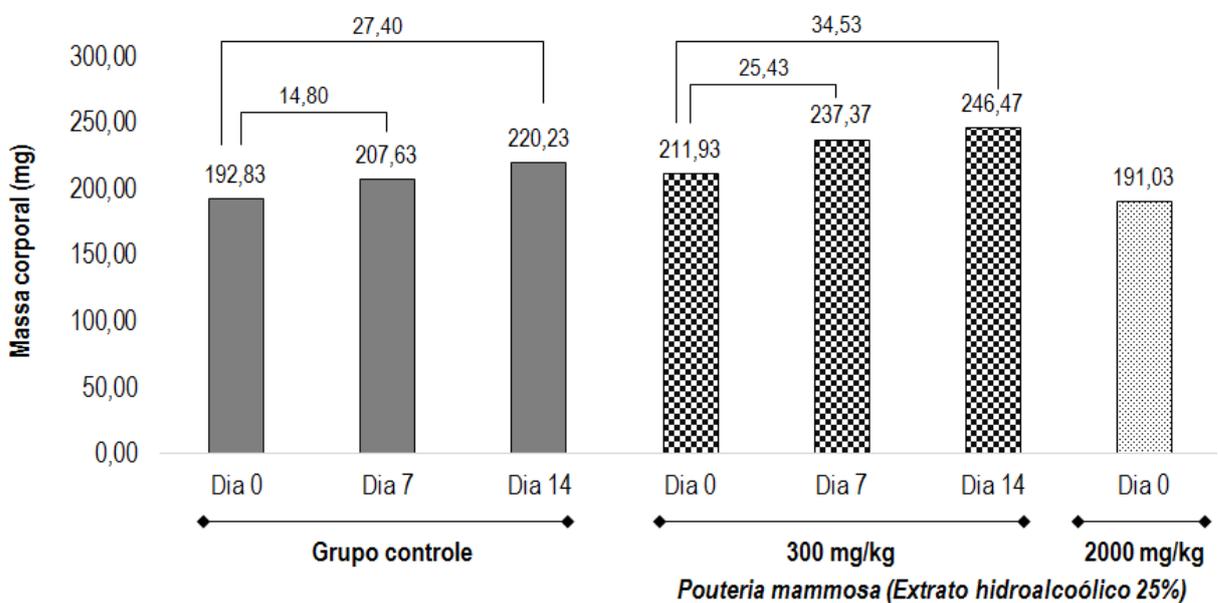


Figura 22. Comportamento da massa corporal dos ratos no ensaio de Toxicidade Aguda Oral pelo Método das Classes (CTA) do extrato hidroalcoólico a 25% bruto de sementes de *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist (Mammei ou Zapote). Os números sobre as linhas horizontais representam as médias do ganho de massa corporal em miligramas.

Este efeito observado para as variações da massa corporal é consistente com os resultados obtidos por Petit et al. 1995; Sharma et al. 1996; Rao et al. 1996; Elmnan et al. 2012, os quais estudaram os efeitos de sementes de feno-grego (*Trigonella foenum-graecum* L.) sobre o metabolismo de ratos. Eles relataram que as saponinas aumentaram o consumo de alimentos, resultando assim em aumento de ganho de massa nos ratos. No estudo fitoquímico (químico-qualitativo) de *P. mammosa* (Tabela VII) determinou-se que ambos os extratos, aquoso e hidroalcoólico a 25% continham saponinas em intensidades semelhantes, o que poderia justificar o mesmo efeito no presente estudo. Coincidentemente, um resultado análogo foi obtido em organismos invertebrados estudados por Carriço et al. 2014 quando ao estudarem o efeito de *P. mammosa* (publicado com a sinônimia *Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore e Stearn) nos imaturos de *C. putoria*, os autores perceberam que os grupos tratados com o extrato aquoso de folhas resultaram em um aumento no peso corporal das larvas deste díptero.

O grupo tratado com extrato hidroalcoólico a 25% de *P. mammosa* mostrou a mesma evidência para os três ratos mortos na dose utilizada de 2000 mg/Kg: estômago dilatado com paredes sangrentas e cianóticas, intestino edematoso e hemorrágico. Esses resultados poderiam ser esperados considerando a abundância de alcaloides observada na composição química deste extrato hidroalcoólico mostrado no controle químico qualitativo (Tabela VII). Algumas substâncias alcaloides de plantas podem atuar sobre os receptores colinérgicos em algumas junções neuroefetoras (atuando como agente colinomimético) e estimular significativamente os plexos mesentérico e entérico interno do trato gastrointestinal digestório. Eles também podem induzir secreções traqueobrônquicas e estimular a musculatura lisa brônquica, resultando em intensa broncoconstrição e redução da capacidade vital (Brunton et al. 2011).

Considerando todas as evidências obtidas neste ensaio o extrato aquoso bruto de *P. mammosa* foi categorizado como **Não Classificado (CTA 5)**, segundo estabelecido pela Diretriz 423 da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OCDE). No entanto, devido à ocorrência da morte de um animal e a manifestação de vários sinais clínicos, sugere-se a avaliação da toxicidade subcrônica por dose repetida durante 28 dias. O extrato hidroalcoólico a 25% na dose de 2000 mg/Kg apresentou sinais clínicos de toxicidade e morte de todos os animais e lesões graves nos órgãos e sistemas de órgãos. O extrato foi classificado como: **Perigoso (CTA 4)**, com uma  $DL_{50}$  na faixa de entre 300 e 2000 mg/Kg.

#### 4.2.3 Potencial irritante do contato com a pele de ratos tratados com os extratos, aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de *Pouteria mammosa*

Ao avaliar o efeito dos extratos aquoso e hidroalcoólico a 25% sobre a pele mediante o teste de Irritabilidade Dérmica, evidenciou-se que os coelhos não apresentaram sinais de irritação ou edema. A pele estava intacta quando os emplastos foram removidos e se manteve assim durante as 72 horas posteriores do estudo. O Índice de Irritação Cutânea de ambos os extratos aquoso e hidroalcoólico 25% de sementes de *P. mammosa* foi igual a "0". O peso corporal dos coelhos, principal parâmetro medido para avaliação de uma injúria ao animal, não foi afetado em nenhum caso depois da aplicação dos extratos (Tabela VIII). Observou-se um aumento normal de peso corporal, correspondente com os valores de massa corporal estabelecidos para animais de laboratório em relação a esta espécie segundo o CCAC 1993 e HMA 1999.

Tabela VIII. Avaliação do comportamento da massa corporal e do aparecimento de eritema e edema em coelhos (fêmeas) da linha Nova Zelândia durante o ensaio de Irritabilidade Dérmica dos extratos, aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de Zapote (*Pouteria mammosa* (L.) Cronquist).

Extrato	Animais	Massa Inicial (kg)	Massa final (kg)	Eritema				Edema			
				1h	24h	48h	72h	1h	24h	48h	72h
Aquoso	1	1.910	2.043	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	1.900	2.080	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	2.120	2.300	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidroalcoólico 25%	1	2.013	2.146	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	2.121	2.350	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	2.341	2.450	0	0	0	0	0	0	0	0

Nenhum dos extratos induziu sinais clínicos adversos aparentes nos animais quando aplicados na pele, demonstrando que estes extratos de sementes de *P. mammosa* podem ser utilizados sem reações secundárias em órgãos internos. Ambos os extratos foram classificados como potencialmente **Não Irritantes**, de acordo com a Diretriz 404 da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OCDE), que avalia a irritação/corrosão dérmica aguda das substâncias. Assim em caso de um futuro uso como inseticida não haverá riscos de danos na pele dos funcionários que estejam aplicando o produto ou alguma outra pessoa que

tenha contato. Desta forma as irritações que possam aparecer não serão atribuídas exclusivamente ao produto e sim a uma hipersensibilidade própria dos indivíduos.

#### **4.2.4 Potencial tóxico agudo do contato com a pele de ratos tratados com os extratos, aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de *Pouteria mammosa***

A dose de cada extrato administrada (2000 mg/Kg de massa corporal) a cada grupo experimental específico, não ocasionou mudanças significativas nos sinais clínicos dos ratos durante as primeiras 24 horas. Uma vez transcorrido este tempo, se procedeu a retirar os emplastos com cuidado de não ferir a pele e se lavou bem a área de aplicação não se observando nenhuma mudança aparente, e esta se manteve intacta. Os animais foram submetidos a uma estrita observação e valoração clínica durante todo o período do ensaio. Uma vez transcorridos os 14 dias, os animais foram enviados ao Laboratório de Anatomia Patológica de TOXIMED, onde se realizou a eutanásia. Posteriormente se procedeu ao estudo macroscópico de todos os órgãos, nos quais não foi encontrada nenhuma alteração.

Nos exames realizados pelo Laboratório de Anatomia Patológica não foi encontrada nenhuma alteração anatomopatológica nos órgãos e sistemas de órgãos nos dois animais quando analisados macroscopicamente os seguintes órgãos: coração, pulmões, rins, fígado, estômago, baço e pele. Também não foi observado nenhum sinal clínico atribuído à administração dos extratos aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de *P. mammosa*.

O comportamento da massa corporal nos ratos incluídos no estudo não foi afetado depois da administração de ambos os extratos (Tabela IX). Observou-se um incremento estatisticamente significativo entre as variâncias ( $p > 0,05\%$ ) entre os dias 0, 7 e 14 para todos os animais. Este resultado se corresponde com as Normas de Referência para o uso e cuidado de animais de laboratório em relação à espécie utilizada (CCAC 1993; Alemán 1998 e 2000).

Como resultado do ensaio de Toxicidade Dérmica Aguda, dos animais tratados com os extratos aquoso bruto e hidroalcoólico a 25%, obtidos a partir de sementes de *P. mammosa* que foi realizado segundo a Diretriz N° 402 da Organização para a Cooperação Econômica e o Desenvolvimento (OECD), estes extratos são classificados como **Não Tóxicos** para a pele, após aplicação tópica em dose única nos ratos da linha *Sprague-Dawley*. Este resultado obtido corrobora e reafirma o resultado obtido no teste de Irritabilidade Dérmica, anteriormente apresentado, pelo qual estes extratos podem ser considerados inócuos topicamente por não serem nem tóxicos, nem irritantes ao contato com a pele.

Tabela IX. Variação da massa corporal individual dos ratos tratados com os extratos, aquoso bruto e hidroalcoólico de sementes de *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist no ensaio de Toxicidade Dérmica Aguda.

Extrato	Grupo	Animal	Sexo	Dose	Massa corporal (g)			Variação da massa corporal	
					0 dias	7 dias	14 dias	D7-D0	D14-D0
Aquoso bruto	1	1	F	2000 mg/kg	188,51	211,35	218,72	22,84	30,21
		2			202,72	216,00	230,29	13,28	27,57
		3			197,17	212,41	228,75	15,24	31,58
		4			184,83	210,50	221,85	25,67	37,02
		5			193,40	216,58	227,52	23,18	34,12
	2	1	M	2000 mg/kg	242,45	264,29	287,95	21,84	45,50
		2			259,30	283,47	291,74	24,17	32,44
		3			259,35	295,86	315,08	36,51	55,73
		4			264,69	288,44	319,68	23,75	54,99
		5			256,68	278,50	311,83	21,82	55,15
Hidroalcoólico a 25%	1	1	F	2000 mg/kg	200,65	210,78	228,68	20,13	38,03
		2			180,78	197,78	210,25	17,00	29,47
		3			174,76	193,22	208,53	18,46	33,77
		4			194,46	210,34	221,68	15,88	27,22
		5			171,50	179,70	191,65	18,20	30,15
	2	1	M	2000 mg/kg	248,04	288,48	308,40	30,44	50,36
		2			290,54	330,79	349,52	30,25	58,98
		3			251,35	262,33	275,90	20,98	44,55
		4			301,74	325,08	358,56	35,34	68,82
		5			274,12	304,81	331,62	30,69	57,50

#### 4.2.5 Efeitos do tratamento por contato com os olhos de ratos dos extratos aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de *Pouteria mammosa*

Como resultado da aplicação dos extratos aquoso e hidroalcoólico a 25% de *P. mammosa* no Teste de Irritabilidade Oftálmica, determinou-se que o índice de Irritação Ocular (IIO) foi de 10,5 no caso do extrato aquoso e ligeiramente superior no extrato hidroalcoólico a 25% (IIO = 15,3). Esta diferença de IIO entre um extrato e outro se justifica pela presença de etanol (substância desidratante) como parte da natureza do extrato hidroalcoólico a 25%. O índice para ambos os casos está dentro dos limites aceitáveis, conforme definido por García-Simon et al. 1988. Evidenciou-se assim, que os efeitos sobre os olhos eram

reversíveis dentro de 96 horas para aqueles que ocorreram na conjuntiva, 72 horas para aqueles que ocorreram na íris, e 48 horas para aqueles na córnea (Tabela X).

Tabela X. Número de danos oftálmicos em coelhos (fêmeas) da linha Nova Zelândia causados pelos extratos, aquoso e hidroalcoólico a 25% de sementes de *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist (Zapote) no Teste de Irritabilidade Oftálmica para determinação do Índice de Irritação Ocular.

Horas	Lesões observadas no grupo tratado com o Extrato Aquoso de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> .			Lesões observadas no grupo tratado com o Extrato Hidroalcoólico a 25% de sementes de <i>Pouteria mammosa</i> .		
	Conjuntiva	Íris	Córnea	Conjuntiva	Íris	Córnea
1	34	20	40	26	20	110
24	18	10	10	24	10	20
48	12	5	0	12	0	0
72	8	0	0	8	0	0
96	0	0	0	0	0	0
Total	72	35	50	70	30	130
Total General de Observações			157			230
Índice de Irritabilidade Ocular			10,5			15,3

O comportamento na variação da massa corporal nos coelhos não foi afetado após a administração dos extratos para as faixas estabelecidas para os animais de laboratório em relação a esta espécie segundo o CCAC 1993 e HMA 1999, o que quer dizer que a aplicação dos extratos não gerou distúrbios nos animais que os impedissem de se alimentarem (Tabela XI). De forma geral não houve sinais clínicos evidentes ou mudanças no comportamento dos animais associados com a administração dos extratos.

Tabela XI. Comportamento da massa corporal dos coelhos (fêmeas) da linha Nova Zelândia entre o início e final do estudo de Irritabilidade Oftálmica dos extratos aquoso bruto e hidroalcoólico a 25% de sementes de *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist.

Animais	Extrato aquoso bruto de sementes de <i>Pouteria mammosa</i>		Extrato hidroalcoólico a 25% de <i>Pouteria mammosa</i>	
	Peso Inicial (kg)	Peso final (kg)	Peso Inicial (kg)	Peso final (kg)
1	1.925	2.345	1.910	2.051
2	1.988	2.480	1.900	2.090
3	2.320	2.610	2.120	2.306

Ambos os extratos obtidos a partir de sementes de *P. mammosa* causaram danos leves e reversíveis nas estruturas oftálmicas. Como é comum na maioria das substâncias, com exceção da água, que ao entrarem em contato com os olhos provocaram algum tipo de perturbação

considerando, entretanto a reversibilidade dos danos e o valor calculado do Índice de Irritação Oftálmica, que ambos os extratos foram classificados como **Ligeiramente Irritantes**, de acordo com a Diretriz 405 da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OCDE), que avalia a irritação/corrosão ocular aguda. Esta classificação permite o uso, manufatura e manipulação do produto.

Considerando o fato de que o extrato hidroalcoólico a 25% de sementes de *Pouteria mammosa* foi classificado como **Perigoso** no Teste de Toxicidade Aguda pelo Método das Classes estrategicamente os estudos de aplicabilidade (atividade inseticida) da planta serão feitos exclusivamente com o extrato aquoso bruto.

#### **4.3 Avaliação da atividade inseticida de *Pouteria mammosa* em cinco espécies de Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria*, *Cochliomyia macellaria* e *Lucilia cuprina*) e *Musca domestica* (Muscidae): parâmetros determinantes e significação.**

De acordo com d'Almeida e Ferrero Fraga (2001), quando se trata da eficácia de substâncias ou compostos sobre indivíduos testados, os melhores parâmetros a serem considerados, são a **duração** e a **viabilidade** (inverso da mortalidade) do **período de neolarva a adulto**, pois os períodos larval e pupal são mais influenciados por fatores abióticos como temperatura, fotoperíodo e umidade relativa. Igualmente deve-se considerar que frequentemente acontece uma baixa mortalidade no período pupal, que pode ser explicado pelo fato desse período ser caracterizado por grandes mudanças internas e pouca influência de fatores externos ao metabolismo (Needham 1929).

A eficácia das substâncias que retardam o período de desenvolvimento dos insetos resulta no aumento da quantidade de dias em que o imaturo se encontra inofensivo ante ao ataque de algum inimigo natural. O parasitismo tem sido uma das grandes interações biológicas que mais comumente tem sido estudada em ecologia de populações de insetos e para facilitação do controle natural (Cappuccino 1995; Carvalho et al. 2005a,b; Barbosa et al. 2008a,b, 2010).

Ao se avaliar o **parâmetro massa** corporal após aplicação de uma substância sobre larvas de dípteros muscoides ou na dieta, dependendo da espécie a estudar, três formas diferentes podem influenciar: **1:** não interferir no processo de ingestão (nem induzir, nem inibir), de tal forma a não gerar variações nesta variável (Silva 2009; Lopes 2010); **2:** provocar diminuição da massa corporal das larvas por inibição da alimentação (Cabral et al. 2007a,b) ou

3: aumentar a massa das larvas que abandonam a dieta (Mendonça et al. 2011; Carriço et al. 2014) por estimulação da ingestão (sobre alimentar) pela presença na dieta de substâncias indutoras como saponinas (Petit et al. 1995; Sharma et al. 1996; Rao et al. 1996; Elmnan et al. 2012).

As larvas de dípteros muscoides somente irão abandonar a dieta à procura do substrato de pupação se o alimento estiver disponível para todos ou se na competição pela obtenção deste permitir a ingestão de quantidades suficientes, bem como pela escassez na qualidade dos nutrientes essenciais para o desenvolvimento das mesmas. Larvas que permanecem mais tempo na dieta se alimentando, buscam compensar a falta de tais nutrientes (Santos e Moya-Borja 1997), assim estendem o **estágio larval**, pois as larvas procuram alcançar um peso ideal para pupar. Ainda quando Hanski (1987) ressaltou que alguns dípteros necrófagos apresentam a estratégia de pupar, mesmo com baixo peso, para que dessa forma consigam minimizar os efeitos deletérios da competição. Outros autores expõem que apenas os indivíduos que atingirem o peso larval mínimo para a pupação, característico para cada espécie, terão condições de prosseguir o seu desenvolvimento e originar adultos viáveis (Levot et al. 1979; Reis et al. 1994).

O parâmetro **razão sexual**, que determina as proporções fêmeas *versus* machos, foi determinado para estabelecer conclusões baseadas no preceito estabelecido por Fisher (1930) e Gabre et al. (2005) como indicador da estabilidade dentro da população. Considerando-se que um número maior de fêmeas facilitaria um crescimento populacional, enquanto uma masculinização das colônias, geração após geração, provocaria uma redução significativa nas populações subsequentes.

#### **4.3.1 Efeitos do tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya albiceps***

Uma vez aplicado o extrato aquoso bruto de *P. mammosa* sobre larvas de primeiro instar de *C. albiceps* foi avaliada a variável **massa corporal**. Como se pode conferir na Tabela XII, todos os grupos submetidos ao tratamento (exceto 75%) resultaram com uma massa corporal maior quando comparados com o grupo controle, sendo as concentrações de 10, 5, 100 e 50% nesta ordem, as de uma maior significação estatística ao aplicar o teste de Tukey ( $p < 0,01\%$ ).

Ainda quando no caso particular da espécie *C. albiceps*, muitas vezes se expressa o fenômeno de monogenia que originam só descendentes de sexo feminino (telítoca ou teligênicas) ou em outras ocasiões só nascem indivíduos machos (arrenótoca ou arrenogênicas) e de acordo com Ullerich (1963), os machos não podem influenciar o sexo de suas proles. Queiroz (1991) observou que, além dessa espécie ser bissexual e se reproduzir por monogenia pode originar, numa mesma geração tanto os machos quanto as fêmeas. Na Figura 23, pode-se observar que existe estabilidade na colônia, tanto para os grupos tratados, como para o grupo controle. Por conta deste fenômeno, prefere-se não atribuir nenhum comportamento relacionado à razão sexual das colônias e à exposição frente a alguma substância, porém utiliza-se unicamente para monitorar qualitativamente a estabilidade.

Tabela XII. Efeito sobre a massa corporal das larvas de *Chrysomya albiceps* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*.

<b>Tratamentos</b>	<b>Massa larval Média ±DP (mg)</b>	<b>Intervalo de variação da massa larval (mg)</b>
<i>Controle</i>	80,40 ±15,88 <sup>a</sup>	49,40 - 145,00
<i>Pouteria mammosa 5%</i>	88,78 ±09,45 <sup>c</sup>	59,50 - 104,20
<i>Pouteria mammosa 10%</i>	90,32 ±07,65 <sup>c</sup>	72,75 - 102,60
<i>Pouteria mammosa 25%</i>	81,47 ±12,33 <sup>a,b</sup>	51,00 - 095,20
<i>Pouteria mammosa 50%</i>	87,06 ±14,01 <sup>b,c</sup>	21,80 - 101,00
<i>Pouteria mammosa 75%</i>	83,01 ±10,96 <sup>a,b</sup>	62,00 - 105,60
<i>Pouteria mammosa 100%</i>	85,98 ±07,93 <sup>b,c</sup>	66,20 - 096,80

**DP:** Desvio padrão; **mg:** miligramas.

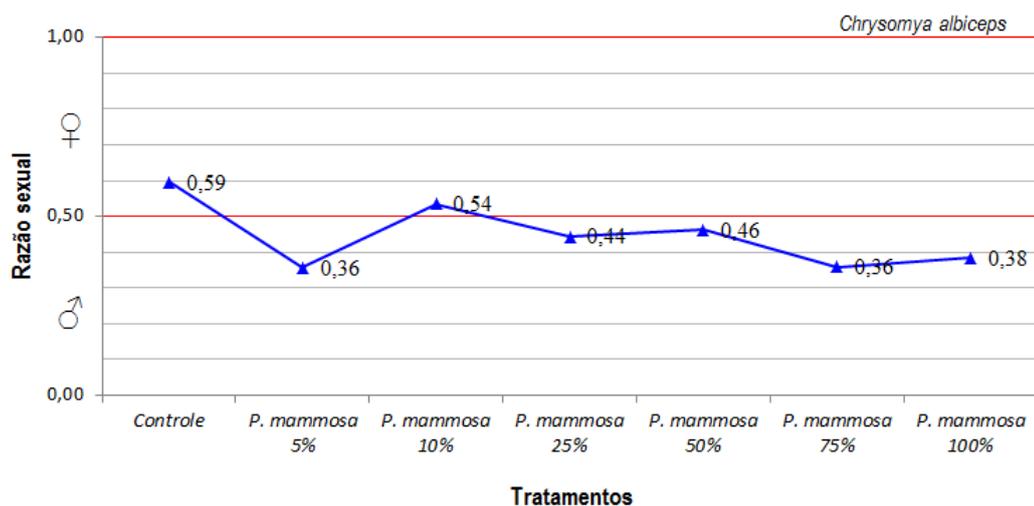


Figura 23. Comportamento da razão sexual de *Chrysomya albiceps* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*.

A duração dos estágios larval e pupal, assim como do período de neolarva a adulto da espécie *C. albiceps* uma vez tratada com o extrato aquoso de *P. mammosa* podem ser observados na Figura 24. No caso do período larval (Figura 24 A), todos os grupos tratados abandonaram a dieta antes do que o grupo controle verificado estatisticamente pelo Teste de Tukey ( $p < 0,01\%$ ) resultado que corresponde ao fato de terem atingido uma massa corporal maior. As concentrações de 5 e 10% foram aquelas onde as larvas foram as primeiras a abandonarem a dieta. Houve quase um comportamento linear salvo no caso da concentração de 25% (4,92 dias), sendo as menores doses aquelas onde a duração foi menor e mais distante do comportamento do grupo controle.

Quando se avaliou o comportamento da duração do estágio pupal, se observou que todos os grupos tratados apresentaram uma duração superior (de 5,69 até 5,98 dias) quando comparados com o grupo controle (5,39 dias). Esta diferença foi estatisticamente confirmada através do Teste de Tukey ( $p < 0,01\%$ ), sendo a concentração de 50% a que mais retardou o tempo de desenvolvimento pupal (Figura 24 B).

O período de neolarva-adulto resultou numa compensação do tempo entre a duração dos estágios larval e pupal, de forma que o tempo que foi reduzido durante o estágio larval resultou em um acréscimo no estágio pupal, dando como resultado final que as doses de 25, 50 e 100% conseguiram manter uma duração similar sem mostrar diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o grupo controle. No caso das concentrações 5, 10 e 75% tiveram uma duração total do período de desenvolvimento inferior ao grupo controle (Figura 24 C).

Coerentemente ao presente estudo foi observado por Baptista-da-Silva et al. (2010), que utilizando o extrato aquoso de *Mentha crispera* nas concentrações de 25, 50 75 e 100% em *C. albiceps*, acharam evidências de que os grupos tratados apresentaram um encurtamento na duração média do período larval. Unicamente encontrou que o tratamento de 25%, não teve o mesmo comportamento que os outros, não apresentando diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao grupo controle. Entretanto não evidenciaram diferenças significativas do extrato de *M. crispera* sobre o estágio pupal de *C. albiceps*. Ademais, Baptista-da-Silva et al. (2010) também observaram o encurtamento do período neolarva-adulto de *C. albiceps* nos três grupos tratados com *M. crispera* evidenciando assim, que há um comportamento similar de resposta desta espécie nos dois estudos.

Outros autores como Abdel-Shafy et al. (2009), não desenham o estudo de forma que possam ser determinadas as durações dos estágios iniciais de desenvolvimento. Seus estudos são mais dirigidos ao estudo da mortalidade.

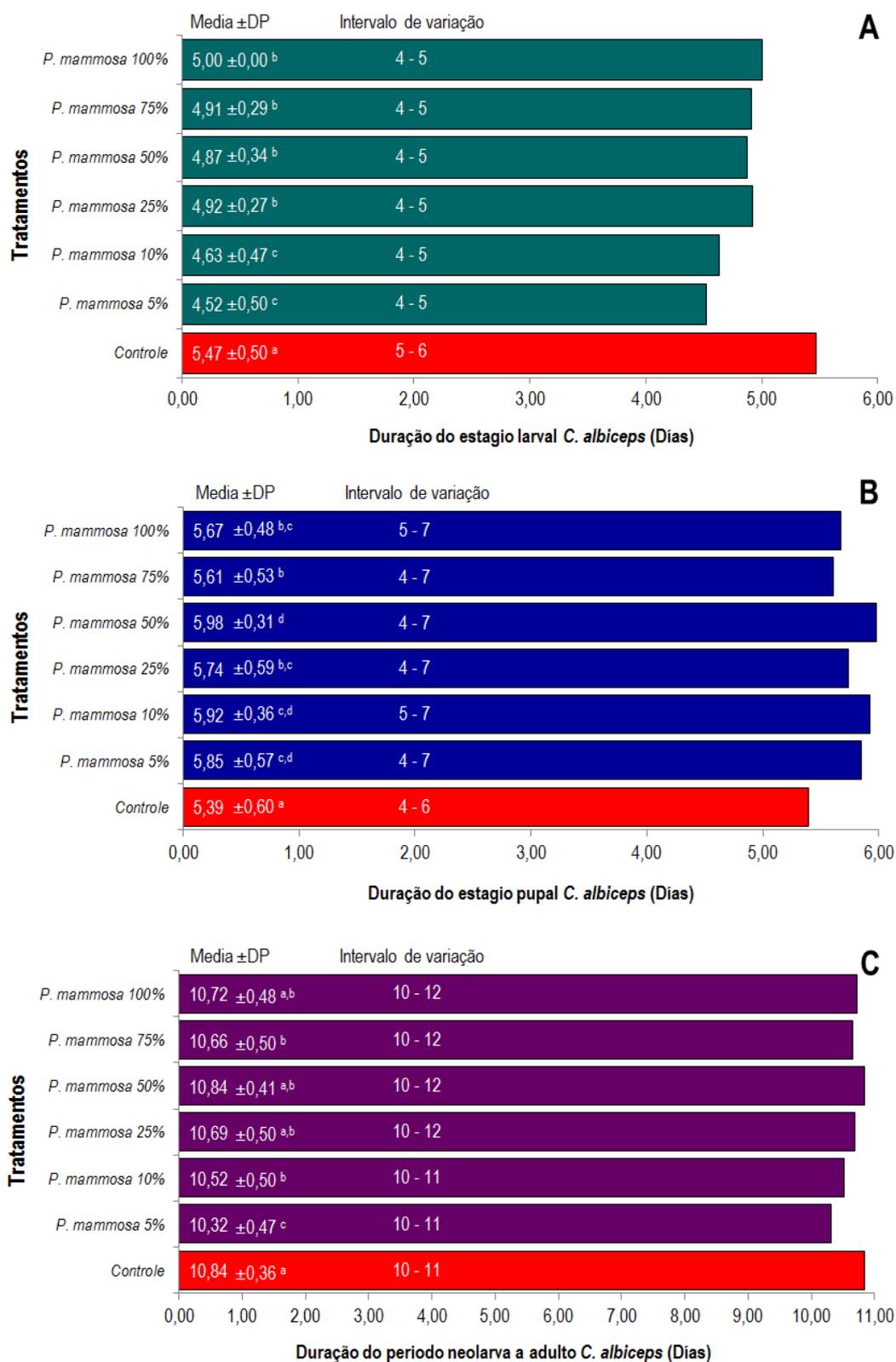


Figura 24. Efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o tempo de desenvolvimento de *Chrysomya albiceps*. A: Estágio larval; B: Estágio pupal; C: Período neolarva-adulto. Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatisticamente significativas no Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey ( $p < 0,01$ ) após ANOVA simples.

A Figura 25 apresenta a mortalidade larval, pupal e do período de neolarva-adulto resultante em *C. albiceps* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa*. Pode-se observar que os efeitos mais marcantes do extrato sobre esta espécie estão relacionados ao período larval, dando como resultado que os índices de mortalidades no período neolarva-adulto sejam similares. Além disso é evidente que *P. mammosa* possui um efeito agudo sobre as larvas de *C. albiceps*, pois em quase todas as doses, todas as larvas que não morreram após serem tratadas com o extrato, conseguiram sobreviver atingindo o estágio de pupa e conseqüentemente emergiram, por este motivo os valores de mortalidade pupal são igual ou próximo de zero em quase todas as doses.

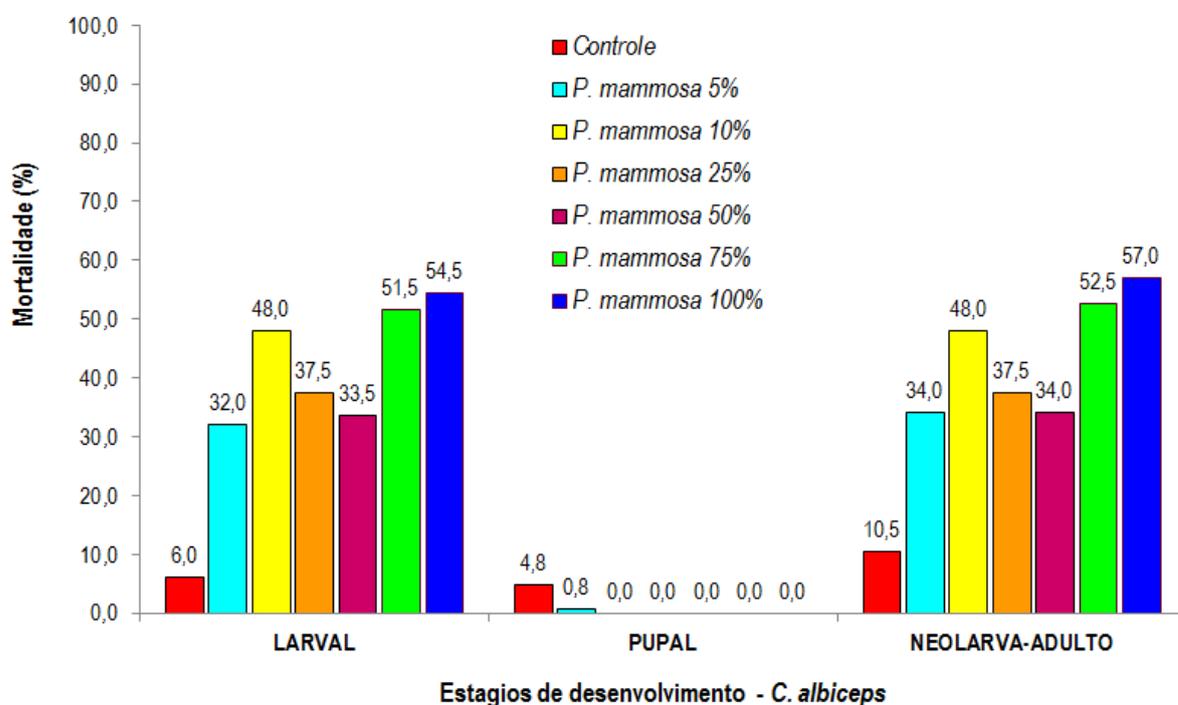


Figura 25. Mortalidade larval, pupal e do período neolarva-adulto de *Chrysomya albiceps* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. Valores em porcentagem são exibidos acima de cada barra.

Este comportamento também é similar aos obtidos nos estudos realizados por Abdel - Shafy et al. (2009), quando testaram a eficácia de extratos de quatro plantas (*Euphorbia aegyptiaca*, *Artemisia herba-alba*, *Artemisia monospera* e *Francoeuria crespia*), em extratos obtidos com solventes diferentes (hexano, etanoato de etila, acetato de etila e etanol) na sobrevivência e desenvolvimento de larvas do terceiro instar (L3) de *C. albiceps*

utilizando as técnicas de Imersão (“*Dipping technique*”) e em Película Fina (“*Thin film technique*”).

Ainda quando todas as concentrações de *P. mammosa* apresentaram uma diferença significativa da mortalidade quando comparadas com o grupo controle, houve algumas mais efetivas do que outras, como 100% (ML: 54,5%; MNL-A: 57% ), 75% (ML: 51,5%; MNL-A: 52,5%) e 10% (ML: 48%; MNL-A:48%)<sup>5</sup>. Não é possível estabelecer uma relação dose/efeito. Ainda assim, este resultado é similar ao obtido por Baptista-da-Silva et al. (2010), que observou que o aumento da concentração do extrato de *M. crispa* ocasionou maior mortalidade em *C. albiceps*, sendo a concentração de 100% a que atingiu maior mortalidade, corroborando aos encontrados neste estudo, onde a concentração mais efetiva também foi 100%. No estudo de Abdel-Shafy et al. (2009), dependendo do extrato e a espécie de planta testada foram encontrados resultados similares ao do presente trabalho, pois esse estudo gerou uma combinação de 32 grupos de resultados variados, o que demonstra uma resposta variada da espécie frente a diferentes metabólitos. A maioria dos extratos testados por Abdel-Shafy et al. (2009), resultaram em uma maior mortalidade na maior concentração estudada, com exceção dos extratos em etanoato de etila de *A. herba-alba* e *A. monospera*; o extrato em acetato de etila de *A. herba-alba* e nos extratos em etanol de *E. aegyptiaca* e *F. crespa*. Entretanto, a mortalidade de 100% dos indivíduos foi atingida nas espécies das plantas: *E. aegyptiaca* e *A. herba-alba* em solvente hexano, para ambas as técnicas e nos solventes etanoato de etila, acetato de etila e etanol quando usada a técnica de película fina. *A. monospera* e *F. crespa* atingiram 100% da mortalidade quando preparadas com os solventes hexano, acetato de etila e etanol, sempre na técnica de película fina. No presente estudo com o extrato aquoso bruto de *P. mammosa* não atingiu o valor de 100% de mortalidade em nenhuma das concentrações aplicadas.

#### **4.3.2 Efeitos do tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala***

Na Tabela XIII, estão apresentados os resultados obtidos para a massa corporal de *C. megacephala* tratadas com o extrato aquoso bruto de *P. mammosa*. Pode-se observar que os grupos tratados em todas as concentrações resultaram em larvas mais leves ao abandonarem a

---

<sup>5</sup> ML: Mortalidade larval; MNL-A: Mortalidade do período de neolarva-adulto.

dieta quando comparados com o grupo controle, que apresentou uma massa larval média de  $74,47 \pm 11,26$  mg, gerando uma diferença estatisticamente significativa quando se comparou a concentração de 5% com o grupo controle e altamente significativa quando se comparou com os demais tratamentos. As concentrações com maior efeito sobre a massa corporal foram 50, 25 e 100%, respectivamente. Quando analisados os intervalos de variação observou-se que a larva mais leve resultou da concentração 10% (28,86 mg) e a mais pesada do grupo controle com 99,0 mg. As outras concentrações geraram larvas entre 30,40 e 90,0 mg.

Tabela XIII. Efeito sobre a massa corporal das larvas de *Chrysomya megacephala* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*.

Tratamentos	Massa larval Média $\pm$ DP (mg)	Intervalo de variação da massa larval (mg)
<i>Controle</i>	74,47 $\pm$ 11,26 <sup>a</sup>	38,00 – 99,00
<i>Pouteria mammosa 5%</i>	57,10 $\pm$ 08,55 <sup>b</sup>	38,33 – 74,42
<i>Pouteria mammosa 10%</i>	49,19 $\pm$ 09,54 <sup>c</sup>	28,86 – 90,50
<i>Pouteria mammosa 25%</i>	45,84 $\pm$ 05,22 <sup>d,e</sup>	33,50 – 58,90
<i>Pouteria mammosa 50%</i>	43,77 $\pm$ 05,83 <sup>e</sup>	32,80 – 53,32
<i>Pouteria mammosa 75%</i>	47,69 $\pm$ 10,42 <sup>c,d</sup>	32,30 – 71,44
<i>Pouteria mammosa 100%</i>	44,58 $\pm$ 05,68 <sup>e</sup>	30,40 – 54,40

DP: Desvio padrão; mg: miligramas.

Corroborando o presente estudo, Cabral et al. (2007a,b) também observaram diferenças significativas na massa corporal das larvas de *C. megacephala* entre o grupo controle e os tratamentos ao aplicar três metabólitos conhecidos como neolignanais: yangambina extraído de *Ocotea duckei* (Lauraceae), burchellina de *Aniba burchelli* (Lauraceae) e grandisina retirado de *Piper solmsianum* (Piperaceae).

Mendonça et al. (2011) quando testaram topicamente os efeitos do látex liofilizado de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) em *C. megacephala* encontraram flutuações no valor médio da massa corporal das larvas, com valores inferiores e superiores ao grupo controle (Controle: 61 mg, concentração 1%: 60,2 mg e a concentração 3%: 76 mg). Contrariamente, no presente estudo foram geradas, em todos os tratamentos, larvas mais leves (médias entre 43,77 e 57,10 mg) que as geradas após a aplicação de látex de Amapazeiro no estudo daqueles autores e em todos os casos as maiores massas larvais foram do grupo controle.

A colônia de *C. megacephala* no presente ensaio mostrou um elevado grau de estabilidade após a aplicação do extrato aquoso de *P. mammosa* (Figura 26), resultando numa razão sexual muito próxima de 0,50 para todos os tratamentos, inclusive para o grupo controle como preconizado por Fisher (1930). No entanto, para esta mesma espécie, Cabral et al. (2007a,b) observaram diferenças com relação à razão sexual, tanto para o grupo controle, quanto para os grupos tratados com as quatro neolignanas testadas, índice que variou desde 0,37 até 0,75.

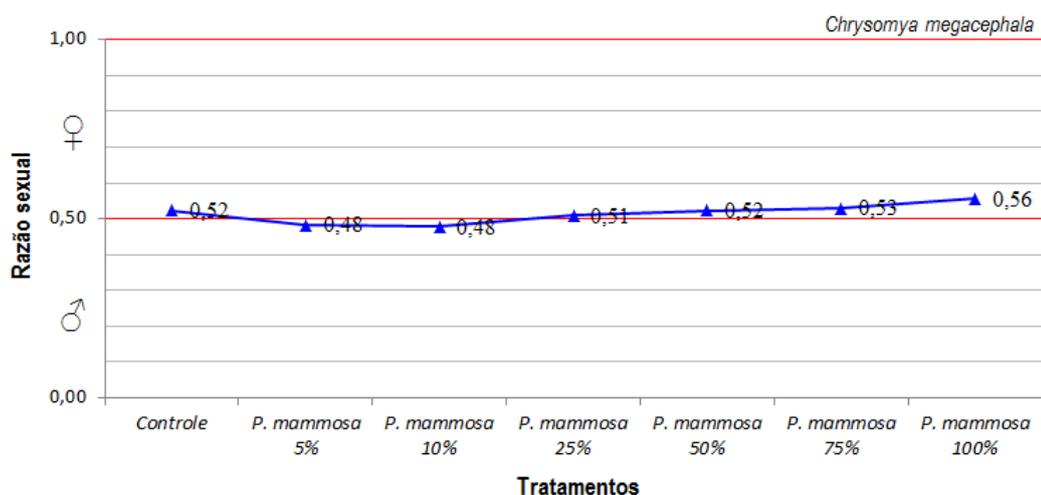


Figura 26. Comportamento da razão sexual de *Chrysomya megacephala* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*.

A duração dos estágios larval e pupal, assim como do período de neolarva-adulto de *C. megacephala* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa*, se encontram representados na Figura 27. A duração do estágio larval foi bem maior em todos os grupos tratados, quando comparados com o grupo controle (Figura 27A), estatisticamente altamente significativo, sendo em todos os casos de dois a três dias mais demorados. Este comportamento pode estar relacionado com o fato das larvas tentarem atingir uma massa corporal ótima para o desenvolvimento seguinte (Santos e Moya-Borja 1997).

O estágio pupal teve um comportamento compensatório, pois quando os tratamentos foram comparados com o grupo controle (6,41 dias) tiveram *a priori*, uma duração de um dia a menos (entre 4,77 e 5,03 dias). Este resultado apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparados os tratamentos com o grupo controle, sendo as concentrações de 25 e 50% aquelas que mais aceleraram o estágio pupal, diminuindo, dessa forma, a duração de 4,77 e 4,81 dias, respectivamente (Figura 27B).

Quando realizada a análise final da duração do período total (de neolarva até adulto) (Figura 27C) que inclui os dois estágios antes analisados, observou-se que todos os grupos tratados com o extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* demoraram um dia a mais para emergir contrário ao grupo controle que demorou em média 11,16 dias. Este resultado possui uma importância para o controle desta espécie, pois o fato das moscas demorarem mais para emergir e estarem em estado imóvel, permite aos parasitoides estabelecer o multiparasitismo e aos predadores ter mais tempo para reduzir o número final de indivíduos na população (Monteiro e do Prado 2000; Milward-de-Azevedo et al. 2004, Carvalho et al. 2005a,b; Santos et al. 2007).

No presente estudo com extrato aquoso de sementes de *P. mammosa* ao analisar a duração do estágio larval foi observado que este diferia dos resultados obtidos por Cabral et al. (2007a) quando avaliaram a atividade biológica de neolignanas; assim como os de Lopes (2010) ao testar compostos obtidos de *Plumbago scandens* (Plumbaginaceae) e com os de Mendonça et al. (2011) ao avaliarem o látex de *P. amapa* que não tiveram evidências de alteração, nem aumento, nem redução do tempo de desenvolvimento deste estágio em *C. megacephala*, não observando diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo controle.

Já para o estágio pupal, nos mesmos estudos de Mendonça et al. (2011) com o látex de amapaceiro e Cabral et al. (2007b), no teste com yangambina não observaram diferenças entre o grupo controle e os diferentes tratamentos. Contrário ao presente ensaio, onde todos os grupos tratados com o extrato de *P. mammosa*, a duração do período pupal em todas as concentrações apresentaram valores inferiores ao do grupo controle, ou seja, a espécie reagiu de forma diferente para os diferentes metabólitos de plantas.

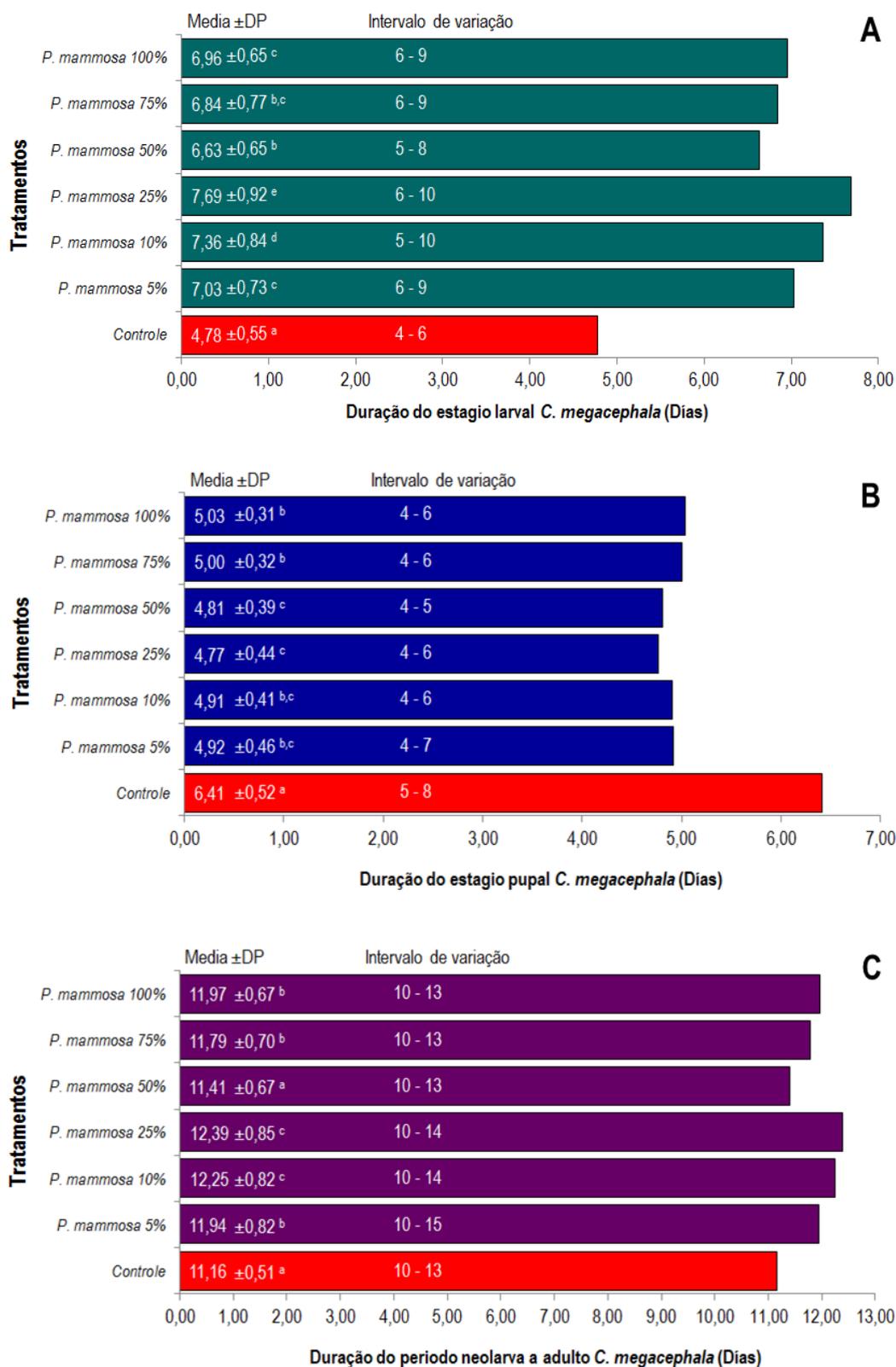


Figura 27. Efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o tempo de desenvolvimento de *Chrysomya megacephala*. A: Estágio larval; B: Estágio pupal; C: Período neolarva-adulto. Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatisticamente significativas no Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey ( $p < 0,01\%$ ) após ANOVA simples.

Ainda tendo apresentado comportamentos diferentes na duração do período pupal, quando analisado o efeito sobre a duração do período total (de neolarva até adulto), os grupos tratados apresentaram valores superiores aos do grupo controle, o mesmo foi exposto por Mendonça et al. (2011) para as duas maiores concentrações (2 e 3%) no estudo com Amapazeiro e no experimento de Cabral et al. (2007b) com o metabólito yangambina. Estes resultados demonstraram que toda vez que um metabólito ou extrato altera a duração do estágio larval, ocorre um mecanismo compensatório no estágio pupal para tentar que a duração do tempo total de desenvolvimento pós-embrionário (período neolarva-adulto) seja pelo menos similar ao normal (controle), mesmo quando nem sempre é possível essa correção temporal sem aparecimento de consequências adicionais, como um incremento na mortalidade ou a presença de indivíduos com malformações dentro da população.

Na Figura 28, pode-se observar os valores de mortalidade em porcentagem dos estágios larval, pupal e do período de neolarva-adulto de *C. megacephala* após o tratamento com diferentes concentrações do extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa*. No estágio larval, todos os grupos tratados apresentaram valores de mortalidade superiores ao grupo controle, sendo as concentrações 5, 25 e 100% as mais efetivas, com 41,0; 37,0 e 31,5% como médias de mortalidade, respectivamente. Foi no estágio larval onde ocorreu a maior influência do extrato, pois no estágio pupal os valores de mortalidade não diferiram e só superou ligeiramente o percentual de mortalidade do grupo controle (10,4%), na concentração de 50% que atingiu o valor de 13,5%.

Sendo assim, a porcentagem de mortalidade acumulada durante o período total (de neolarva até adulto) em todos os grupos tratados continuou superior ao grupo controle (22,5%) e foram as mesmas concentrações que tiveram a maior atividade, com uma ligeira inversão do valor da concentração 25 (43,0) sobre 5 (42,0) e o 100% (37%). Além disso, as concentrações 10, 50 e 75% aumentaram os índices de mortalidade acima de 30%, reduzindo assim as diferenças finais de efetividade entre todos os tratamentos e anulando desta forma a relação proporcional entre o acréscimo da concentração e a mortalidade como uma variável dependente desta.

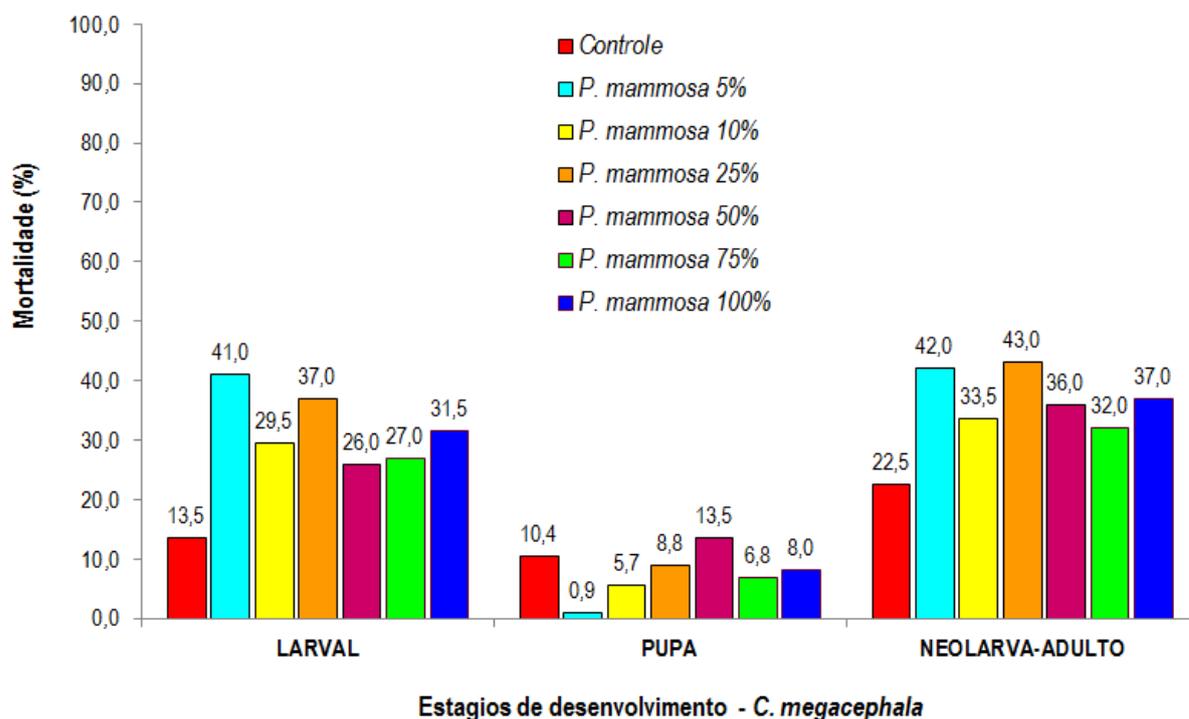


Figura 28. Mortalidade larval, pupal e do período de neolarva-adulto de *Chrysomya megacephala* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. Valores em porcentagem são exibidos acima de cada barra.

Corroborando o presente estudo, a mortalidade do período pupal esteve próxima a 10% no estudo de Cabral et al. (2007a) e os de Mendonça et al. (2011) apresentaram valores que se mantiverem entre 0 e 20%.

Neste estudo, assim como no de Cabral et al. (2007a) com testes com quatro neolignanas, a porcentagem de mortalidade dos grupos tratados foi maior no estágio larval e no período de neolarva a adulto de *C. megacephala*, quando comparados ao grupo controle.

Um acréscimo proporcional na mortalidade com o aumento da concentração foi visualizado por Mendonça et al. (2011) ao testarem o látex de *P. amapa* nesta mesma espécie (aproximadamente 20% na concentração de 0,5% e aproximadamente 50% no tratamento com a concentração de 3%). Este trabalho apresentou resultados que diferem dos alcançados com o extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* sobre *C. megacephala*, pois não mostrou uma dependência direta entre a concentração e as porcentagens de mortalidade expressadas.

Na Figura 29 pode ser observado o número de indivíduos de *C. megacephala* que pós-emergência apresentaram alterações morfológicas após a aplicação tópica do extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa*. Uma mosca após emergir, além de mudar a coloração do

exoesqueleto por reação com o oxigênio do ar, deve esticar (“estender”) as asas em um tempo máximo de aproximadamente 24 horas. Neste estudo, os adultos que resultaram com malformações porque nunca conseguiram esticar as asas.

A concentração com maior número de indivíduos com atrofia de asas foi a de 10%, com 46% indivíduos, o que representa 23% dos tratados sob essa concentração e 3,84% de todos os 1200 indivíduos tratados, independentemente da concentração (Figura 29A). Os demais tratamentos apresentaram também quantidades significativas e crescentes nesta ordem 25% (14/200 indivíduos: 7%), 5% (12/200 indivíduos: 12%), 50% (25/200 indivíduos: 12,5%) e as concentrações 75% e 100% (28/200 indivíduos cada: 14% dos tratados).

Essa frequência de indivíduos com malformações e em especial asas atrofiadas, faz com que estes sejam inofensivos e sem possibilidade de escape frente a ataques de depredadores, como anfíbios, lagartixas, besouros e aranhas (Blanco-Metzle e Laprade 1998), gerando um índice de mortalidade superior por conta da seletividade natural. Na Figura 29 B aparecem representadas de forma comparativa as porcentagens de mortalidade e as porcentagens de mortalidade acumulada frente ao grupo controle de *C. megacephala* após tratamento com *P. mammosa*. Pode-se observar que houve um aumento da mortalidade até em 23% na concentração de 10%, e nas outras concentrações houve acréscimos entre 7% (na concentração: 25%) até 14% (nas concentrações 75 e 100%). Os valores finais de mortalidade ocorreram entre 46 e 56,5%.

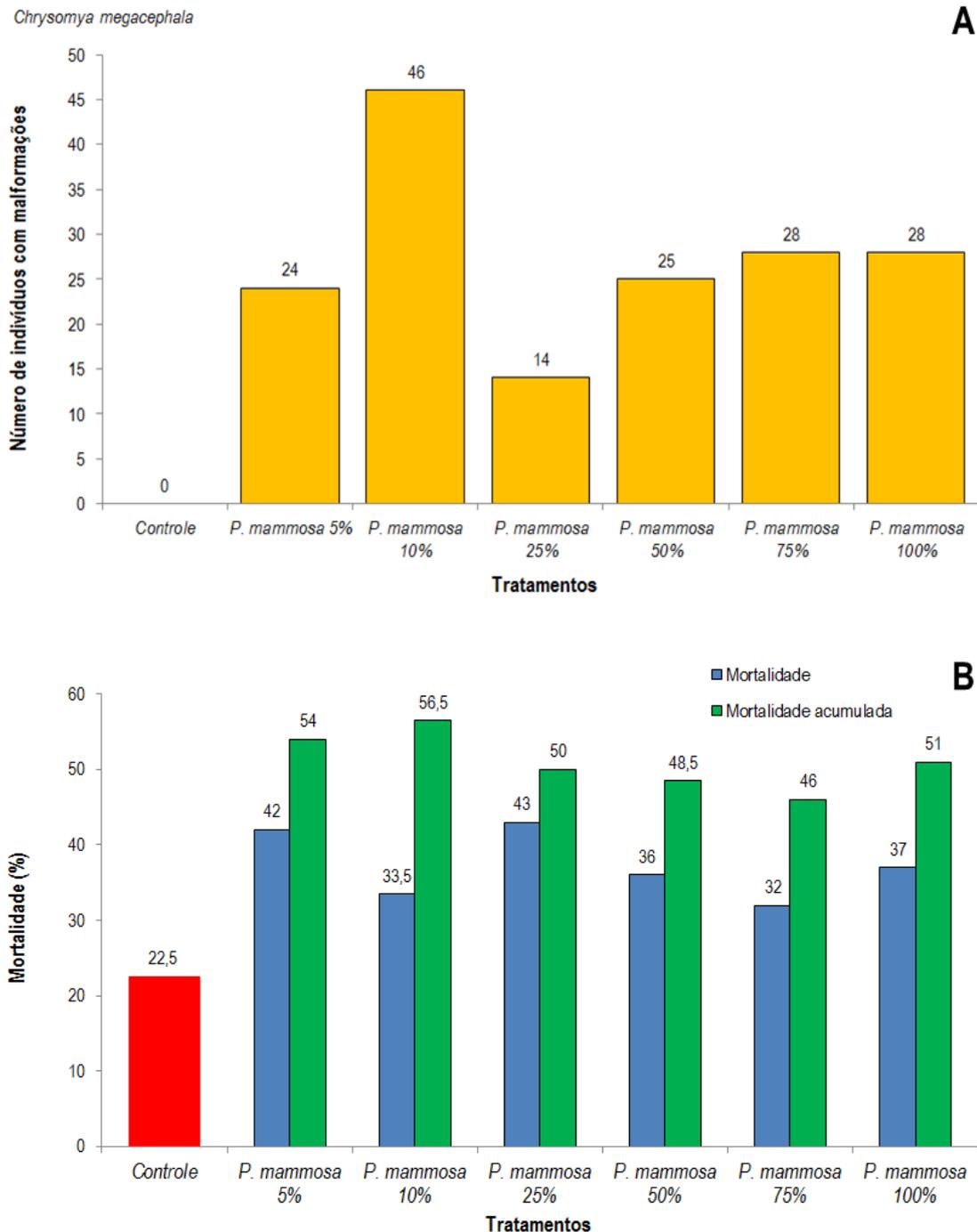


Figura 29. Efeitos pós-emergência de *Chrysomya megacephala* após a aplicação tópica do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. A: Número de indivíduos com malformações nas asas por cada 200 larvas contadas inicialmente em cada tratamento. B: Representação comparativa entre a porcentagem de mortalidade e a porcentagem de mortalidade acumulada frente ao grupo controle.

Outros autores como Cabral et al. (2007b), que testaram um lignoide chamado yangambina em insetos adultos de *C. megacephala*, assim como no trabalho de Salles e Rech (1999) quando avaliaram os efeitos dos extratos de nim (*Azadiractha indica*) e cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (mosca-das-frutas, bicho-das-frutas ou mosca-das-frutas-sul-americana), houve aparecimento de indivíduos nos quais as asas não expandiram em todos os tratamentos. Resultados similares foram relatados por Cabral et al. (1996) e Huang et al. (1996), quando testaram nim em outros insetos alvo. Também Jeong et al. (2001) em seus estudos, utilizando seiva de Espirradeira (*Nerium indicum*) diluída na dieta de larvas de *Helicoverpa assulta* (Guenee, 1852) (Lepidoptera: Noctuidae) relataram uma baixa taxa de fecundidade, este fato ocorreu devido à atrofia das glândulas sexuais dos machos adultos. Entretanto, no presente estudo não foi avaliado este último parâmetro, porém não pode ser descartado o aparecimento de qualquer anomalia.

#### **4.3.3 Efeitos do tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya putoria***

A Tabela XIV mostra o efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* sobre a massa corporal das larvas de *C. putoria* após o tratamento por aplicação tópica. Pode-se observar que o grupo controle apresentou a maior média das massas (50,26 mg) e que as concentrações 5, 10 e 25% apresentam diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o grupo controle quando aplicado o teste de Tukey ( $p < 0,01\%$ ). No caso das concentrações 50, 75 e 100% obtiveram uma média menor do que o grupo controle, entretanto, apresentaram diferenças estatisticamente significativas. O tratamento onde as larvas foram mais leves, foi o de 5%, com uma massa corporal média de 44,72 mg. Ainda quando a concentração de 100% não apresentou diferenças quando comparada com o grupo controle, foi nesta onde se encontrou a larva mais leve, com 15,90 mg de massa corporal e a mais pesada foi no controle com 57,90 mg.

O comportamento da razão sexual nos grupos tratados quando comparados com o grupo controle foi estável (Figura 30), mas foi evidenciada uma ligeira tendência à masculinização dos grupos tratados, sendo mais evidente nas concentrações 25 e 75% onde os índices resultaram em 0,38 e 0,37, respectivamente. A diferença numérica entre estas concentrações e o controle esteve em torno de 0,15 e 0,16.

Tabela XIV. Efeito sobre a massa corporal das larvas de *Chrysomya putoria* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*.

Tratamentos	Massa larval Média ±DP (mg)	Intervalo de variação da massa larval (mg)
Controle	50,26 ±4,53 <sup>a</sup>	28,80 – 57,90
<i>Pouteria mammosa</i> 5%	44,72 ±7,43 <sup>c</sup>	21,05 – 52,62
<i>Pouteria mammosa</i> 10%	47,35 ±6,45 <sup>b</sup>	27,20 – 55,62
<i>Pouteria mammosa</i> 25%	47,92 ±6,47 <sup>b</sup>	29,20 – 55,78
<i>Pouteria mammosa</i> 50%	48,12 ±4,90 <sup>a,b</sup>	33,60 – 53,82
<i>Pouteria mammosa</i> 75%	48,40 ±7,70 <sup>a,b</sup>	24,95 – 55,12
<i>Pouteria mammosa</i> 100%	48,35 ±6,19 <sup>a,b</sup>	15,90 – 55,30

DP: Desvio padrão; mg: miligramas.

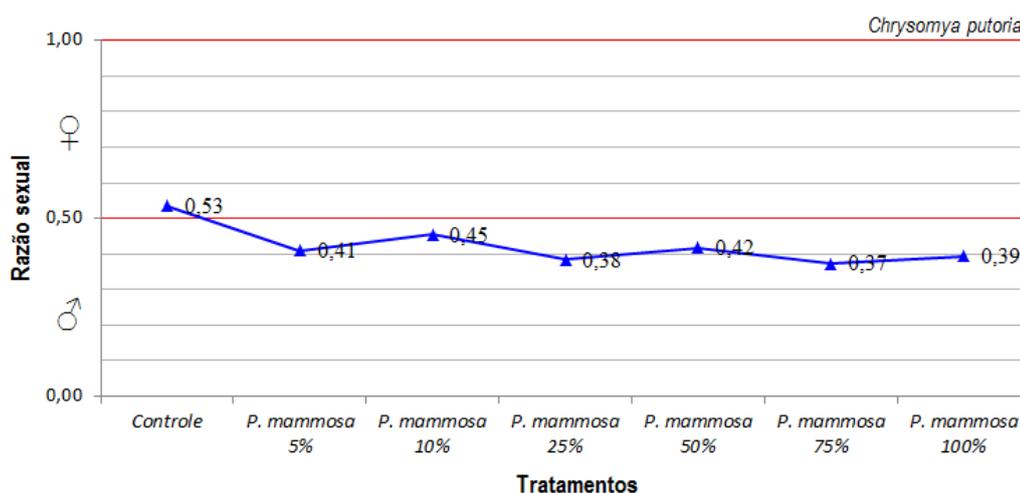


Figura 30. Comportamento da razão sexual de *Chrysomya putoria* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*.

Em coincidência com o presente estudo, Lopes (2010) quando testou o extrato de *Plumbago scandes* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *C. putoria*, verificou que o grupo controle atingiu maior peso com diferença significativa em relação a dois dos grupos tratados com o extrato, sendo as concentrações de 50 e 75%. Enquanto, Silva (2009) testando o látex de *Parahancornia amapa* em *C. putoria*, não observou diferença significativa com relação ao peso entre o grupo controle e os grupos tratados.

O efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* não teve um comportamento da massa corporal dependente do aumento da concentração, resultado contrário ao obtido por Oliveira et al. (2006) ao testarem o potencial inseticida de linhagens de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em *C. megacephala* (linhagem LFB-FIOCRUZ 907). Estes autores observaram a redução da massa corporal das larvas de acordo com o aumento das concentrações (Concentrações em biomassa bacteriana (mg)/massa de alimento(g) - Controle: 50,5mg, 55/25: 50,6mg, 134/25: 50,8mg, 209/25: 49,7mg 326/25 : 46,9mg).

De acordo com Carriço et al. (2014) em estudo equivalente a este, onde avaliaram a atividade biológica do extrato aquoso de folhas de *P. sapota* também no desenvolvimento pós-embrionário de *C. putoria*, não encontraram diferenças estatisticamente significativas na massa das larvas quando comparado com o grupo controle. A concentração que evidenciou menor massa corporal no estudo com o extrato de folhas foi 25% (45,8 mg) contrário ao presente utilizando extrato de sementes que teve a menor massa (44,72) na concentração 5%.

A razão sexual encontrada neste estudo corrobora os do estudo de Carriço et al. (2014), que também encontraram uma estabilidade para todos os insetos utilizados nos experimentos, seguindo os parâmetros estabelecidos por Fisher (1930).

A Figura 31 reflete o efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* sobre a duração dos estágios larval e pupal e do período de neolarva a adulto. *A priori* é evidente que todos os grupos tratados, independente da concentração administrada, encurtaram a duração tanto do estágio larval, como do pupal, gerando como resultado um encurtamento total do período de neolarva-adulto e que em todos os casos a diferença quando comparada com o controle foi estatisticamente significativa quando aplicado o teste de Tukey ( $p < 0,01\%$ ). Para o estágio larval, a concentração 50% acelerou o metabolismo das larvas, apresentando uma duração de 3,92 dias e o grupo controle 5,10 dias (Figura 31A), cerca de 27 horas de diferença.

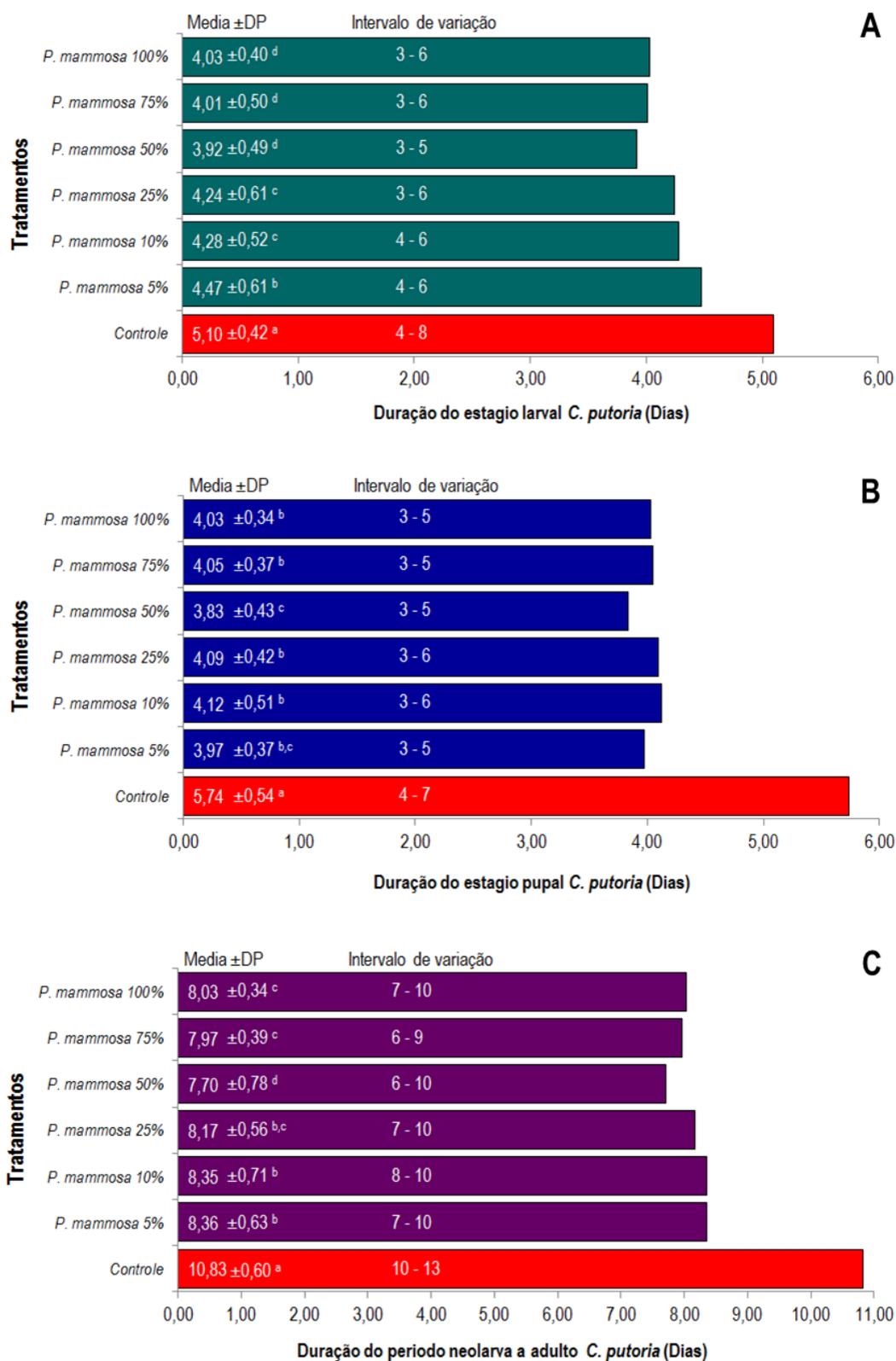


Figura 31. Efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o tempo de desenvolvimento de *Chrysomya putoria*. A: Estágio larval; B: Estágio pupal; C: Período neolarva-adulto. Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatisticamente significativas no Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey ( $p < 0,01\%$ ) após ANOVA simples.

Já no estágio pupal, a concentração de 50% apresentou um encurtamento na duração, com 3,83 dias, muito menor do que o grupo controle (5,74 dias), mantendo a diferença de quase dois dias (Figura 31B). Ao analisar o período total (desde neolarva até adulto), o comportamento continua sendo o mesmo com um encurtamento estatisticamente marcante de todos os tratamentos (de entre sete até em torno de oito dias), quando comparado com o grupo controle, ao aplicar o teste de Tukey ( $p < 0,01$ ), pois alcançou a duração máxima de 10,83 dias. Estes resultados podem sugerir que o extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* possui um efeito estimulador do metabolismo e, por conseguinte, acelerador do ciclo holometabólico (processo de metamorfose) da espécie *C. putoria* (Figura 31C).

Corroborando este estudo, Silva (2009) observou que o tempo de permanência no período larval foi reduzido, e também Lopes (2010) relatou que os valores encontrados para a duração do período pupal nos tratamentos foram inferiores aos encontrados para o grupo controle. Do mesmo jeito referiu que os valores encontrados para a duração do período de neolarva-adulto foram inferiores aos valores do grupo controle.

Diferente aos presentes resultados Oliveira et al. (2006) descreveram que a fase pupal foi mais duradoura nos tratamentos que o grupo controle, no teste com *B. thurigiensis* var. *israelensis* (linhagem LFB-FIOCRUZ 907) em *C. megacephala*. E também não encontraram diferença no período de neolarva-adulto nesta espécie quando colocada em contato com esta bactéria.

Neste estudo foi observado um comportamento similar ao obtido por Carriço et al. (2014) ao testarem o extrato aquoso bruto de folhas de *P. sapota* em *C. putoria*, que também ressaltaram que o extrato acelerou o desenvolvimento larval em todas as concentrações testadas (concentração 5%:  $4,0 \pm 0,2$  dias; concentrações 10% e 25%:  $4,01 \pm 0,4$  dias cada) quando comparadas com o grupo controle que teve uma duração de  $4,8 \pm 0,5$  dias.

Provavelmente, os mecanismos compensatórios permitiram reduzir as diferenças de tempo, quando analisado o período neolarva a adulto fazendo que, mesmo quando houve diferenças significativas entre a duração do grupo controle e as concentrações 10 e 25%, essa diferença (menos de um dia) não fosse tão marcada como no presente estudo (de dois a três dias). Visto assim poderia se dizer que o extrato obtido a partir de sementes possui um efeito maior sobre a duração do período de desenvolvimento pós-embrionário quando comparado ao efeito exercido pelo extrato obtido a partir das folhas de *P. mammosa* sobre *C. putoria*.

Os resultados da mortalidade para os diferentes estágios (larval e pupal) e do período neolarva-adulto podem ser observados na Figura 32. Em todos os estágios e no período total de desenvolvimento as porcentagens de mortalidade do grupo controle para todos os estágios foram inferiores aos dos tratamentos. Para o estágio larval, as concentrações mais efetivas foram 50, 5 e 75% respectivamente nessa ordem, gerando mortalidades de 44,0; 32 e 30,5% quando comparadas com o grupo controle (7,5%).

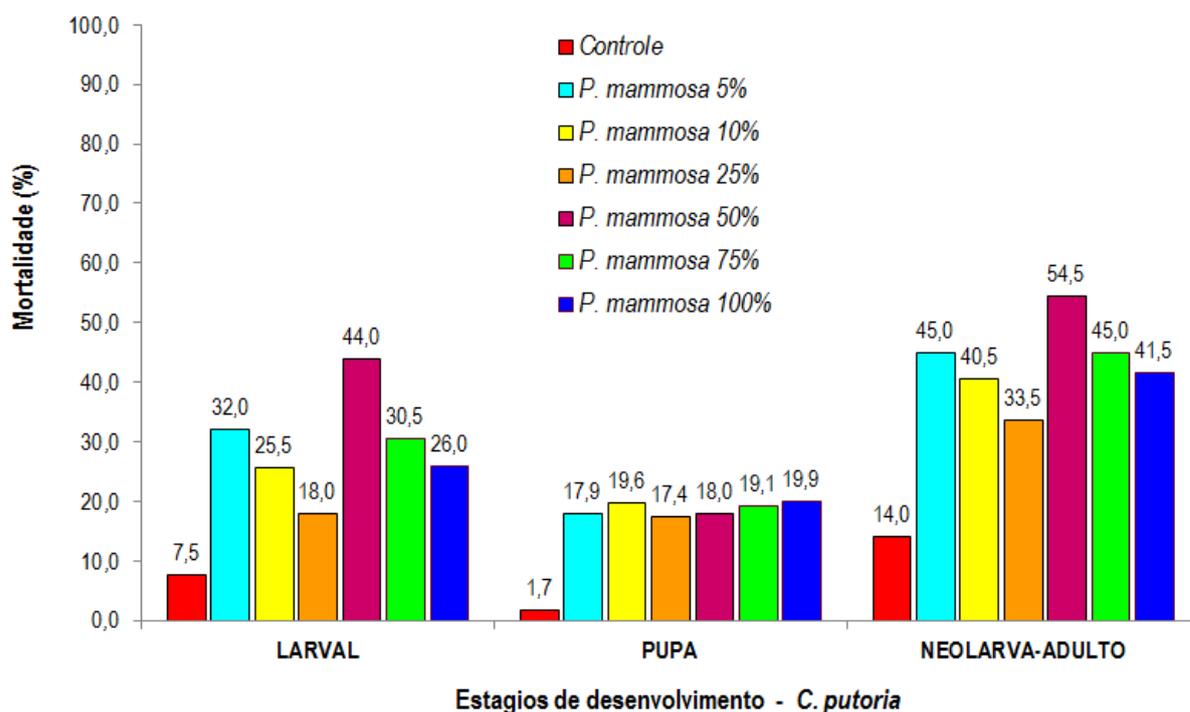


Figura 32. Mortalidade larval, pupal e do período neolarva-adulto de *Chrysomya putoria* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. Valores em porcentagem são exibidos acima de cada barra.

Quando se analisou a mortalidade do estágio pupal, verificou-se que todos os tratamentos se encontravam na faixa entre 17,4 e 19,9%, diferentemente da baixa mortalidade observada para o grupo controle (1,7%), evidenciando assim, um efeito acumulativo de algum metabólito presente no extrato.

Uma vez analisado o período de neolarva a adulto, os tratamentos continuaram apresentando porcentagens de mortalidade acima de 30% (33,5 - 54,5%), superiores em todos os casos quando comparados ao grupo controle, que apresentou 14,0% de mortalidade. Este comportamento da mortalidade demonstra que o extrato aquoso bruto de sementes de

*P. mammosa* possui efeito agudo sobre a fase larval, como de ação transcendente até a fase pupal incidindo muito provavelmente nos valores de mortalidade alcançados.

A Figura 33A, mostra o número de indivíduos com malformações (asas atrofiadas) resultantes de cada tratamento, em todos os casos os valores estiveram acima de 22 (o valor mais baixo na concentração de 75%), equivalente a 11% dos 200 indivíduos tratados nesta concentração. Logo depois as concentrações de 10 e 50% com 24 adultos malformados, equivalente a 12% em cada caso e as concentrações 5 e 100% apresentaram 25 adultos com asas encolhidas cada, equivalente a 12,5%. Em todos os tratamentos a frequência de indivíduos com malformação é muito similar, com exceção da concentração 25%, onde o número de adultos malformados (33) foi marcadamente superior ao resto dos tratamentos e ao grupo controle, representando um 16,5% dos tratados nessa concentração. O número total de adultos incapacitados para voar e sobreviver ao ataque de predadores foi de 153, o que representa um 12,75% do total dos 1200 indivíduos incluídos neste estudo.

O surgimento deste número de indivíduos malformados poderia ser justificado pela hipótese de que o efeito acelerador do metabolismo e da metamorfose observado nos estágios larval e o pupal, mostraram-se marcadamente mais curtos nos grupos tratados do que no grupo controle. Uma aceleração nos processos celulares de replicação, transcrição e tradução implicam necessariamente erros, por não reparação do DNA ou a leitura deficiente do RNAm, que podem se expressar no fenótipo, originando, na progênie, indivíduos com malformações, que os tornam inviáveis.

Contrário ao presente estudo, a mortalidade do estágio pupal no estudo de Lopes (2010) esteve abaixo de 10%. No entanto, os resultados no estudo Silva (2009) poderiam ser considerados mais próximos do teste com *P. mammosa*, em função dos grupos tratados apresentarem mortalidades superiores ao grupo controle e todos estarem acima de 25%.

No estudo equivalente de Carriço et al. (2014) observaram que o efeito do extrato aquoso bruto de folhas de *P. sapota* apresentaram diferenças do presente estudo, pois mostrou um efeito agudo máximo no estágio larval, com muita pouca transcendência sobre o estágio pupal. A maior mortalidade larval nesse estudo foi alcançada na concentração 5% (52,5%) que foi superior à maior mortalidade observada para o mesmo estágio no presente trabalho na concentração 50% (44,0%). Já estas mesmas concentrações (5% no estudo com folhas e 50% no estudo com sementes) com valores máximos nos dois estudos, resultaram num mesmo valor

de porcentagem de mortalidade igual a 54,5% no período de neolarva-adulto. Os grupos controle em ambos os estudos tiveram uma mortalidade inferior aos tratamentos.

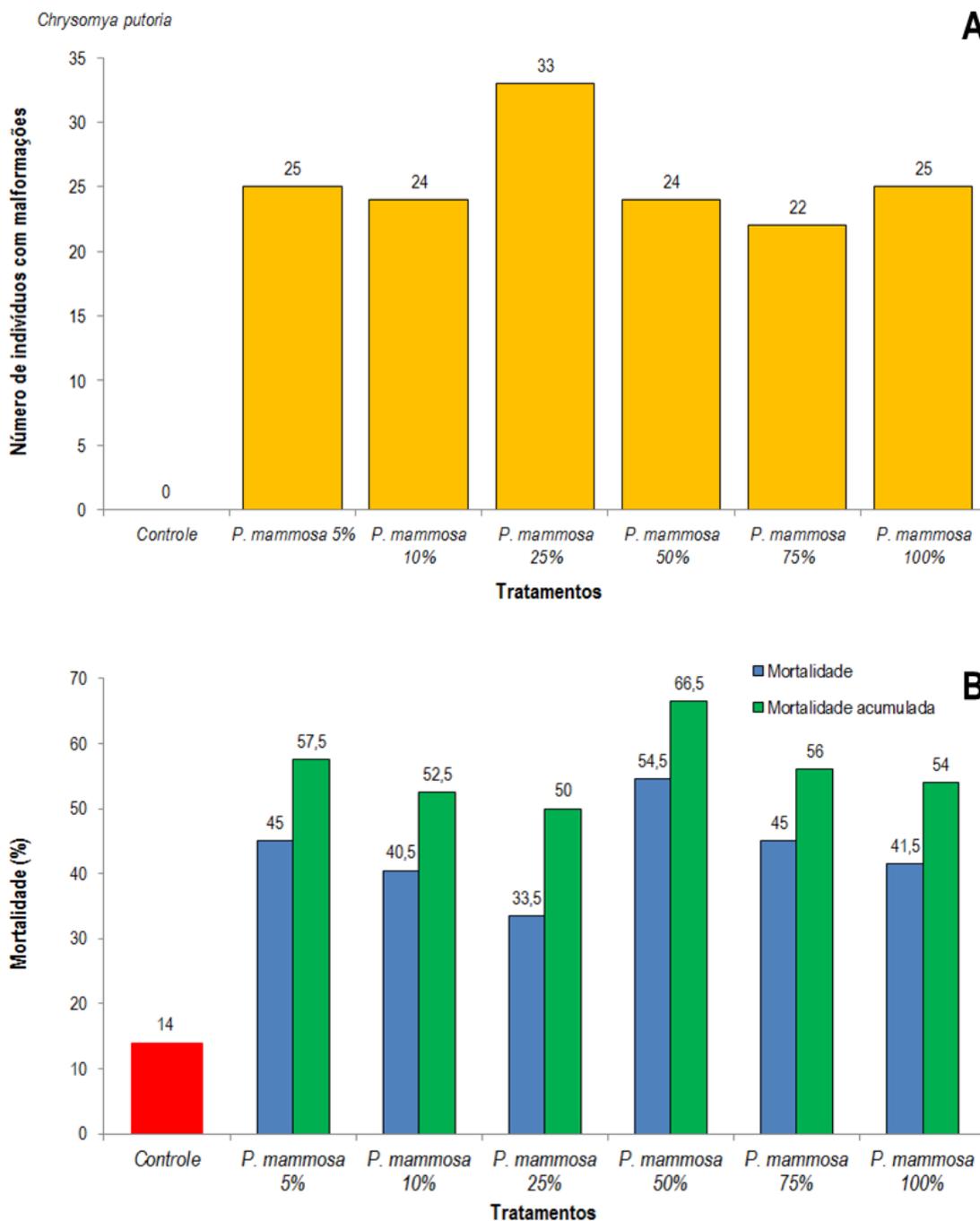


Figura 33. Efeitos pós-emergência em *Chrysomya putoria* após a aplicação tópica do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. A: Número de indivíduos com malformações nas asas por cada 200 larvas contadas inicialmente em cada tratamento. B: Representação comparativa entre a porcentagem de mortalidade e a porcentagem de mortalidade acumulada frente ao grupo controle.

Cabral et al. (2007b), ao testar o lignoide yangambina em adultos de *C. megacephala*, assim como no trabalho de Salles e Rech (1999), quando avaliaram os efeitos dos extratos de nim (*A. indica*) e cinamomo (*M. azedarach*) sobre *A. fraterculus*, observaram o aparecimento de indivíduos nos quais as asas não expandiram em todos os tratamentos.

Este estudo também coincide com os resultados de Cabral et al. (1996) e Huang et al. (1996) ao estudarem nim em outros insetos alvo. Também Jeong et al. (2001) em seus estudos, utilizando seiva de Espirradeira (*N. indicum*) diluído na dieta de larvas de *H. assulta* relataram uma baixa taxa de fecundidade. Este fato ocorreu devido à atrofia das glândulas sexuais dos machos adultos. No presente estudo este último parâmetro não foi avaliado, porém não pode ser descartada a presença de qualquer anomalia.

Esta frequência de aparecimento de adultos com malformações gerou porcentagens de mortalidade acumulada que atingiram valores de até 66,5% na concentração 50% e de 57,5% no tratamento 5%. Em todos os casos a mortalidade acumulada foi superior a 40,0% (Figura 33 B).

Estes resultados indicam que o extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa*, poderia provocar a redução de uma população de *C. putoria* com um marcado efeito pós-emergência, que ecologicamente afetaria muito menos a outros grupos de animais predadores, nos quais a alimentação, perpetuação da espécie e existência dependessem destes insetos.

#### **4.3.4 Efeitos do tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Cochliomyia macellaria***

Os valores determinados de massa corporal das larvas maduras de *C. macellaria* ao abandonarem a dieta para pupar estão representadas na Tabela XV. Observou-se que somente os tratamentos 25 e 75% com os maiores valores, apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o grupo controle, uma vez aplicado o teste de comparação múltipla de médias de Tukey ( $p < 0,01$ ). De forma geral, todos os tratamentos mostraram valores de massa larval numa faixa que pode se considerar estreita e próxima.

Os valores de desvio padrão são bastante razoáveis considerando que se está estudando o comportamento de amostras biológicas vivas submetidas ao efeito de um conjunto de compostos contidos num extrato bruto, só no caso da concentração 5% (DP: 6,44) que o desvio padrão foi maior que os demais, apresentando um valor mínimo mais distante da média. Nesta

concentração pelo menos uma das larvas, que resultou ser a mais leve, teve uma massa de 17,54 mg e também nesta mesma dose encontrava-se a larva mais pesada.

Tabela XV. Efeito sobre a massa corporal das larvas de *Cochliomyia macellaria* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*.

Tratamentos	Massa larval Média ±DP (mg)	Intervalo de variação da massa larval (mg)
<i>Controle</i>	31,32 ±4,03 <sup>a</sup>	20,35 – 37,46
<i>Pouteria mammosa 5%</i>	30,36 ±6,44 <sup>a</sup>	17,54 – 43,45
<i>Pouteria mammosa 10%</i>	31,53 ±3,28 <sup>a</sup>	21,40 – 37,08
<i>Pouteria mammosa 25%</i>	33,99 ±3,75 <sup>b</sup>	20,70 – 40,96
<i>Pouteria mammosa 50%</i>	31,10 ±4,53 <sup>a</sup>	20,60 – 38,04
<i>Pouteria mammosa 75%</i>	33,65 ±2,74 <sup>b</sup>	24,20 – 37,97
<i>Pouteria mammosa 100%</i>	29,50 ±3,67 <sup>a</sup>	21,03 – 36,46

DP: Desvio padrão; mg: miligramas.

Pode se considerar então que o extrato aquoso bruto de *P. mammosa* influenciou pouco sobre a massa corporal das larvas de *C. macellaria*. Do mesmo jeito pode se observar na Figura 34, que todos os grupos tratados tiveram um comportamento bastante estável, com valores de razão sexual próximos a 0,5 e na mesma faixa que o grupo controle como estabelecido por Fisher (1930).

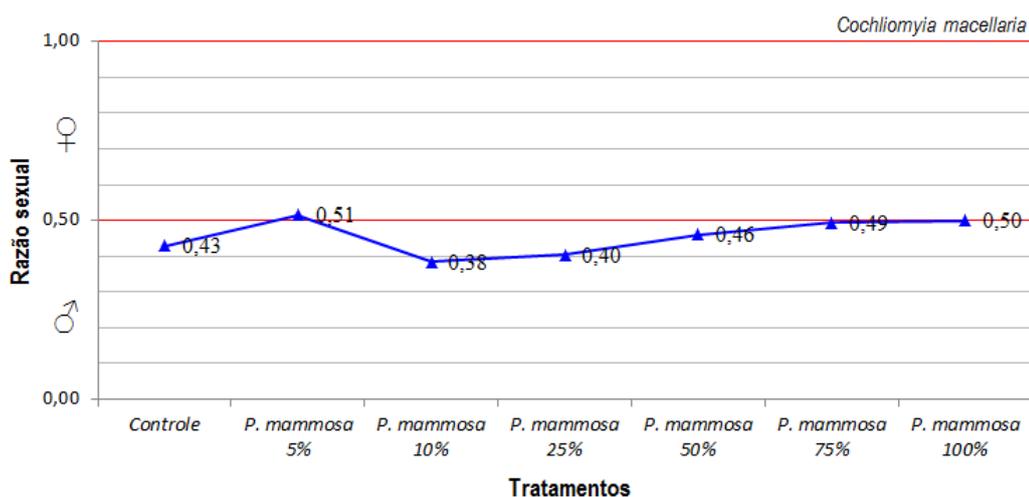


Figura 34. Comportamento da razão sexual na espécie *Cochliomyia macellaria* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*.

Os resultados do presente estudo corroboram o estudo realizado por Silva et al. (2010) no qual não encontraram diferenças significativas na massa corporal das larvas maduras entre os tratamentos e o grupo controle, quando aplicaram o extrato etanólico de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) em larvas de *C. macellaria*.

Além disso, ao testarem o extrato etanólico do caule de *C. linearifolius* em *C. macellaria*, Silva et al. (2010) também não observaram variações nos índices de razão sexual (Controle: 1,52/1, 20mg/mL: 1,2/1, 40mg/mL:1,03/1 e 60mg/mL: 1/1,15) em nenhuma das concentrações quando comparadas com o grupo controle.

A análise da duração dos estágios larval e pupal, assim como do período de neolarva - adulto evidenciou primeiro que no estágio larval não houve um comportamento que pudesse estabelecer uma diferença entre os grupos tratados e o grupo controle (Figura 35 A). Foi possível observar que existem diferenças estatisticamente significativas quando aplicado o teste de Tukey ( $p < 0,01$ ). Sendo inferiores e estatisticamente diferentes as concentrações de 10% (94,44 dias), 5% (4,61 dias) e 50% (4,75 dias), foram contrárias à de 75% que apresentou uma duração de 5,33 dias. As doses 25% (4,89 dias) e 100% (5,21) são as únicas que não diferem do grupo controle.

Já no estágio pupal o comportamento apresentou uma melhor coerência (Figura 35 B), sendo que todos os grupos de *C. macellaria* tratados com o extrato aquoso bruto de *P. mammosa* foram mais demorados durante este estágio de desenvolvimento. Quando aplicado o teste de comparação múltipla de médias de Tukey ( $p < 0,01$ ) as únicas concentrações que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na duração quando comparadas com o grupo controle foram 25% (5,88 dias) e 100% (5,98 dias), e ao mesmo tempo não apresentaram diferenças com as outras concentrações que tiveram diferenças quando comparadas com o controle. O tratamento com 5% que demorou 6,20 dias foi o de maior significação quando comparada com o grupo controle seguida do tratamento com 50% e 75% com 6,16 e 6,13 dias respectivamente. Pode ser dizer que o efeito de *P. mammosa* sobre o estágio pupal foi resultou em uma demora nos processos intrapupais aumentando o tempo em até quase 24 horas.

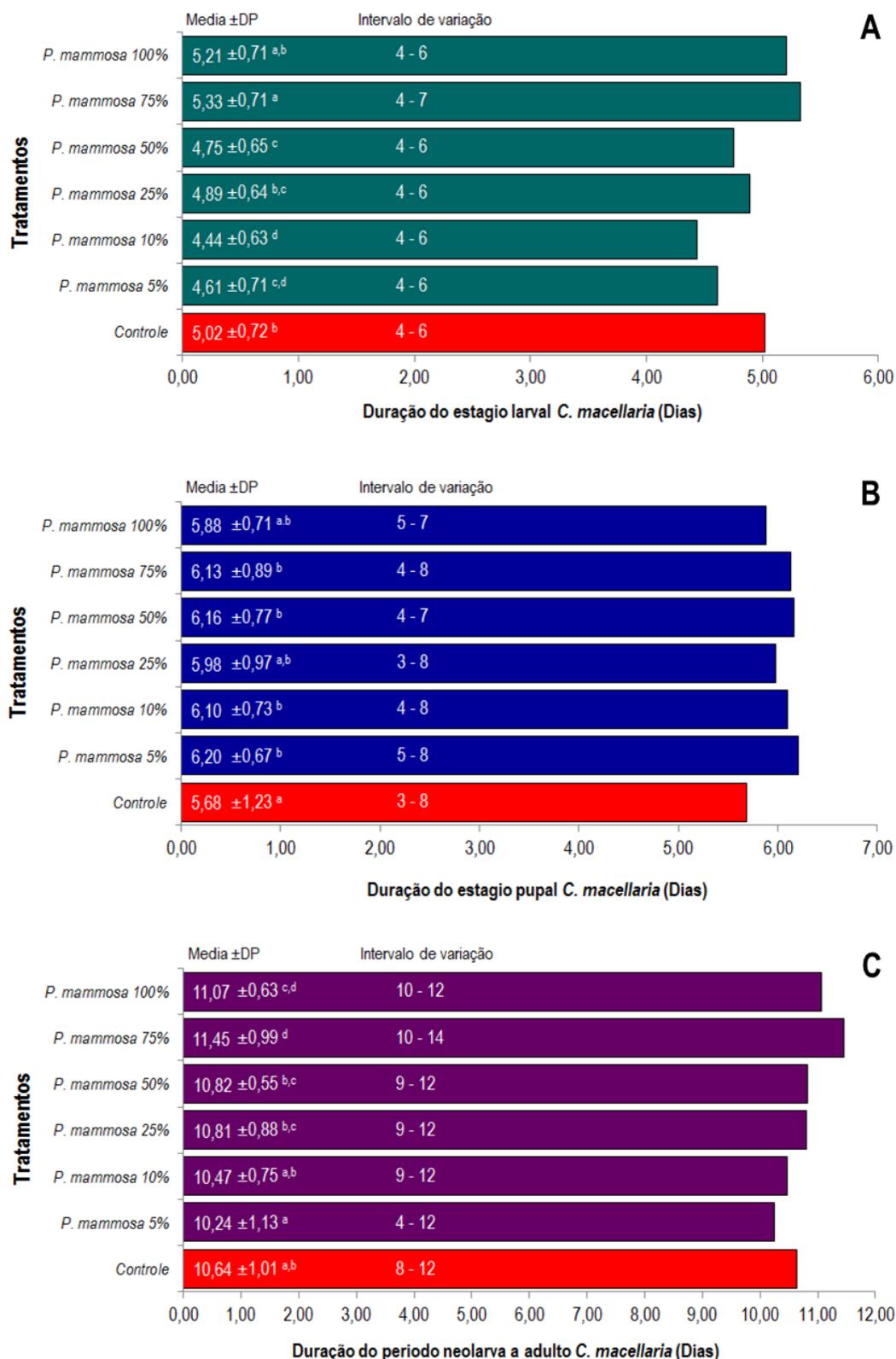


Figura 35. Efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o tempo de desenvolvimento de *Cochliomyia macellaria*. A: Estágio larval; B: Estágio pupal; C: Período neolarva-adulto. Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatisticamente significativas no Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey ( $p < 0,01$ ) após ANOVA simples.

Quando se analisou o período completo de neolarva a adulto (Figura 35 C), foi observado que todos os grupos tratados com as concentrações superiores a 25%, diferiram estatisticamente de forma significativa quando comparados com o grupo controle ao realizar o teste de Tukey ( $p < 0,01$ ). As concentrações de 5 e 10%, mesmo que tenham apresentado uma duração menor que o grupo controle, não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas. O extrato aquoso bruto de *P. mammosa* retardou o desenvolvimento de *C. macellaria*.

Quando se comparou este resultado com aqueles da literatura, foi possível constatar que o comportamento irregular evidenciado na duração do estágio larval já foi evidenciado por outros autores, como por exemplo, Khater e Khater (2009) ao avaliarem a atividade inseticida de quatro plantas medicinais contra *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae), concluíram que alguns extratos de plantas podem causar anomalias em larvas e pupas, associando este comportamento a possíveis distúrbios ocasionados no sistema endócrino que poderia interferir nos processos fisiológicos ligados à metamorfose.

A demora do estágio pupal favorece o controle natural desta espécie através da ação de parasitoides como *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera, Pteromalidae), extensamente estudado por Barbosa et al. (2008a,b e 2010) utilizando como hospedeiro *C. macellaria* sob diferentes tempos de exposição e outras variáveis como densidades do parasitoide e aumento do número de pupas hospedeiras de *C. macellaria*.

A Figura 36 mostra as porcentagens de mortalidade nos estágios larval e pupal, assim como do período neolarva a adulto. Pode-se observar que existe um efeito agudo que causa a mortalidade no estágio larval, com uma transcendência menos influente no estágio pupal. No estágio larval, a concentração de 100% foi a mais efetiva, com 64,5% de mortalidade, sendo que todos os tratamentos possuem mortalidades superiores a 45%. Já no estágio pupal, as concentrações acima de 25% apresentaram mortalidades superiores ao do grupo controle, com um efeito muito marcante na concentração de 50%, onde 42,2% das pupas foram inviáveis. Como resultado final, ao observar as mortalidades para o período neolarva a adulto, todos os grupos tratados apresentaram mortalidades acima de 60%. Certamente a mortalidade do grupo controle também foi alta, entretanto, todos os tratamentos o superaram em mais de 20%, sendo a concentração de 100% a mais efetiva, atingindo 72%.

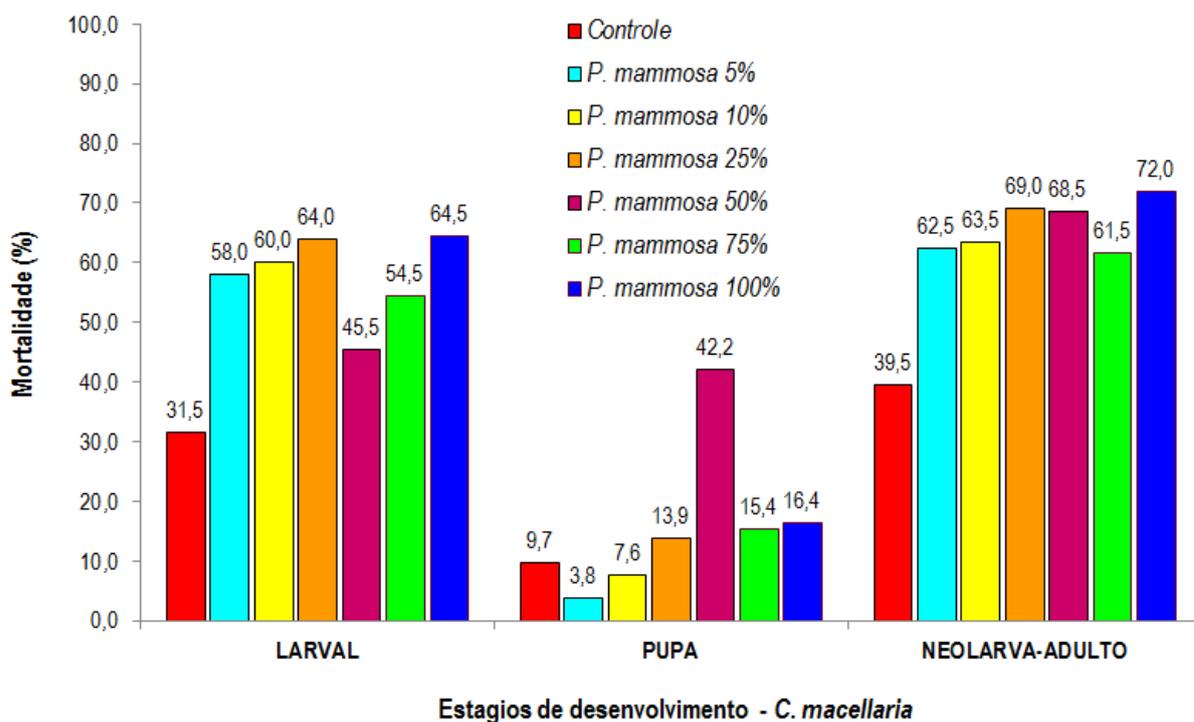


Figura 36. Mortalidade larval, pupal e do período neolarva-adulto de *Cochliomyia macellaria* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. Valores em porcentagem são exibidos acima de cada barra.

A Figura 37 apresenta o efeito pós-emergência dos adultos de *C. macellaria* tratados topicamente com extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa*. Houve uma baixa frequência de indivíduos com malformações (3 e 5 indivíduos) (Figura 37A), quando comparado com as espécies *C. megacephala* e *C. putoria*. De um total de 1200 larvas inicialmente, 25 indivíduos apresentaram malformações representando 2,08%, que pode ser considerado um percentual baixo ou normal (quando normalmente podem aparecer estas malformações). Entretanto, neste estudo não foram observadas tais malformações no grupo controle.

Com a frequência de aparecimento de adultos com malformações, o aporte deste parâmetro à mortalidade acumulada não foi muito significativo e a concentração de 100% continuou sendo a mais efetiva com 74,5% (Figura 37 B).

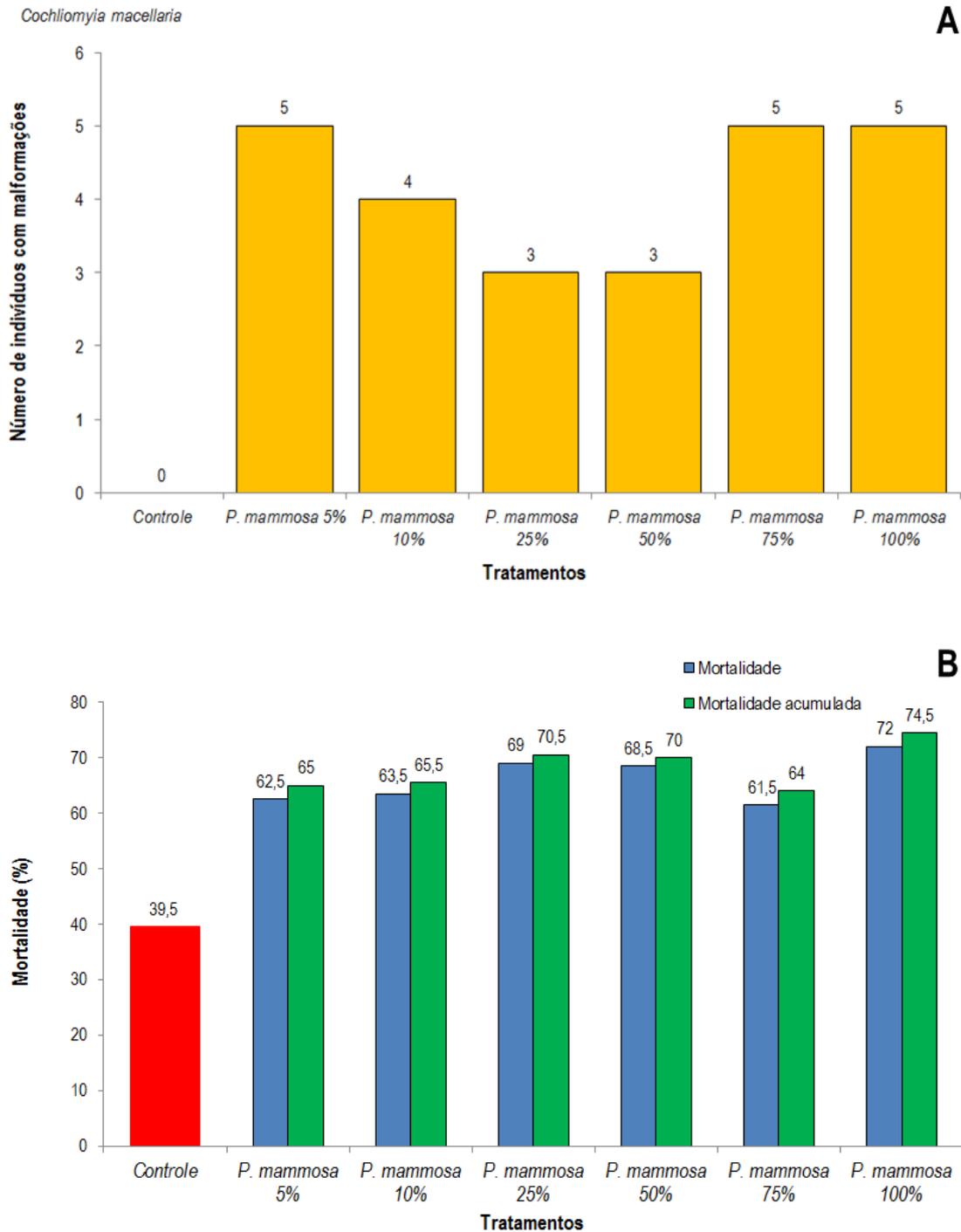


Figura 37. Efeitos pós-emergência de *Cochliomyia macellaria* tratadas topicamente com extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. A: Número de indivíduos com malformações nas asas por cada 200 larvas inicialmente em cada tratamento. B: Representação comparativa entre a porcentagem de mortalidade e a porcentagem de mortalidade acumulada frente ao grupo controle.

Silva et al. (2010) ao estudarem a bioatividade do extrato etanólico do caule da Euphorbiaceae *C. linearifolius* sobre *C. macellaria*, não encontraram diferenças marcantes entre a mortalidade pupal dos tratamentos e do controle, ainda sendo este último a apresentar maior mortalidade (Controle: 20%; *C. linearifolius* 20 mg/mL: 12,5% e *C. linearifolius* 40 e 60 mg/mL: 16,25% cada), valores estes muito próximos e que corroboram os do presente estudo. Já quando avaliaram a mortalidade dos adultos (período neolarva a adulto), observaram valores de mortalidade sempre superiores ao do grupo controle (Controle: 26,25%; *C. linearifolius* 20 mg/mL: 42,50%; *C. linearifolius* 40 mg/mL: 53,75% e *C. linearifolius* 60 mg/mL: 63,75), aspecto similar ao presente estudo com extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa*, com a única diferença que obtiveram um aumento da porcentagem de mortalidade coerente com o elevação da concentração, que não foi observada com a aplicação tópica do Zapote.

#### **4.3.5 Efeitos do tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Lucilia cuprina***

Como resultado da aplicação tópica do extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* sobre *L. cuprina* um dos parâmetros a avaliar foi a massa corporal das larvas. Na Tabela XVI, pode-se observar que as médias calculadas para o grupo controle e os tratamentos resultaram muito próximas e em uma faixa variando de 30,64 mg (concentração de 25%) até 32,40 mg (grupo controle e a concentração de 5%) que tiveram o mesmo valor, unicamente diferenciado por uma pequena variação no desvio padrão de cada grupo. O tratamento de 25% foi aquele que apresentou diferenças significativas quando comparadas ao grupo controle, além de apresentar uma média de massa larval menor.

Para verificar a estabilidade da colônia, foi determinada a razão sexual de *L. cuprina* após aplicação tópica de *P. mammosa*. Na Figura 38, se evidencia que todos os grupos tratados e o grupo controle apresentaram valores muito próximos de 0,5, o que quer dizer que houve uma relação bem perto de 1:1 entre o número de fêmeas com relação ao número de machos emergidos. Estes resultados conferem com o preconizado por Fisher (1930), confirmando a estabilidade dentro da população.

Tabela XVI. Efeito sobre a massa corporal das larvas de *Lucilia cuprina* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*.

Tratamentos	Massa larval Média ±DP (mg)	Intervalo de variação da massa larval (mg)
<i>Controle</i>	32,40 ±3,80 <sup>a</sup>	20,65 – 39,37
<i>Pouteria mammosa 5%</i>	32,40 ±3,83 <sup>a</sup>	21,20 – 43,25
<i>Pouteria mammosa 10%</i>	31,46 ±2,80 <sup>a,b</sup>	23,45 – 36,96
<i>Pouteria mammosa 25%</i>	30,64 ±4,60 <sup>b</sup>	16,80 – 38,52
<i>Pouteria mammosa 50%</i>	32,01 ±4,37 <sup>a,b</sup>	18,20 – 38,36
<i>Pouteria mammosa 75%</i>	31,85 ±3,30 <sup>a,b</sup>	14,90 – 39,34
<i>Pouteria mammosa 100%</i>	32,17 ±3,50 <sup>a,b</sup>	21,60 – 37,42

DP: Desvio padrão; mg: miligramas.

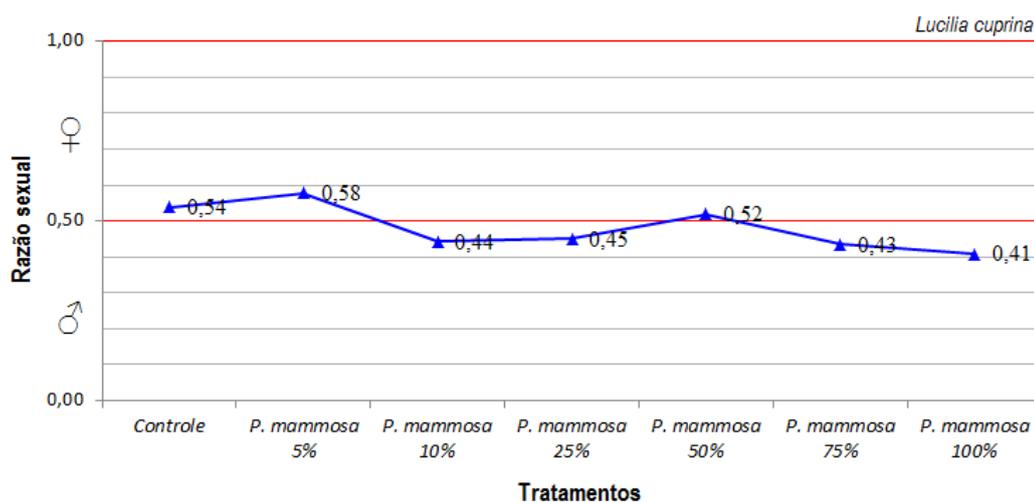


Figura 38. Comportamento da razão sexual de *Lucilia cuprina* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*.

Ao comparar a média da massa corporal do grupo controle do presente estudo (30,64 ±3,80 mg), observou-se que esta era ligeiramente menor do que aquelas alcançadas por Pessanha et al. (2015) que obteve um valor de 31,3 ±5,5 mg ao avaliar os efeitos de *Brevibacillus laterosporus* sobre *L. cuprina*. Pinto et al. (2015) também observaram larvas mais pesadas (33,19 ±3,41 mg) ao avaliar o efeito do óleo de espécies de *Cymbopogon citratus* (Poaceae) do Brasil e de Cuba, também sobre de *L. cuprina*. Entretanto, esta diferença não é

significativa uma vez que os desvios padrão de cada uma destas médias permitem a sobreposição das faixas de peso que as abrangem.

No presente estudo, o grupo controle mostrou a maior média de massa corporal mesmo sem diferença significativa dos tratamentos. Pessanha et al. (2015) fizeram esta análise e o peso do grupo controle resultou em uma posição intermedia entre as doze cepas de *B. laterosporus* avaliadas, que variaram entre  $26,4 \pm 15,3$  mg e  $37,8 \pm 2,2$  mg.

Já Pinto et al. (2015) obtiveram resultados semelhantes aos obtidos com *P. mammosa*. As médias do peso das larvas tratadas com o óleo de *C. citratus* obtido no Brasil estiveram na faixa entre  $26,85 \pm 9,94$  mg até  $35,31 \pm 3,74$  mg e, no tratamento com o óleo obtido em Cuba, o peso das larvas variou entre  $26,72 \pm 2,67$  mg e  $34,79 \pm 3,87$  mg.

Durante o estudo do efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* ao ser aplicado topicamente sobre as larvas de *L. cuprina* de primeiro instar, foi possível constatar que existe uma disparidade na duração dos estágios de cada indivíduo. Foi possível encontrar larvas, pupas e adultos co-existindo em momentos bem avançados (em tempo) do estudo, ou seja, elevada heterogeneidade na duração do período de desenvolvimento individual desta espécie.

Na Figura 39 encontra-se ilustrado o efeito deste extrato sobre a duração dos estágios larval, pupal e do período de neolarva até adulto de *L. cuprina*. O grupo controle, no estágio larval, teve uma duração média de  $2,56 \pm 0,57$  dias, esta duração foi intermediária, entre as três concentrações menores de 5% ( $2,38 \pm 0,60$  dias), 10% ( $2,15 \pm 0,55$  dias) e 25% ( $2,11 \pm 0,36$  dias) e as concentrações superiores de 50% ( $2,74 \pm 0,77$  dias), 75% ( $2,80 \pm 0,80$  dias) e 100% ( $2,65 \pm 0,76$ ) (Figura 39A). O teste de Tukey indicou que existem diferenças significativas entre as menores concentrações que abandonaram a dieta antes do grupo controle, sendo 5% aquela que causou mais efeito sobre a duração do estágio larval de *L. cuprina*.

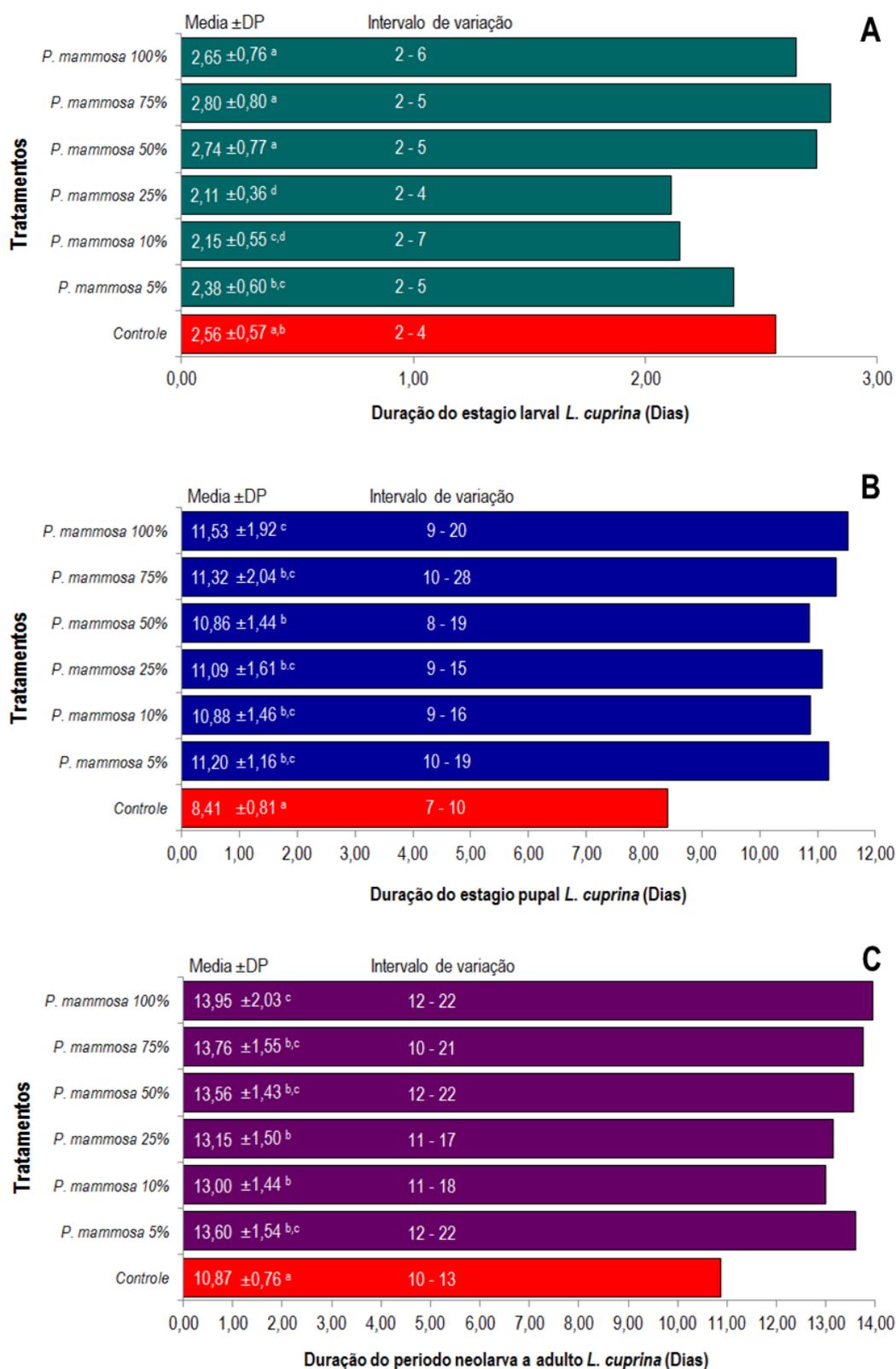


Figura 39. Efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o tempo de desenvolvimento de *Lucilia cuprina*. A: Estágio larval; B: Estágio pupal; C: Período neolarva-adulto. Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatisticamente significativas no Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey ( $p < 0,01$ ) após ANOVA simples.

O efeito sobre a duração do estágio pupal de *L. cuprina*, exercido pelo extrato aquoso de sementes de *P. mammosa* está representado na Figura 39B, onde se evidencia que todos os tratamentos provocaram um atraso no período pupal quando comparados com o grupo controle. Todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas quando aplicado o teste de Tukey, resultando em um marcado aumento na duração do estágio de entre dois a três dias.

Como consequência da permanência no estágio pupal, pode-se observar um prolongamento variando de dois a três dias na duração do período de neolarva-adulto (Figura 39C). Através da análise estatística, observou-se que todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas quando comparados com o grupo controle, mostrando que provavelmente o efeito do extrato aquoso de sementes de *P. mammosa* sobre *L. cuprina* não tenha incidido diretamente sobre a massa corporal das larvas, mas sim sobre a duração dos períodos desenvolvimento, principalmente no estágio pupal.

O comportamento irregular do estágio larval pode ser resultante do efeito do extrato de *P. mammosa* sobre este estágio. Khater e Khater (2009) avaliaram a atividade inseticida de quatro plantas medicinais contra moscas da espécie *L. sericata* e observaram que alguns extratos destas plantas causaram anomalias em larvas e pupas, associando este comportamento a possíveis distúrbios relacionados com o nível de hormônios que poderiam interferir nos processos fisiológicos ligados à metamorfose.

O extrato de *P. mammosa* prolongou a duração do desenvolvimento pós-embriônico de *L. cuprina*. Este efeito poderia ser utilizado para potencializar o controle biológico desta espécie associando sua ação à de parasitoides, por exemplo. Partindo do princípio de que se o inseto se encontra em estágios imóveis ou menos móveis, como o estágio pupal, por exemplo, este seria mais susceptível durante um tempo maior, tornando mais provável a ação de parasitoides, como estudado extensamente sobre pupas de *C. macellaria* por Barbosa et al. (2008a,b e 2010), além do multiparasitismo provocado por estes insetos (Carvalho et al. 2005a,b) e a predação dos imaturos de dípteros por outros insetos, como formigas e besouros (Roberts 1935; Blanco-Metzler e Laprade 1998).

Os resultados deste estudo diferiram daqueles publicados por Pinto et al. (2015) e Pessanha et al. (2015) quando consideradas a médias da duração do estágio larval. No presente trabalho, a duração média do estágio larval do grupo controle foi de  $2,56 \pm 0,57$  dias e os grupos tratados variaram entre  $2,11 \pm 0,36$  até  $2,80 \pm 0,80$  dias, diferindo do que foi observado por Pinto et al. (2015) que relataram a duração de  $3,24 \pm 0,43$  dias para o grupo controle e  $4,05 \pm 0,21$  e

4,22 ±0,41 dias para os grupos tratados com o óleo essencial de *C. citratus*. Estes mesmos autores também avaliaram o monoterpene citral sobre a espécie *L. cuprina*, onde o grupo controle apresentou uma média de 3,11 ±0,32 dias e na concentração única testada apresentou duração de 3,07 ±0,27 dias.

Pessanha et al. (2015) ao avaliarem o efeito de 12 cepas de *B. laterosporus* contra *L. cuprina* destacaram uma maior diferença, pois o grupo controle apresentou uma duração média de 5,6 ±1,7 dias e as médias dos tratamentos oscilaram entre 4,2 ±0,8 e 6,0 ±1,1 dias, consideravelmente maiores aos resultados observados neste estudo.

Entretanto, ao analisar a duração do estágio pupal, esta observação se inverte, reforçando a evidência de que o efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* sobre a espécie *L. cuprina* possui o maior efeito sobre a duração do estágio larval, fazendo com que este se prolongue. A duração do período pupal no grupo controle foi de 8,41 ±0,81 dias com faixas de médias de duração para os tratamentos entre 10,86 ±1,44 e 11,53 ±1,92 dias.

No estudo realizado por Pinto et al. (2015) utilizando *C. citratus*, observaram que a duração do estágio pupal é inferior ao relatado em nosso estudo, com duração de 4,72 ±0,58 dias para o grupo controle e variando de 8,42 ±0,88 e 10,05 ±0,86 para os tratamentos com o óleo essencial desta planta. Estes resultados corroboram o nosso estudo, uma vez que ambas as substâncias exercem uma ação que prolonga o estágio pupal. Entretanto, o monoterpene citral, também publicado por Pinto et al. (2015) no mesmo artigo, apresentou efeito oposto, reduzindo a duração do período pupal (controle: 4,73 ±0,45 dias; citral: 4,45 ±0,52 dias), porém sem diferenças estatísticas significativas.

Ao comparar nosso estudo aos resultados de Pessanha et al. (2015), também se constatou que várias cepas possuem o mesmo efeito prolongador do estágio pupal, ainda que os valores das médias de duração do grupo controle e dos tratamentos difiram do observado no presente estudo (controle 6,9 ±0,9 dias; tratamentos: 6,3 ±0,8 e 8,7 ±0,6).

A duração do período de neolarva-adulto da espécie *L. cuprina* submetida ao tratamento tópico (dose única) com *P. mammosa* foi de 10,87 ±0,76 dias no grupo controle, entretanto, Pinto et al. (2015) observaram a duração do grupo controle neste período de 7,96 ±0,67 dias e 7,80 ±0,40, enquanto Pessanha et al. (2015) observaram 12,0 ±1,5 dias para *B. laterosporus*. Assim, ressalta-se que a duração do período de neolarva-adulto no estudo com *P. mammosa* está compreendido entre os valores relatados acima por estes autores. No entanto, não houve nenhuma correspondência com o efeito do monoterpene citral, avaliado por Pinto et al. (2015)

sobre este período de desenvolvimento, que foi muito menor aos ensaios antes citados e ao observado neste estudo ( $7,62 \pm 0,51$  dias).

A Figura 40 representa os valores de mortalidade após a aplicação tópica do extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* sobre larvas de primeiro instar de *L. cuprina*. Evidencia-se um efeito agudo no estágio larval que atinge valores de até 45% de mortalidade, sendo a concentração de 100% a mais efetiva. Além destas, as concentrações 5% e 75% alcançaram valores acima de 40% de mortalidade. Esta ação teve um efeito que atingiu até o estágio pupal, demonstrando também um efeito crônico do extrato principalmente nos tratamentos 10% e 25%. O efeito sobre estas duas doses no estágio pupal fez com que todas as concentrações resultassem em uma faixa de porcentagem de mortalidade muito próximo ao analisar-se o período desde neolarva até adulto de forma integral. Pode se constatar que todos os tratamentos provocaram mortalidade média acima de 45%, sendo o maior (55%) observado na concentração de 5%.

Os resultados deste estudo demonstram que a mortalidade é menor do que aquela relatada por Deleito e Moya-Borja (2008) quando estudaram o efeito do óleo essencial de Nim (*Azadirachta indica*) sobre *L. cuprina*, onde observaram mortalidade com relação dose/efeito entre 35,7% (0,2 % V/V) e 98,2% (0,6% V/V).

No estudo de Pinto et al. (2015), a máxima concentração provocou cerca de 80% da mortalidade e a concentração mais baixa (5%), atingiu 60% de mortalidade, corroborando os resultados do presente estudo ressaltando a inexistência de uma relação direta entre a dose e a porcentagem de mortalidade.

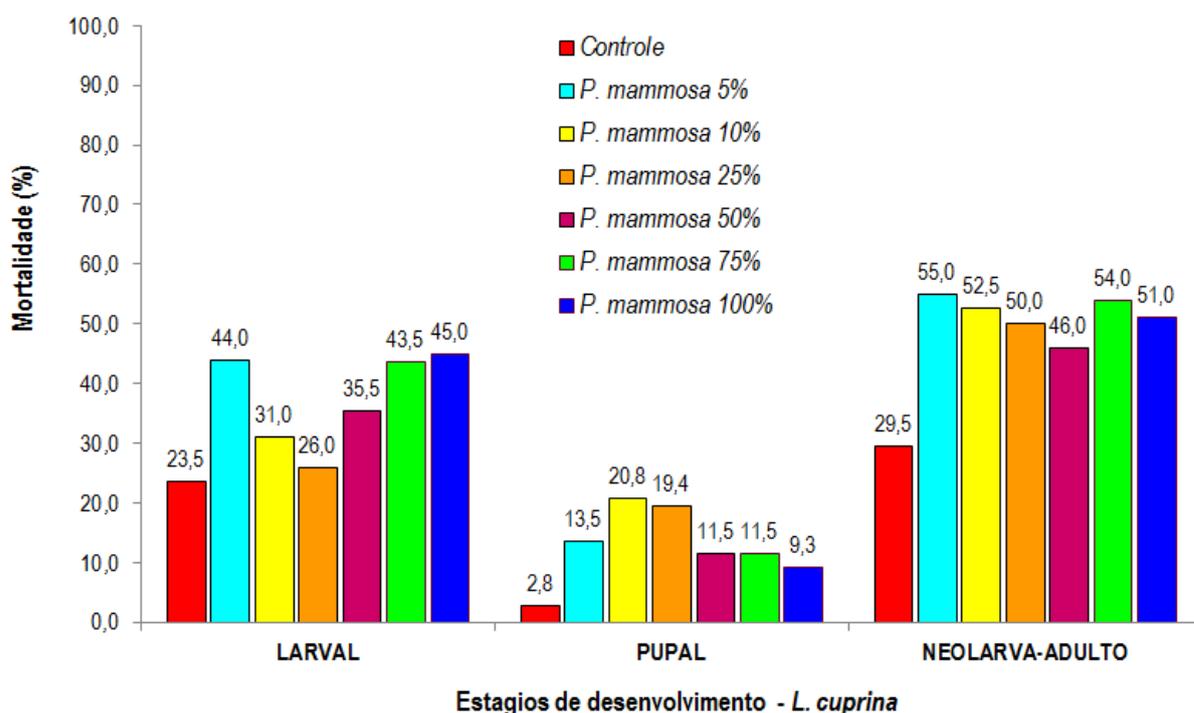


Figura 40. Mortalidade larval, pupal e do período neolarva-adulto de *Lucilia cuprina* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. Valores em porcentagem são exibidos acima de cada barra.

Pessanha et al (2015) avaliaram a mortalidade de *L. cuprina* quando tratadas com *B. laterosporus* e observaram um comportamento similar ao presente estudo, um efeito agudo no estágio larval, atingindo também o estágio pupal que resultou em valores de mortalidade acima do 40% e até 62% com a cepa NRS 111, quando calculada a mortalidade para o período neolarva a adulto. Entretanto, houve foi observada uma diferença entre os estudos, onde a mortalidade de neolarva a adulto do grupo controle de estudo com *B. laterosporus* foi significativamente superior ao controle deste estudo, além disso, muito próximo do valor obtido para os tratamentos que não foi o caso neste ensaio, demonstrando-se uma maior efetividade no presente estudo.

#### 4.3.6 Efeitos do tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Musca domestica*

A espécie *Musca domestica* possui esse nome por ser uma ou a mais adaptada aos ambientes antrópicos. A estimativa do peso corporal para a avaliação de uma substância ou extrato como candidato para o controle de qualquer espécie constitui um parâmetro importante

a ser considerado. A Tabela XVII tem como objetivo mostrar os valores obtidos para as pupas desta espécie, após a aplicação tópica do extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* nas larvas do primeiro instar (L1), considerando que as larvas do terceiro instar (L3) não abandonam a dieta foi necessário retirar as pupas assim que estas eram observadas dentro da dieta.

Tabela XVII. Efeito sobre o peso das pupas de *Musca domestica* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*.

<b>Tratamentos</b>	<b>Massa pupal Média ±DP (mg)</b>	<b>Intervalo de variação da Massa pupal (mg)</b>
<i>Controle</i>	16,80 ±0,95 <sup>a</sup>	14,52 – 19,44
<i>Pouteria mammosa 5%</i>	16,22 ±1,18 <sup>b</sup>	12,84 – 18,92
<i>Pouteria mammosa 10%</i>	16,13 ±1,20 <sup>b</sup>	13,04 – 17,72
<i>Pouteria mammosa 25%</i>	16,62 ±1,73 <sup>a,b</sup>	11,90 – 19,16
<i>Pouteria mammosa 50%</i>	16,15 ±2,29 <sup>b</sup>	6,78 – 18,64
<i>Pouteria mammosa 75%</i>	17,14 ±0,95 <sup>a</sup>	15,62 – 18,72
<i>Pouteria mammosa 100%</i>	16,94 ±1,44 <sup>a</sup>	13,96 – 19,16

DP: Desvio padrão; mg: miligramas.

Pode-se observar que o grupo controle alcançou uma média de peso igual a 16,80 ±0,95 mg. Apenas as concentrações mais altas (75%: 17,14 ±0,95 e 100%: 16,94 ±1,44 mg) apresentaram peso maior do que o grupo controle e, por conta dos valores de desvio padrão não resultam em diferenças estatísticas. Apenas três das concentrações estudadas (5%, 10% e 50%) mostraram diferenças estatisticamente significativas ao aplicar o teste de Tukey, pois as larvas que abandonaram as dietas nestes tratamentos eram mais leves.

Como segundo parâmetro para a determinação da estabilidade da colônia e dos indivíduos incluídos no estudo após tratamento, se mostra o comportamento da razão sexual na Figura 41, onde se pode verificar que no grupo controle e todos os grupos tratados resultaram em valores muito próximos de 0,50 sugerindo uma relação macho/fêmea de 1:1 como preconizado por Fisher em 1930.

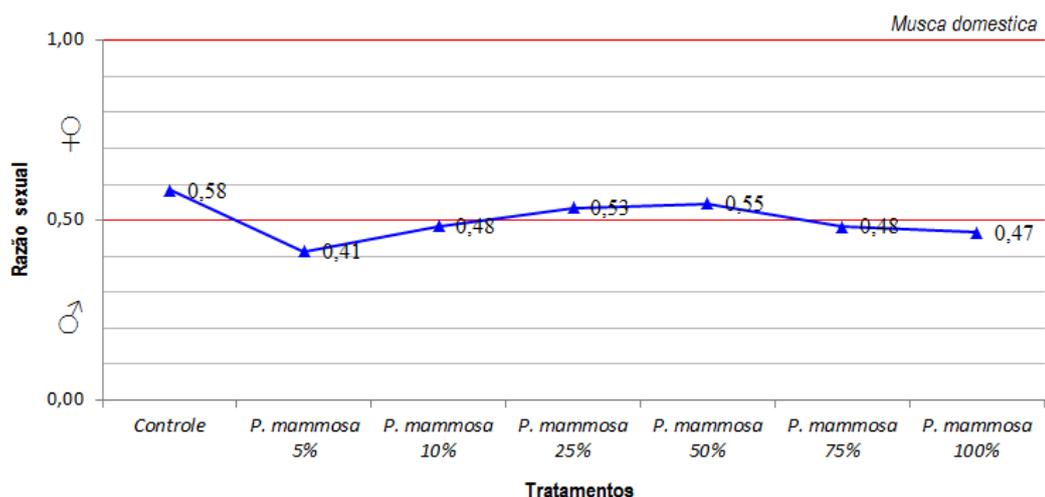


Figura 41. Comportamento da razão sexual de *Musca domestica* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*.

Freitas (2008) não observou diferenças significativas nas médias da massa das pupas de *M. domestica* quando comparou com o grupo controle, ao utilizar extratos de *Eucalyptus sp.* Entretanto, este autor notou que existiam variações significativas ao testar o extrato aquoso de *M. azedarach* nesta mesma espécie com a formação de pupas que resultaram significativamente mais leves que o grupo controle (20mg), sendo na concentração de 5% (17mg) e na concentração 10% (16mg). De igual forma, Cabral et al. (2008) testaram diferentes extratos de *M. azedarach* sobre *M. domestica*, onde também se formaram pupas mais leves nos tratamentos (A: 20,17mg; B: 20,88mg; C: 21,52mg; D: 20,41mg), quando comparados com o grupo controle que resultou atingir a massa de 22,10 mg.

Quanto à estabilidade da razão sexual, o presente estudo corrobora os resultados obtidos por Freitas (2008) com extratos aquosos de *Eucalyptus sp.* e *M. azedarach* nos quais não encontrou alteração da razão sexual de *M. domestica*. Contradizendo o comportamento de *M. domestica* frente a *P. mammosa* do presente estudo, as experiências de Cabral et al. (2008) mostraram variação na razão sexual desta espécie com a fração metanólica do extrato bruto de *M. azedarach* onde o índice para o grupo controle foi 0,44 e para o extrato D foi de 0,38.

A duração do período de desenvolvimento pós-embriônico de neolarva-adultos dos diferentes grupos tratados e do grupo controle de *M. domestica* após a aplicação tópica do extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* está representada na Figura 42. Como as larvas desta espécie ao chegar ao terceiro instar (L3) não possuem o hábito de abandonar a dieta, como procedimento padronizado após estudos da biologia de *M. domestica* no

Laboratório de Entomologia Médica e Forense se estabeleceu a retirada das pupas no 6º dia após tratamento qualquer tratamento.

Como era de se esperar, no 6º dia todas as larvas já tinham pupado, não ocorrendo esse o comportamento para os tratamentos que tiveram que ser postergados para o dia seguinte. No 7º dia ainda algumas poucas larvas se encontravam sem pupar, mostrando que houve um retardo do estágio larval. Nestes casos, optou-se por não mexer na carne, pois uma interferência no meio onde estão se alimentando poderia induzir as larvas à uma pupação precoce, sendo também esta a razão pela qual a duração e a mortalidade resultantes deste período larval não ser representadas em gráficos.

Analisando a duração do estágio pupal de *M. domestica* na Figura 42A, pode-se observar que não existem diferenças estatisticamente significativas entre a duração do grupo controle e os grupos tratados com o extrato aquoso de sementes de *P. mammosa* quando aplicado o teste de comparação múltipla de média de Tukey ( $p < 0,01$ ). Evidencia-se que a duração deste estágio para o grupo controle que foi de  $5,63 \pm 0,59$  dias, valor este que se encontra dentro da faixa entre a concentração que teve a menor duração (10% com  $5,47 \pm 0,50$  dias) e a concentração de 100% que atingiu  $5,88 \pm 0,67$  dias.

Este resultado aponta que o extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* não possui uma incidência sobre a duração do estágio pupal de *M. domestica* e sim sobre a duração do estágio larval. Esta afirmação é demonstrada na Figura 42B, onde se representa o período completo desde larva até adulto, todos os grupos tratados apresentam diferenças estatisticamente significativas ao se aplicar o teste de comparação múltipla de médias de Tukey ( $p < 0,01$ ), quando comparados com o grupo controle.

Coincidindo com estes resultados obtidos com *P. mammosa* em experimentos realizados por Freitas (2008), para avaliar a atividade de extratos aquosos de *Eucalyptus* sp. e *M. azedarach* em *M. domestica* foi encontrada diferença na duração do período larval na maior concentração do extrato de *Eucalyptus* (10%) e nas duas concentrações testadas de extrato de *M. azedarach* (5 e 10%), tendo em todos os casos, aumento na sua duração.

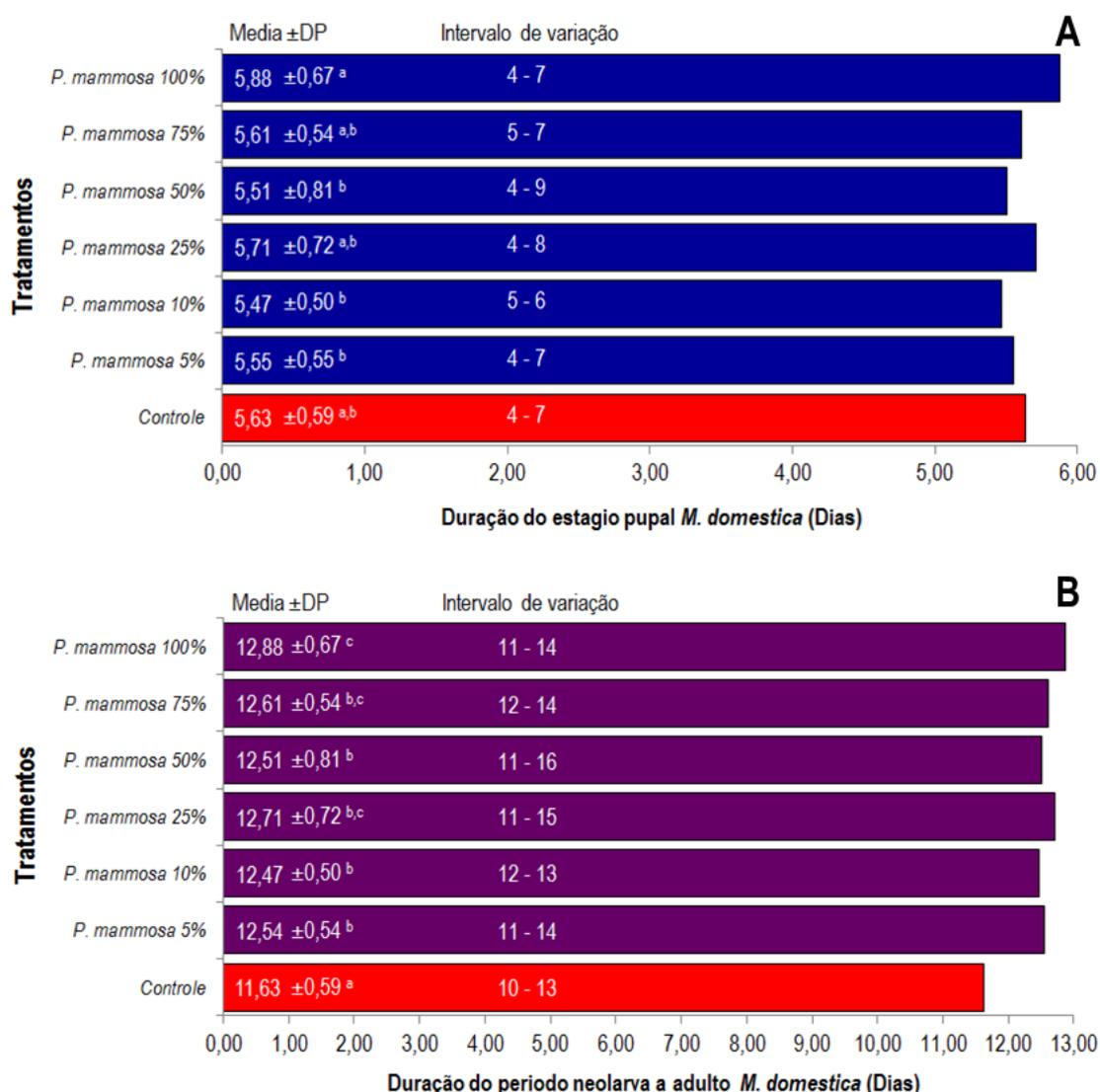


Figura 42. Efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o tempo de desenvolvimento de *Musca domestica*. A: Estágio pupal; B: Período neolarva-adulto. Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatisticamente significativas no Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey ( $p < 0,01$ ) após ANOVA simples.

Cabral et al. (2008) quando testaram diferentes extratos de *M. azedarach* em *M. domestica* encontraram apenas diferenças estatisticamente significativas nas larvas tratadas com a mistura resultante da extração com *n*-hexano na concentração 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  com  $6,72 \pm 0,81$  dias. No entanto, as observações realizadas para o estágio pupal não coincidem com o nosso estudo, pois se observou uma redução da duração do estágio pupal em *M. domestica*.

O período de neolarva a adulto estão em acordo com os resultados observados por Cabral et al. (2008), onde os diferentes extratos de *M. azedarach* aumentaram o tempo de

duração do período neolarva a adulto (Controle: 12,08 dias; Extrato A: 12,25 dias; Extrato B 12,35 dias; Extrato C: 12,36 dias; Extrato D: 12,59 dias). O mesmo aumento foi encontrado por Freitas (2008) utilizando os extratos de *Eucalyptus* sp. e *M. azedarach* nas menores concentrações testadas (5%), mas nas maiores concentrações (10%), os dois extratos apresentaram o mesmo comportamento sobre o desenvolvimento (Figura 42 C).

A Figura 43 mostra a mortalidade da espécie *M. domestica* após o tratamento tópico com o extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa*. Pode-se observar que no período de neolarva a adulto, em todos os tratamentos, os valores obtidos são marcadamente superiores aos do grupo controle que atingiu o 22% de mortalidade. Adicionalmente, todos os tratamentos alcançaram valores de mortalidade superiores a 45% e desde a concentração mais baixa testada 5% e até 75% se observou um aumento na resposta que se corresponde com o incremento da dose 5% (mortalidade de 44,5%), 10% (51,5%), 25% (57%) e 50% (61,5%). No caso das duas últimas doses 75% (57,5%) e 100% (56%) é muito provável que tenha se evidenciado o fenômeno de saturação, pois a diferença entre os valores observados de mortalidade entre as concentrações de 75% até 100% não é significativa.

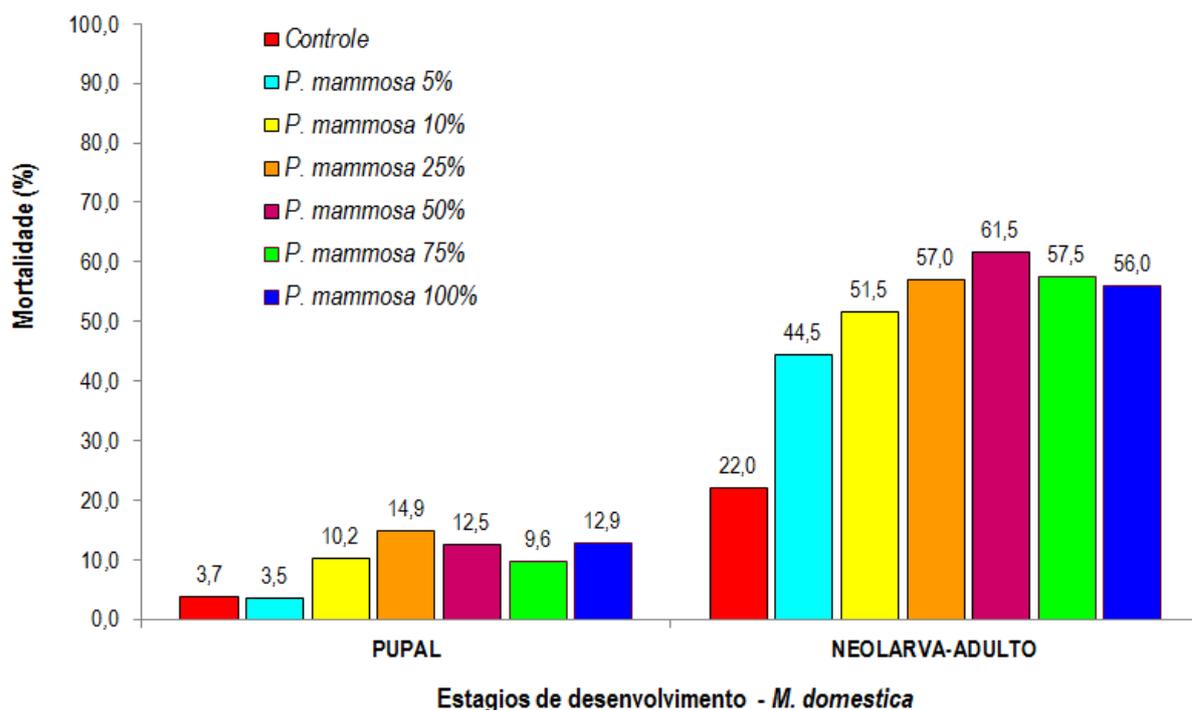


Figura 43. Mortalidade, pupal e do período neolarva-adulto de *Musca domestica* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. Valores em porcentagem são exibidos acima de cada barra.

Ao observar o aporte do estágio pupal à mortalidade total alcançada, pode se inferir claramente que a ação do extrato de *P. mammosa* possui um efeito acumulativo que gera valores

de mortalidade neste estágio. O maior efeito foi de tipo agudo sobre estágio larval. Pode se conferir que o maior valor de mortalidade pupal alcançado foi na concentração de 25% com um 14,9% de pupas inviáveis.

Uma vez que as moscas emergiram, estas foram detalhadamente observadas ao estereoscópio para determinar a presença de mal-formações. Para esta espécie (*M. domestica*) o número de malformações observadas não foi muito significativo ainda quando não houve aparecimento destas no grupo controle (Figura 44 A). Apenas nas concentrações 10%, 25% e 75% emergiram indivíduos com malformações, sendo 2 em cada caso. Esta quantidade representa apenas 1% em cada tratamento e representa um 0,5% do total de larvas tratadas inicialmente no estudo (1200 larvas) independentemente da concentração utilizada.

Considerando estes poucos indivíduos que emergiram com malformações pode se dizer que o aporte à mortalidade acumulada não foi significativo (Figura 44 B) e que o efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* sobre a espécie *M. domestica* é principalmente de tipo agudo e sem tendência à cronicidade.

O presente estudo coincide com os resultados obtidos com Cabral et al. (2008) quando testou diferentes extratos de *M. azedarach* sobre *M. domestica* onde determinaram valores de mortalidade para os extratos A 15%; B: 21%; C: 23%; D: 27% que demonstraram ter uma relação dose resposta. A diferença principal deste estudo publicado com os resultados aqui recentemente obtidos está em que os valores de mortalidade alcançados são mais baixos, pois para *P. mammosa* as porcentagens de mortalidade estiveram acima de 40%.

O estudo realizado por Deleito e Moya-Borja (2008), assim como o presente estudo, também mostrou uma relação dose resposta quando avaliado o efeito do óleo essencial de Nim (*Azadirachta indica*) sobre *M. domestica* sendo que as concentrações testadas por estes autores atingiram valores de até 90,9% nas duas maiores doses que testaram (0,5 e 0,6 % V/V) onde provavelmente também se evidenciou o fenômeno de saturação. A superioridade nos índices de mortalidade dos óleos essenciais confirma-se no efeito de asfixia por obstrução das vias respiratórias e o verdadeiro efeito inseticida por ação sob outro mecanismo.

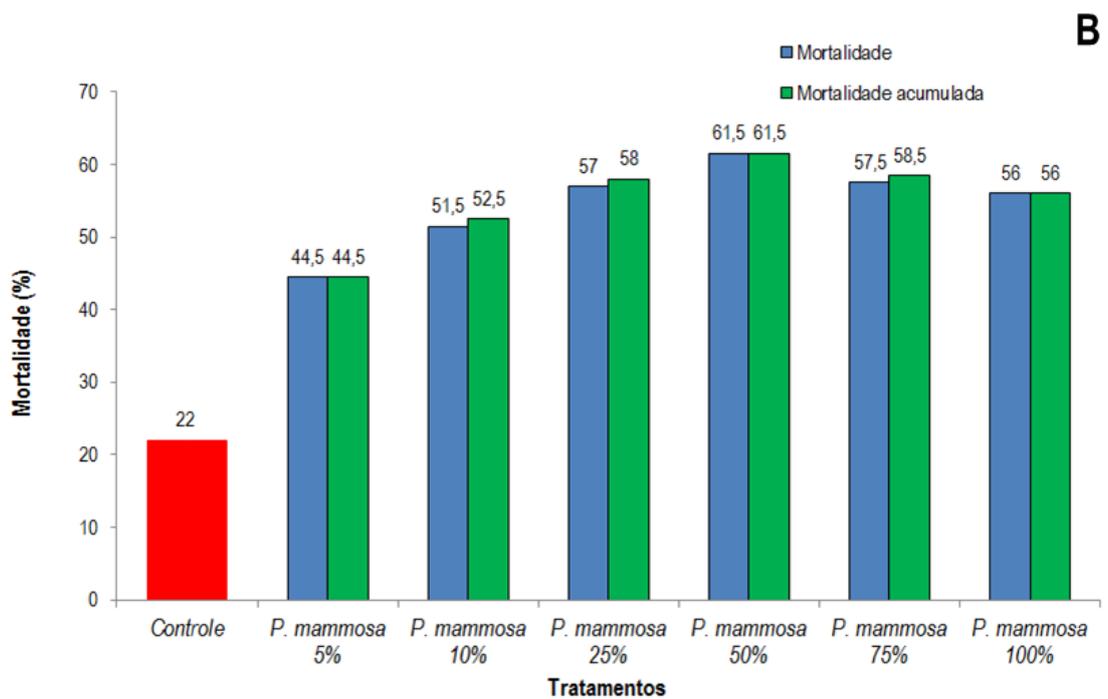
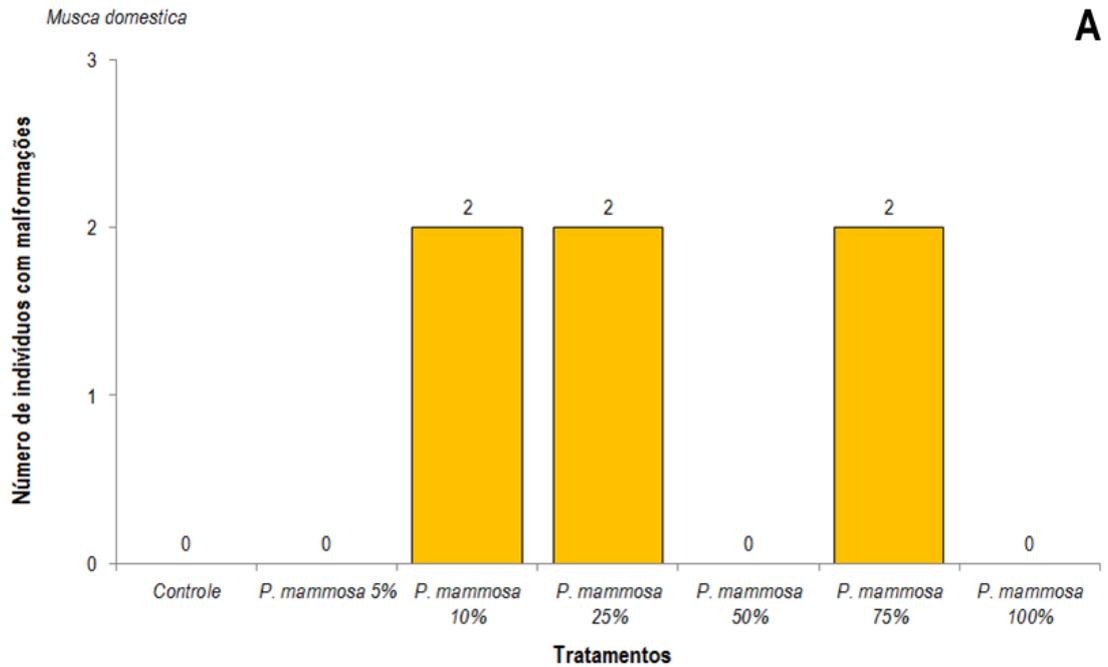


Figura 44. Efeitos pós-emergência na espécie *Musca domestica* após a aplicação tópica do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*. A: Número de indivíduos com malformações nas asas por cada 200 larvas contadas inicialmente em cada tratamento. B: Representação comparativa entre a porcentagem de mortalidade e a porcentagem de mortalidade acumulada frente ao grupo controle.

#### **4.4 Análise comparativa do efeito de *Pouteria mammosa* sobre o desenvolvimento pós-embrionário das seis espécies de dípteros muscoides estudadas: *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria*, *Cochliomyia macellaria*, *Lucilia cuprina* e *Musca domestica*.**

Na Tabela XVIII (em forma extensa) e na Tabela XIX (em forma simplificada) se ilustra de forma comparativa o efeito da aplicação tópica (dose única) do extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa*, sobre os diferentes parâmetros determinados: massa corporal, razão sexual, duração do período neolarva-adulto (que inclui o estágio larval e o estágio pupal).

Quando analisado o parâmetro massa corporal, foi possível verificar que as espécies mais sensíveis a após o tratamento foram *C. megacephala* na concentração de 50% e *C. putoria* na concentração de 5%. As espécies *L. cuprina* e *M. domestica* também apresentaram redução leve da massa corporal nas concentrações entre 5% e 50%. As variações na massa corporal da espécie *C. macellaria* foram pouco significativas e a espécie *C. albiceps* teve como resposta aumentar a massa corporal.

Os valores calculados da razão sexual para cada espécie indicaram que todas as colônias (amostras incluídas no estudo) se mantiveram estáveis após a aplicação do extrato, só no caso da espécie *C. putoria* se evidenciou uma ligeira masculinização, mais evidente nas nos tratamentos de 25% e 75%, fato este que favorece o controle e manutenção de um número de indivíduos não exacerbado dentro de uma população.

A duração do período pós-embrionário de um díptero muscoide em condições normais resulta da somatória do tempo que duram os estágios larval e pupal, uma vez que estes insetos são submetidos a tratamentos com substâncias e/ou extratos que podem acelerar (diminuir o tempo) ou retardar (aumentar o tempo) o desenvolvimento. Quando analisada a duração do estágio larval de todas as espécies estudadas se observou que *C. megacephala* e *M. domestica* tiveram este estágio mais demorado, diferindo das espécies *C. albiceps*, *C. putoria* e *L. cuprina*. No caso da espécie *C. macellaria*, esta apresentou um comportamento irregular, alguns tratamentos prolongaram o estágio e outros o aceleraram. Esta mesma análise feita para o estágio pupal, mostrou que quatro das espécies estudadas (*C. albiceps*, *C. macellaria*, *L. cuprina* e *M. domestica*), tiveram os tempos de desenvolvimento intrapupario estendidos. Esta adição temporal no estágio pupal provoca um aumento nas possibilidades de predação por parte de besouros e formigas assim como o parasitismo e multiparasitismo por himenópteros e forídeos.

Contrariamente, as espécies *C. megacephala* e *C. putoria* aceleraram o desenvolvimento intrapupário, podendo ser esta a principal causa das maiores porcentagens de aparecimento de indivíduos com malformações (asas deformadas) com valores de 13,5% e 12,5% respectivamente. Em outras duas espécies (*C. macellaria* e *M. domestica*) também emergiram indivíduos com malformações representando um 2,08% e 0,5% da amostra estudada em cada caso.

Como aspecto integrador do período de desenvolvimento se analisou a capacidade de cada espécie para compensar o tempo total que demorou até a emergência dos adultos. No caso das espécies *C. megacephala*, *L. cuprina* e *M. domestica*, não houve compensação de forma que demoraram desde várias horas até 3 dias a mais do que o grupo controle. Os indivíduos da espécie *C. macellaria* mostraram uma compensação parcial do período em algumas das concentrações, principalmente nas concentrações maiores 75% e 100%. A espécie *C. putoria* também não conseguiu compensar a duração do período, mas diferentemente das espécies anteriores teve uma aceleração com diminuição considerável do tempo de desenvolvimento, causa de elevados valores de mortalidade e aparecimento de indivíduos malformados nos seus tratamentos.

Ao se analisar o parâmetro mortalidade, a espécie mais sensível foi *C. macellaria* (72%) seguida pela seguinte ordem: *M. domestica* (61,5%) > *C. albiceps* (57%) > *C. putoria* (54,5%) > *L. cuprina* (54,5%) > *C. megacephala* (43,0%).

Finalmente, os valores de mortalidade acumulada, resultado da consideração dos indivíduos com malformações como inviáveis por conta da seleção natural, resultou numa ordem com certas diferenças mais continuou sendo *C. macellaria* a espécie mais sensível com 74%, seguindo a seguinte ordem: *C. putoria* (66,5%) > *M. domestica* (61,5%) > *C. albiceps* (57,0%) > *C. megacephala* (56,5%) > *L. cuprina* (54,5%). Podendo-se concluir que após aplicação tópica dose única do extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* foram alcançados valores máximos de mortalidade acima de 40%, com maior efeito sobre a espécie *C. macellaria* e resultaram ser as menos sensíveis *L. cuprina* e *C. megacephala*.

Tabela XVIII. Resumo extenso do comportamento, em forma comparativa, do efeito da aplicação tópica dose única do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de cinco espécies da família Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria*, *Cochliomyia macellaria* e *Lucilia cuprina*) e a espécie *Musca domestica* (Muscidae). Indivíduos por concentração: 200. Amostra tratada independente da dose: 1200 indivíduos.

Espécie	Estabilidade da colônia		Duração do período de desenvolvimento pós-embrionário			Mortalidade	Efeitos pós-emergência
	Massa corporal	Razão Sexual	Estágio Larval	Estágio Pupal	Período Neolarva - adulto		
<i>Chrysomya albiceps</i>	Aumento	Estável	Acelerado	Demorado	Compensado	<p>Efeito agudo da mortalidade sobre o <b>estágio larval</b>.</p> <p>Mortalidade <b>pupal</b> não significativa.</p> <p>Maior <b>mortalidade</b> do período neolarva-adulto alcançada <b>57%</b> na dose de <b>100%</b>.</p>	<p>Não foram evidentes malformações macroscópicas na anatomia externa.</p> <p>Não foram descartadas malformações internas.</p>
<i>Chrysomya megacephala</i>	Redução Concentração mais efetiva: 50%.	Estável	Demorado	Acelerado	<p>No compensado, gerando uma <b>demora</b> nos grupos tratados de aproximadamente um (1) dia no período.</p> <p>Favorece a depredação e a multiparasitose.</p>	<p>Efeito agudo da mortalidade sobre o <b>estágio larval</b> com efeito transcendente ao <b>estágio pupal</b>.</p> <p>Maior <b>mortalidade</b> do período neolarva-adulto alcançada <b>43%</b> na concentração de <b>25%</b>.</p>	<p>Elevado índice de aparecimento de indivíduos com <b>malformações</b>, principalmente na concentração 10%.</p> <p>Favorece depredação e multiparasitose. Porcentagem de indivíduos tratados com malformações: 13,5%.</p> <p>Maior <b>mortalidade acumulada</b>: 56,5% na concentração 10%.</p>

Espécie	Estabilidade da colônia		Duração do período de desenvolvimento pós-embrionário			Mortalidade	Efeitos pós-emergência
	Massa corporal	Razão Sexual	Estágio Larval	Estágio Pupal	Período Neolarva - adulto		
<i>Chrysonya putoria</i>	Redução Concentração mais efetiva: 5%	Estável Tendência ligeira a masculinização nas concentrações	Acelerado	Acelerado	<p>No compensado, gerando uma <b>emergência prematura</b> de entre dois (2) e três (3) dias nos grupos tratados.</p> <p>Facilita o aparecimento de indivíduos com malformações e aumento da mortalidade acumulada por seletividade natural.</p>	<p>Efeito agudo da mortalidade sobre o <b>estágio larval</b> com marcado efeito transcendente ao <b>estágio pupal</b>.</p> <p>Maior <b>mortalidade</b> do período neolarva-adulto alcançada <b>54,5%</b> na concentração de <b>50%</b></p>	<p>Elevado índice de aparecimento de indivíduos com <b>malformações</b>, principalmente na concentração 25%.</p> <p>Favorece depredação e multiparasitose. Percentagem de indivíduos tratados com malformações: 12,5%.</p> <p>Maior <b>mortalidade acumulada</b>: 66,5% na concentração 50%.</p>
<i>Cochliomyia macellaria</i>	Pouco significativo	Estável	Irregular Acelerado para: 5%, 10% e 50% Demorado para: 75%.	Demorado	<p>Compensação parcial.</p> <p>Concentrações que não conseguiram compensar: 75% e 100%.</p> <p>Comportamento irregular que gera altas porcentagens de mortalidade.</p>	<p>Efeito agudo da mortalidade sobre o <b>estágio larval</b> com efeito transcendente ao <b>estágio pupal</b>.</p> <p>Maior <b>mortalidade</b> do período neolarva-adulto alcançada <b>72,0%</b> na concentração de <b>100%</b>.</p>	<p>Ligeiro índice de aparecimento de indivíduos com <b>malformações</b>. Com pouca variação na frequência de aparecimento entre as concentrações.</p> <p>Percentagem de indivíduos tratados com malformações: 2,08%.</p> <p>Pouca influência na <b>mortalidade acumulada</b>: 74,0% na concentração 100%.</p>

Espécie	Estabilidade da colônia		Duração do período de desenvolvimento pós-embrionário			Mortalidade	Efeitos pós-emergência
	Massa corporal	Razão Sexual	Estágio Larval	Estágio Pupal	Período Neolarva - adulto		
<i>Lucilia Cuprina</i>	Pouco significativo Ligeiramente menor na concentração 25%.	Estável	Acelerado Conc. De: 5% até 25%.	Demorado	No compensado, gerando uma <b>demora</b> nos grupos tratados de até aproximadamente três (3) dias no período.  Favorece depredação e multiparasitose.	Efeito agudo da mortalidade sobre o <b>estágio larval</b> com marcado efeito transcendente ao <b>estágio pupal</b> .  Maior <b>mortalidade</b> do período neolarva-adulto alcançada <b>54,5%</b> na concentração de <b>50%</b> .	Não foram evidentes malformações macroscópicas na anatomia externa.  Não foram descartadas malformações internas.
<i>Musca domestica</i>	Redução leve Conc: 5%, 10% e 50%.	Estável	Demorado	Invariável	Não compensado, gerando uma <b>demora</b> nos grupos tratados de até aproximadamente entre uma (1) e seis (6) horas.  Favorece depredação e multiparasitose.	Efeito agudo da mortalidade sobre o <b>estágio larval</b> com marcado efeito transcendente ao <b>estágio pupal</b> .  Maior <b>mortalidade</b> do período neolarva-adulto alcançada <b>61,5%</b> na concentração de <b>50%</b> .	Baixo índice de aparecimento de indivíduos com malformações.  Valor pouco ou não significativo, representando um 0,5% da população tratada.

Tabela XIX. Resumo simplificado do comportamento, em forma comparativa, do efeito da aplicação tópica dose única do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de cinco espécies da família Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria*, *Cochliomyia macellaria* e *Lucilia cuprina*) e a espécie *Musca domestica* (Muscidae). Indivíduos por concentração: 200. Amostra tratada independente da dose: 1200 indivíduos.

Espécie	Estabilidade da colônia		Duração do período de desenvolvimento pós-embrionário			Mortalidade (%)	Efeitos pós-emergência (%)
	Massa corporal	Razão Sexual	Estágio Larval	Estágio Pupal	Período Neolarva - adulto		
<i>Chrysomya albiceps</i>	↑	~	↓	↑	Compensado	Aguda M: 57 na C <sub>100%</sub>	---
<i>Chrysomya megacephala</i>	↓	~	↑	↓	↑ 1 dia	Aguda – crônica M: 43 na C <sub>25%</sub>	FA: 13,75 MA: 56,5
<i>Chrysomya putoria</i>	↓	~ ♂	↓	↓	↓ 3 dias	Aguda – crônica M: 54,5 na C <sub>50%</sub>	FA: 12,75 MA: 66,5
<i>Cochliomyia macellaria</i>	---	~	↕	↑	↕ Instável.	Aguda – crônica M: 72 na C <sub>100%</sub>	FA: 2,8 MA: 74,0
<i>Lucilia cuprina</i>	---	~	↓	↑	↑ 3 dias	Aguda – crônica M: 54,5 na C <sub>50%</sub>	---
<i>Musca domestica</i>	↓	~	↑	-	↑ ¼ dia	Aguda – crônica M: 61,5 na C <sub>50%</sub>	FA: 0,5

M: Mortalidade; C: Concentração; FA: Frequência de aparecimento; ~: Estável; ↑: Aumentou, ↓: Diminuiu, ---: Não significativo.

## 5 CONCLUSÕES

1. Ambos os extratos indicaram classes químicas semelhantes, e como esperado, estes apresentaram diferenças no aparecimento de alguns metabólitos coerentes com os tipos de solventes usados para cada extração. Além disso, se identificaram classes químicas reconhecidas pela atividade inseticida e outras que justificaram vários dos comportamentos toxicológicos observados.
2. O extrato hidroalcoólico a 25% de sementes de *P. mammosa* resultou ser o mais adverso, sugerindo que, caso venha a ser desenvolvido algum produto a partir deste, deverá ser indicado na etiqueta que caso seja ingerido, podem vir a apresentar episódios de arritmia cardíaca, transtornos e sangramentos gastrointestinais com possibilidade de óbito dependendo se a dose ingerida supera os 300 mg/Kg de massa corporal. O extrato aquoso bruto possui um limite maior de tolerância para aparecerem alguns destes sintomas, sendo menos provável a morte.
3. O contato de qualquer um dos dois extratos com a pele saudável não gera dano nem risco para outro órgão, entretanto poderá causar uma irritabilidade oftálmica leve reversível entre as 72 a 96 horas para ambos os extratos se estes fossem colocados em contato com os olhos.
4. Nos estudos de atividade inseticida, com o extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa*, sobre o desenvolvimento pós-embrionário das cinco espécies de Calliphoridae (*C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *L. cuprina* e *C. macellaria*) e em *M. domestica* (Muscidae), foi observado que o extrato afetou em alguns casos o ganho na massa corporal durante a alimentação (L1-L3); estendendo ou encurtando a duração dos estágios larval e pupal com incidência direta sobre todo o período desde neolarva até adulto, demonstrando que pode ser considerado um candidato para o controle alternativo destas espécies.
5. O extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* induziu o aparecimento de indivíduos com asas não infladas como principal alteração morfológica macroscópica, evidenciada em quatro das espécies estudadas (*C. megacephala*, *C. putoria*, *C. macellaria* e *M. domestica*).

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel FA, Khalaf KT & Khater KS. Biocidal Activity of two botanical volatile oils against the larvae of *Synthesiomyia nudiseta* (Wulp) (Diptera: Muscidae). Egypt. Acad. J. biolog. Sci. 2009. 2 (1): 89 – 101.
- Aguiar-Coelho VM & Milward-de-Azevedo EMV. Associação entre larvas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Calliphoridae, Diptera) sob condições de laboratório. Revista Brasileira de Entomologia. 1996. 41(1): 35-40.
- Ahid SMM. Apostila Didática em Entomologia Veterinária. Apostila, Universidade Federal Rural do Semi-Árido. 2009.
- Aktar W, Sengupta D & Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. Interdisc Toxicol. 2009. 2:1–12.
- Aleman CL, Más RM & Rodeiro I. Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months. Laboratory Animals. 1998. 32(4): 457–466.
- Aleman CL. Reference database for the principal physiological indicators in three species of laboratory animal. Laboratory Animals. 2000. 34(1): 358–378.
- Almeida JEM & Batista-Filho, A. Banco de Microorganismos Entomopatogênicos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 2001. 20: 30-33.
- Álvarez MD, De La Fuente, JL; Villarrubia MD, Menéndez JC & Ortiz LE. Actividad biológica de *Ricinus communis* sobre mosca doméstica (*Musca domestica*). Rev Cubana Med Tropical. 1996. 48(3).
- Amorim DS. Neotropical Diptera Diversity: Richness, patterns and perspectives. p. 71-97. In: Pape T, Bickel D, Meier R. Diptera Diversity: Status, challenges and tools. Koninklijke Brill NV, Leiden. 459p. 2009.
- Amorim JA & Ribeiro OB. Distinction among the Puparia of Three Blowfly Species (Diptera: Calliphoridae) Frequently Found on Unburied Corpses. Memória Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2001, 96.
- Azevedo JL. Controle Microbiano de Insetos-Pragas e seu Melhoramento Genético. In: Melo I. S. de; Azevedo J. L. de. Controle Biológico. São Paulo: Embrapa. 1998, Cap. 2, p. 69-96.
- Baptista-da-Silva JÁ, Moya-Borja GE & Queiroz MMC. Ocorrência e sazonalidade de muscóides (Diptera, Calliphoridae) de importância sanitária no município de Itaboraí, RJ, Brasil. EntomoBrasilis, 2010. 3(1): 16-21.
- Barbosa AP, Souza do Nascimento C. & Wellington de Moraes J. Estudos de propriedades antitermíticas de extratos brutos de madeira e casca de espécies florestais da Amazônia Central, Brasil. Acta Amazônica. 2007. 37(2): 213 – 218.
- Barbosa LS, Couri MS & Aguiar-Coelho VM. Desempenho do parasitóide *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera, Pteromalidae) utilizando como hospedeiro *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae), sob diferentes tempos de exposição. Revista Brasileira de Entomologia. 2010 março. 54(1): 125–129.

- Barbosa LS, Couri MS & Aguiar-Coelho VMA. Desenvolvimento de *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae), utilizando diferentes densidades do parasitoide. *Biota Neotrop.* 2008a. 8(1): 49-54.
- Barbosa LS, Couri MS & Coelho VMA. Influência do aumento do número de pupas hospedeiras de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) no desenvolvimento do parasitoide *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera, Pteromalidae) em laboratório. *Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre.* 2008b. 98(3): 339-344.
- Barson G, Renn N. & Bywater AF. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. *J. Invertebr. Pathol.* 1994. 6: 107-113.
- Baumgartner DL & Greenberg B. Distribution and medical ecology of the blowflies (Diptera: Calliphoridae) of Peru. *Annals of the Entomological Society of America* 78(5): 565-587, 1985.
- Baumgatner PL & Greenberg B. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. *J. Med. Ent.* 1984. 21 (1): 105-113.
- Baumgatner PL. Spread of Introduced *Chrysomya* Blowflies (Diptera, Calliphoridae) in the Neotropics with records to Venezuela. *Biotropica.* 1988. 20: 167-168.
- Baumhover AH. Eradication of the screwworm fly an agent of myiasis. *Journal of the American Association.* 1966. 196(3): 240-248.
- Bell A, Fellows LE & Simmonds MSJ. Natural products from plants for the control of insect pests. In: Hodgson E, Kuhr RJ. *Safer insecticide development and use.* New York and Basel, Marcel Dekker. 1990. 337-383.
- Benecke. *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations.* Edited by Byrd JH & Castner. 2<sup>nd</sup> Ed. Chapter 20. CRC Press Taylor and Francis Group. 6000 Broken Sound Park Way Suite NW. Suite 300. Boca Raton Florida US. 2004.
- Berkebile DR, Sagel A, Skoda SR & Foster JE. Laboratory environment effects on the reproduction and mortality of adult screwworm (Diptera: Calliphoridae) Neotropical Entomology. 2006. 35(6): 781-786.
- Blanco-Metzler B, Laprade S. Enemigos naturales de la mosca blanca *Aleurodicus dispersus* Russell (Homoptera: Aleyrodidae): Parasitoides y depredadores. *Agronomía mesoamericana.* 1998. 9(2): 41-44.
- Boleti APA, Freire MGM, Coelho MB, Da Silva W, Baldasso PA, Gomes VM, Maragoni S, Novello JC & Macedo MLR. Insecticidal and Antifungal Activity of a Protein from *Pouteria torta* Seeds with Lectin-like Properties. *J. Agric. Food Chem.* 2007. 55: 2653-2658.
- Boleti APA, Kubo CEG & Macedo MLR. Effect of pouterin, a protein from *Pouteria torta* (Sapotaceae) seeds, on the development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *International Journal of Tropical Insect Science.* 2009. 29(1): 24–30.
- Borror DC, Triplehorn CA & Johnson NF. *An introduction to the study of insects.* 6th ed. Saunders College Publishing, Philadelphia. 1989: 875.

- Bowers WS. Insect-plant interaction: endocrine defenses. Origins and Development of Adaptation. London. Pitman. 1984. 102:119-131.
- Brechelt A. O Manejo Ecológico de Pragas e Doenças. Rio Grande do Sul Centro de Apoio ao Pequeno Agricultor, 2004.
- Brindley WA & Selim AA. Synergism and antagonism in the analysis of insecticide resistance. Environ. Entomol. 1984. 13: 349-353.
- Brito LG, Oliveira MCS, Giglioti R, Barbieri FS, Netto FGS, Chagas ACS, Celestino OO. Manual de identificação, importância e manutenção de colônias estoque de dípteras de interesse veterinário em laboratório. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Documentos125. ISSN 0103-9865. 2008. Verificado em 25 de outubro de 2015. Disponível em: [http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/23204/1/doc125\\_dipteras.pdf](http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/23204/1/doc125_dipteras.pdf)
- Brunherotto R & Vendramim JD. Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* L. sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro. Neotropical Entomology, 2001, 30: 455-459.
- Brunton LL, Chabner BA & Knollmann BC. Eds. Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY, USA, 12th edition, 2011.
- Brusca RC & Brusca GJ. Invertebrates. Sinauer, Sunderland, MA. 2003: 936.
- Buss EA & Park-Brown SG. Natural products for insect pest management. IFAS Extension, University of Florida. 2006:6.
- Byrd JH & Butler JF. Effects of Temperature on *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) Development. Journal of Medical Entomology. 1997. 34(3): 353-357.
- Byrd JH & Butler JF. Effects of Temperature on *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) Development. Journal of Medical Entomology. 1996. 33(6): 901-905.
- Cabral MMO, Crescente ERF, Mendonça PM, Gomes CMS, Oliveira VC, Kelecom A. *Melia azedarach* L. extracts and their activity on *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2008. 18 (Supl.): 699-702.
- Cabral MMO, Garcia ES, Rembold H. Antimoulting activity in Brazilian *Melia azedarach*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1996. 91: 117-118.
- Cabral MMO, Mendonça PM, Gomes CMS, Barbosa Filho JM, Queiroz MMC, Mello RP. Biological activity of neolignans on the post-embryonic development of *Chrysomya megacephala*. Fitoterapia. 2007a. 78: 20-24.
- Cabral MMO, Mendonça PM, Gomes MS, Barbosa-Filho JM, Silva-Dias C, Soares MJ & Queiroz MMC. Biological activity of yangambin on the postembryonic development of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) J. Med. Entomol. 2007b. 44, 249-255.
- Caen AR, Reis A & Bhutta A. Vascular Access and Drug Therapy in Pediatric Resuscitation. Pediatric Clinics of North America, 2008. 55 (4): 909-927. ISSN 0031-3955. PMID 18675026.

- Campbell PM, Trott JF, Claudianos C, Smyth KA, Russell R J & Oakeshott JG. Biochemistry of esterases associated with organophosphate resistance in *Lucilia cuprina* with comparisons to putative orthologues in other Diptera. *Biochem. Genet.* 1997. 35: 17–40.
- Cappuccino N. Novel approaches to the study of the population dynamics. In: Cappuccino N, Price PW, (Ed). *Population Dynamics: new approaches and synthesis*. San Diego: Academic press, 1995: 3-16.
- Carraro VM & Milward-de-Azevedo EMV. Quantitative description of Calliphorid dipterans captured on the Campus of Federal Rural University of Rio de Janeiro using sardine bait. *Revista Brasileira Zootecias.* 1999. (1): 77-89.
- Carreira M. *Insetos de interesse médico e veterinário*. Curitiba: UFPR. 1991: 228.
- Cariço C, Pinto ZT, Dutok CMS, Caetano RL, Pessanha RR, Chil-Nunez I, Mendonça PM, Escalona-Arranz JC, Reyes-Tur B & Queiroz MMC. Biological activity of *Pouteria sapota* leaf extract on post-embryonic development of blowfly *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) (Calliphoridae). *Revista Brasileira de Farmacognosia (Impresso)*. 2014. 24: 304-308.
- Carvalho AR, d’Almeida JM & Mello RP. Dinâmica Populacional e Parasitismo de Himenópteros Parasitóides de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae), no Rio de Janeiro, RJ. *Revista Brasileira de Entomologia.* 2005a. 49(1): 118- 122.
- Carvalho AR, d’Almeida JM, de Mello RP. Ocorrência de multiparasitismo em larvas de terceiro instar e pupas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) em condições de campo. *Revista Brasileira de Entomologia.* 2005b. 49(1): 162-164.
- Carvalho CJB & Mello-Patiu AC. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia.* 2008 52(3): 390-406.
- Carvalho CJB & Ribeiro PB. Chave de identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do sul do Brasil. *Rev. Bras.Parasitol. Vet.* 2000. 9(2): 169-173.
- Carvalho CJB, Rafael JA, Couri MS, Silva VC. Diptera, p. 702-744. In: Rafael JA, Melo GAR, Carvalho CJB, Casari AS, Constantino R. *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia*. Ed. Holos. 810p, 2012.
- Carvalho de Souza L. Redescrição das larvas de terceiro instar de cinco espécies de dípteros califorídeos (Insecta, Diptera) de importância para a entomologia forense. Dissertação de mestrado. 2006. 6f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Distrito Federal. 2006.
- Carvalho LML & Linhares AX. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural Forest area in southeastern Brazil. *Journal of Forensic Science.* 2001. 46(3): 604-608.
- Carvalho WA. Fatores de Risco Relacionados com Exposição Ocupacional e Ambiental a Inseticidas Organoclorados no Estado da Bahia, Brasil, 1985. *Bol. Of Sanit. Panam.* 1991. 111(6): 512-524.
- Catehouse JA. Plant resistance toward insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist.* 2002. 156: 145-169.
- CCAC - Canadian Council on Animal Care, Guideline for Selecting Appropriate End Points in Specific Areas of Biomedical Research and Testing. *Guide to the Care and Use of Experimental*

- Animal, vol. 1, chapter 6, Canadian Council on Animal Care (CCAC), Ottawa, Canada, 2nd edition, 1993, [http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate\\_endpoint.pdf](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf).
- Chhabra SC, Mahunnah RLA & Mshiu EN. Plants used in traditional medicine in Eastern Tanzania. VI. Angiosperms (Sapotaceae to Zingiberaceae). J. Ethnopharmacol. 1993. 39: 83-103.
- Cíntia AM, Silva LA & Simeoni DS. Genus *Pouteria*: Chemistry and biological activity. Braz J. Pharmacogn. 2009 Abr./Jun. 19(2A).
- Cloyd R. Natural indeed: Are natural insecticide safer and better than conventional insecticide? Illinois Pesticide Review. 2004. 17:1-3.
- Coley PD & Barone JA. Herbivory and Plant Defenses in Tropical Forests. Annual Review of Ecology and Systematics. 1996. 27: 305-335.
- Cooler RR, Boucias DG, Franck JH, Maruniak JE, García C & Pendland C. Characterization and description of a virus causing salivary gland hyperplasia in the housefly, *Musca domestica*. Med. Vet. Entomol. 1993. 7: 275-282.
- Costa PRP, Wiegand MM, Brum JGW & Ribeiro PB. Flutuação populacional das espécies de *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Município de Capão do Leão, RS / Population variance of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) species. Arquivo Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia. 1992. 44(4): 289-296.
- Coutinho HLC. Diversidade microbiana e agricultura sustentável. In: Workshop Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas. Campinas. 1996: 17.
- D'Almeida JM & Jourdan M C. Dípteros caliptrados sinantrópicos do aterro sanitário de Jardim Gramacho, Duque de Caxias, RJ. Revista Brasileira de Biologia. 1991. 51(2): 307-311.
- D'Almeida, JM & Ferro Fraga MB. Desenvolvimento Pós-embriônico de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) em Dietas Artificiais. Acta Biologica Leopoldensia. 23, 2001.
- Debach P & Rosen D. Biological control by natural enemies. 2th ed. Cambridge: University Press. 1991: 386.
- Deleito CSR & Moya-Borja GE. Nim (*Azadirachta indica*): uma alternativa no controle de moscas na pecuária. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2008. 238(6): 293-298.
- Dethier VG. Mechanisms of host plant recognition. Entomologia Experimentalis et Applicata. 1982. 31:49-56.
- Domínguez JA. Métodos de Investigación Fitoquímica, Editorial Limusa, Mexico City, Mexico, 1979.
- Draize J.H, Woodward G & Calvary O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1944. 82(3): 377-390.
- Elmnan A, Balgees A & Mangara JL. Effect of fenugreek (*Trigonella foenm greacum*) seed dietary levels on lipid profile and body weight gain of rats. Pakistan Journal of Nutrition. 2012. 11(11): 1004-1008.

- Esser JR. Biology of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) and reduction of losses caused to the salted-dried fish industry in south-east. *Bulleting of Entomological Research*. 1991. 81: 33-41.
- Esser JR. Factors influencing oviposition, larval growth and mortality in *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), a pest of salted dried fish in south-east Asia. *Bulletin of Entomological Research*. 1990 Dec. 80(04): 369-376.
- Eyer F, Felgenhauer N, Jetzinger E, Pfab R & Zilker TR. Acute endosulfan poisoning with cerebral edema and cardiac failure. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2004. 42(6): 927-32.
- Faria MVC. Avaliação de Ambientes e Produtos Contaminados por Agrotóxicos In: Peres F, Moreira J. C. *É Veneno ou é Remédio: agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2003: 177-209.
- Farías JM, Mascher D, Paredes-Carbajal MC, Torres-Duran PV & Juárez-Oropeza MA. Uso de los fármacos en oftalmología. *Colombia Médica*. 2010. 29 (2): 29–38.
- Fathy KH. The insecticidal activity of four medicinal plants against the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *International Journal of Dermatology*. 2009. 48: 492–497.
- Feinstein L. Insecticides from plants. In: *Insects: The Year Book of Agriculture*. U.S.D.A, Washington, DC. 1952: 229.
- Ferreira CJ. Bioatividade dos Extratos *Rheedia longifolia*, *Garcinia xanthochymus*, *Plumbago scandens*, *Hovenia dulcis*, *Malpighia glaba*, *Euphorbia tirucalli* L. e *Nerium oleander* sobre ovos de *Anocentor nittens* (Neuman, 1897) (Acari; Ixodidae). Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Fluminense. 2009.
- Ferreira MJM & Lacerda PV. Muscóides Sinantrópicos associados ao lixo urbano em Goiânia, Goiás. *Revista Brasileira de Zoologia*. 1993. 10(2): 185-195.
- Ferreira MJM, Santos BB & Cunha HF. Flutuação populacional de espécies de *Chrysomya Robineau-Desvoidy* (Diptera, Calliphoridae) em pomar de Goiânia, Goiás, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 1995. 12(3): 557-562.
- Ferreira MJM. Sinantropia de Calliphoridae (Diptera) em Goiânia, Goiás. *Revista Brasileira de Biologia*. 1983. 43(2): 199-210.
- Fill M & Coronado R. Ryanodine receptor channel of sarcoplasmatic reticulum. *Trends Neuroscience*. 1988. 11: 453-457.
- Fisher RA. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford. 1930.
- Flores E & Wolff M. Descripción y clave de los Estadios Inmaduros de las Principales Especies de Calliphoridae (Diptera) de Importancia Forense em Colombia. *Neotropical Entomology*. 2009. 38 (3):418-429.
- Francesconi F & Lupi O. Myiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. doi:10.1128/CMR.00010-11. 2012 Jan. 25(1): 79-105.
- Freitas SRQ de. Bioatividade de extratos aquosos de *Eucalyptus* sp. L'Hér. (Myrtaceae) e *Melia azedarach* L. (Meliaceae) sobre *Musca domestica* L. (Diptera, Muscidae). 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

- FUNASA. Controle de Vetores: procedimentos de segurança. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.
- Furlanetto SMP, Campos MLC, Hársi CM, Buralli GM & Gatto BL, Sena MC, Giglioti R, Da Silva BF, Goulart da Silva NF, De Souza ChAC & De Oliveira CO. Manual de identificação, importância e manutenção de colônias estoque de dípteros de interesse veterinário em laboratório. (Documentos/Embrapa Rondonia, ISSN 0103-9865;125). Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia. 2008: 25.
- Furlanetto SMP, Campos MLC, Hársi CM, Buralli GM & Ishihata GK. Microorganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) no Brasil. Revista de Microbiologia. 1984. 15: 170-174.
- Gabre RM, Adham FK & Chi H. Life table of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). Acta Oecologica. 2005. 27: 179-183.
- Gad SC, Frith ChH & Goodman DG. The mouse. In: Animal Models in Toxicology, Gad SC, Ed., vol. 46, pp. 25–72, Taylor & Francis, New York, NY, USA, 2nd edition, 2007.
- Gallos D, Nakano O, Silveira-Neto S, Carvalho RPL, Baptista GC, de Berti-Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD, Marchini LC, Lopes JRS & Omoto C. Entomologia Agrícola. Piracicaba: FEALQ. 2002.
- García-Simon G, Palacios M, Pérez L, García R, Díaz G & Gazapo R. Elaboración de una metodología para evaluar la irritabilidad oftálmica. Validación con distintos métodos. Revista Cubana de Farmacia. 1988. 22(2): 54.
- Geden CJ, Rutz DA & Steinkraus DC. Virulence of different isolates and formulations of *Beauveria bassiana* for houseflies and the parasitoid *Muscidifurax raptor*. Biological Control. 1995. 5: 615-621.
- Gomes A, Koller WW & Barros TM. Sazonalidade da mosca-varejeira *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae), na região do Cerrado, Campo Grande, MS. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, São Carlos. 2000. 9(2): 125-128.
- Graczyk T, Knight R & Tamang L. Mechanical transmission of human protozoan parasites by insects. Clinical Microbiology Reviews, Washington. 2005. 1(18): 128-132.
- Grassberger M & Reiter C. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen- diagram. Forensic Science International. 2001. 120: 32–36.
- Greenberg B & Szyska ML. Immature stages and biology of fifteen species of Peruvian Calliphoridae, Diptera. The Entomological Society of America, Lanham. 1984. 77: 488-517.
- Greenberg B. Flies and Disease. Ecology, classification and biotic association. Ann. Entomol. Soc. Am. 1971. 83 (6): 1210-1214.
- Greenberg B. Flies and Disease. Ecology, classification and biotic association. (2). Princeton University Press. 1973.
- Greenberg B. Flies and Disease: Biology and disease transmission. Princeton Univ. Press. Princeton, NJ. 1973. 2: 447.
- Greenberg B. Flies and disease: Ecology, classification and biotic association. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ. 1971. 1: 856.

- Grissi L, Massard CL, Moya-Borja GE & Pereira JB. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora veterinária*. 2002. 21(5): 8-10.
- Grosourdy R. El médico botánico criollo. Librería Francisco Brachet. París. 1864. 3(6): 43
- Guimarães JH & Papavero N. Myiasis Caused by Facultative Parasites. In: Myiasis in man and animals in the Neotropical Region. Plêiade, Bibliographic database, São Paulo. 1999: 35.
- Guimarães JH, Prado AP & Linhares AX. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*. 1978. 22: 53-60.
- Guimarães JH, Tucci EC, Barros-Battesti DM. Ectoparasitas de Importância Veterinária. SP, Pleide/FAPESP. ISSN: 85-85795-42-5. 2001: 218.
- Gullan PJ & Cranston PS. Os Insetos: um resumo de entomologia. São Paulo, Rocca. 2007.
- Hall M & Wall R. Myiasis of Humans and Domestic Animals. *Advances in Parasitology*. 1995. 35: 257 – 334.
- Hanski I. Nutritional ecology of dung and carrion-feeding insects. In: Nutritional Ecology of Insects, Mites, Stidery and Related Invertebrates. An: Overview, N. Y. 1987.
- Hayes W. Principles and methods of toxicology. 2nd ed. New York; Raven Press 54-58, 188-201, 251-307, 407-433. 1994.
- Hemingway J & Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* 2000. 45:371–391.
- HMA - Harvard Medical Asea Guideline, Guidelines for Animal Studies Involving Death as an End Point, HMA, 1999.
- Hodgman TC, Zinim SM, Sawyer CM & Ellar DJ. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain which is toxic to the housefly *Musca domestica*. *FEMS Microbiol.* 1993. Let. II4: 17-22.
- Huang RC, Zhou JB & Suenaga H. Insect anti-feeding property of limonoids from Okinawan and Chinese *Melia azedarach* L., and from Chinese *Melia tosendan* (Meliaceae). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 1996. 59: 1755-1757.
- Ignoffo CM & Gard Y. Use of an agar-base diet and house fly larvae to assay p-exotoxina activity of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econom. Entomol.* 1970. 63: 1987-1989.
- Imbiriba AS, Izutani DT & Milhoreto IT. Introdução de *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na Região Neotropical (Diptera, Calliphoridae). *Arquivos de Biologia e Tecnologia*. 1977. 20: 35-39.
- Ishihata GK. Microorganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) no Brasil. *Revista de Microbiologia*. 1984. 15: 170–174.
- Isman MB. Problems and opportunities for the commercialization of botanical insecticides. In *Biopesticides of Plant Origin*, ed. C Regnault-Roger, BJR Philogène, C Vincent. 2005: 283–91.
- Jeong ES, Lee Y, Hwang JH & Knipple DC. Effect of the common oleander *Nerium indicum* (Apocyanaceae) on male fertility and spermatogenesis in the oriental tobacco budworm *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera, Noctuidae). *The Journal Experimental Biology*. 2001. 204: 3935-3942.

- Jirón LF. Sobre moscas califóridas de Costa Rica (Diptera: Calliphoridae). *Brensia*. 1979. 16: 221-22.
- Khater HF & Khater DF. The insecticidal activity of four medicinal plants against the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Internat. J. Dermatol.* 2009. 48: 492-497.
- Klaassen CD & Rozman K. Absorption, distribution and excretion of toxicants. In: Casarrett; Doull's Toxicology: The basic science of poisons. New York: Mc Graw-Hill, 1991.
- Kuramoto H & Shimazu M. Control de las poblaciones de la mosca de la casa por *Entomophthora muscae* (Zygomycotina: Entomophthorales) en el gallinero. *Appl. Entomol. Zool.* 1997. 32: 325-331.
- Laurence BR. The tropical african latrine blowfly, *Chrysomya putoria* (Wiedemann). *Medical and Veterinary Entomology*. 1986. 2: 285-291.
- Laurence BR. The tropical african latrine blowfly, *Chrysomya putoria* (Wiedemann). *Medical and Veterinary Entomology*. 1988 July. 2(3): 285 – 291.
- Legner EF. Biological control of díptera of medical and veterinary importance. *J. Vector Ecol.* 1995: 59-120.
- Levot GW, Brown KR & Shipp E. Larval growth of some Calliphorid and Sarcophagid (DIPTERA). *Bulleting of Entomomological Reserch, Asia*. 1979. 69: 469-475.
- Leyva M, Juan ET, Marquetti MC & Domingo M. Actividad insecticida de 3 aceites esenciales de plantas en *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Rev Cubana de Med. Tropical.* 2008. 60(3).
- Linhares AX. Synanthropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia (Impresso), São Paulo*. 1981. 25: 189-215.
- Liu SQ, Shi JJ, Cao H, Jia FB, Liu XQ & Shi GL. Survey of pesticidal component in plant. In: Benjing, L. (Ed.), *Entomology in China in 21st Century*. Science & Technique Press, China. 2000.
- Lopes MBP. Efeitos dos Compostos do Extrato de *Plumbago scandens* (Lineaus, 1758) (Plumbaginaceae) sobre o Desenvolvimento de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) (Diptera: Calliphoridae), em Condições de Laboratório. Monografia de Graduação (Licenciado em Biologia) – Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro. 2010.
- Mariconi FAM, Guimarães JH & Filho EB. A mosca doméstica e algumas outras moscas nocivas. Piracicaba, FEALQ. 135p. 1999.
- Mariluis JCA. Nuevos Calliphoridae para la Argentina, Bolívia y Ecuador (Diptera). *Rev. Soc. Ent. Argent.* 1981. 40(1-4): 103-105.
- Marinho CRACG, Azevedo V & Aguiar-Coelho. Diversidade de califorídeos (Diptera: Calliphoridae) em área urbana, Rio de Janeiro. *Entomol. Vect.* 2003. 10: 185-199.
- Mathew N, Anitha MG, Bala TSL, Sivakumar SM, Narmadha R & Kalyanasundaram M. Larvicidal activity of *Saraca indica*, *Nystanthes arbortristis* and *Clitoria ternatea* against three mosquito vector species. *Parasitology Res.* 2009. 104: 1017–1025.

- Mavárez-Cardozo MG, Espina de Ferreira AL, Barrios-Ferrer FA & Ferreira-Paz JL. La entomología forense y el Neotrópico. Cuaderno de Medicina Forense. 2005. 11(39): 23-33.
- Mc Alpine JF. et al. (Coord.) Manual of Nearctic Diptera. Vol 1. Research Branch Agriculture Canada Monograph. 1981. 27: 74.
- Mello RP, D'Almeida JM & Oliveira SMP. Relações tróficas entre dípteros calípteros (Calliphoridae, Faniidae, Muscidae e Sacophagidae) criados em diferentes substratos, no Rio de Janeiro, Brasil. Entomologia y Vectores. 1997. 4(4): 111-121.
- Mello RP, Queiroz MMC & Aguiar-Coelho VM. Population fluctuations of calliphorid species (Diptera, Calliphoridae) in the Biological Reserve of Tinguá, state of Rio de Janeiro, Brazil. Iheringia. 2007. 97(4): 81-485.
- Mello RP. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. Entomologia y Vectores, Rio de Janeiro. 2003. 10(2): 255-268.
- Mello RP. Contribuição ao estudo do gênero *Phaenicia* R.-D., 1863 (DIPTERA, CALLIPHORIDAE). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1961. 59(3): 259-278.
- Mendonça PM, Lima MG, Albuquerque LRM, Carvalho MG & Queiroz MMC. Effects of latex from “Amapazeiro” *Parahacornia amapa* (Apocynaceae) on blowfly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) post-embryonic development. Veterinary Parasitology. 2011. 178:379-382
- Milward-de-Azevedo EMV, Serafin I, Piranda EM, Gulias-Gomes CC. Desempenho reprodutivo de *Nasonia vitripennis* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas crioconservadas de *Chrysomya megacephala* Fabricius (Diptera: Calliphoridae): avaliação preliminar. Cienc. Rural. Santa Maria 2004. (34): 1. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000100032>.
- Montano N, Cogliati Ch, Porta A, Pagani M, Malliani A, Narkiewicz K, Abboud FM, Birkett C et al. Central vagotonic effects of atropine modulate spectral oscillations of sympathetic nerve activity. Circulation. 1998. 98: 1394–99. doi:10.1161/01.CIR.98.14.1394
- Monteiro MR & do Prado AP. Ocorrência de *Trichopria* sp. (Hymenoptera: Diapriidae) atacando pupas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) na granja. An. Soc. Entomol. Brasil. 2000. 29(1): 159-167.
- Montenegro LHM, Oliveira PES, Conserva LM, Rocha EMM, Brito AC, Araújo RM, Trevisan MTS & Lyra-Lemos RP. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). Braz J. Pharmacogn, 2006 Dez (Supl.): 611-617.
- Mordue (Luntz) AJ & Blackwell A. *Azadiracht* in: a update. Journal of Insect Physiology. 1993. 39: 903-924.
- Mörner J, Bos R & Fredrix M. Reducing and eliminating the use of persistent organic pesticides. Guidance on alternative strategies for sustainable pest and vector management. 2002. 91p. Disponível em: <http://www.who.int/heli/risks/vectors/vectordirectory/en/index.html> Acessado em: Maio/2015.

- Mosberg AT & Hayes WA “Subchronic toxicity testing,” in Principles and Methods of Toxicology, A. Wallace-Hayes, Ed., Raven Press, New York, NY, USA, 2nd edition, 1989.
- Moya-Borja GE. Erradicação ou manejo integrado das míases neotropicais das Américas? Pesquisa Veterinária Brasileira. 2003. 23(3): 131-137.
- Needham DM. The chemical changes during the metamorphosis of insects. Biological Reviews. 1929. 4: 307–326.
- NRSP 312. Norma Ramal de Salud Pública. Extractos fluidos y tinturas. Métodos de ensayos. MINSAP; 1-5. 1991.
- Nuorteva P. Sarcosaprophagus insects as forensic indicators. Vol. II. In: Forensic Medicine: A study of trauma and environmental hazards. Saunders, Philadelphia: By. Tedeschi CG, Eckert WG, Tedeschi G. 1977: 1072- 1095.
- OECD/OCDE 402. Guideline for Testing of Chemicals. Test Guideline 402: Acute Dermal Toxicity. In: OECD/OCDE - Organization for Economic Cooperation and Development Guideline for Testing of Chemicals, OECD, 1987. [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788)
- OECD/OCDE 404. Guideline for Testing of Chemicals. Test Guideline 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion, Organization for Economic Cooperation and Development - OECD/OCDE 2000. Disponível: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788)
- OECD/OCDE 405. Guideline for Testing of Chemicals. Test Guideline 405: Acute Eye Irritation/Corrosion, Organization for Economic Cooperation and Development - OECD/OCDE 2002. Disponível: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788)
- OECD/OCDE 423. Guideline for Testing of Chemicals. Test Guideline 423: Acute oral toxicity - acute toxic class method. In: OECD/OCDE - Organization for Economic Cooperation and Development Guideline for Testing of Chemicals, OECD, 2012. [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788)
- Oliveira VC, D’Almeida JM, Abalem de Sá IV, Mandarino JR & Solari CA. Enterobactérias associadas a adultos de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1754) (Diptera: Calliphoridae) no Jardim Zoológico, Rio de Janeiro. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2006. 58(4): 556-561.
- Oliveira-Costa J & Queiroz MMC. Bionomia de Dípteros de Interesse Forense. In: Janyra de Oliveira-Costa. (Org.). Entomologia Forense - Quando os insetos são Vestígios. 2ed. Campinas, SP: Millenium. 2007. 1: 197-218.
- Oliveira-Costa J. Entomologia Forense – Quando os insetos são vestígios. Campinas: Millennium. ISBN: 85-7625-001-2. 2003.
- Paes MJ, Brito LG, Moya-Borja GE & Daemon E. Comportamento reprodutivo e longevidade de casais isolados e agrupados de *Lucilia cuprina*, sob condições controladas. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2005. 14(1): 21-25.

- Paraluppi ND, Vasconcelos JC, Aquino JS, Castellón EG & Silva MSB. Calliphoridae (Diptera) em Manaus: IV. Bacteria isolated from blowflies collected in street markets. *Acta Amazonica*. 1996. 26(1-2): 93-96.
- Paterson HE. The status of *Chrysomya chloropyga* and *Chrysomya putoria* (Diptera, Calliphoridae). *Proc. 2<sup>nd</sup> Natl Ent Congr, Pretoria* 13-16 september 1977:5-6.
- Pessanha RR, Carramaschi IN, dos Santos Malet JR, Queiroz MMC & Zahner V. Evaluation of larvicidal activity and effects on post embryonic development of laboratory reared *Lucilia cuprina* (Wiedemann 1830) (Diptera: Calliphoridae), treated with *Brevibacillus laterosporus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2015. 128: 44-46.
- Petit PR, Sauvaire YD, Hillaire-Buys DM et al. Steroid saponins from fenugreek seeds: extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. *Steroids*. 1995. 60(10): 674–680.
- Pianka ER. On r and k selection. *Am. Nat.* 1970. 104: 592-597.
- Pinto ZT, Fernández Sánchez F, Santos AR, Amaral ACF, Ferreira JLP, Escalona-Arranz JC & Queiroz MMC. Effect of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) oil and citral on post-embryonic time of blowflies. *Journal of Entomology and Nematology*. 2015. Aceito para publicação.
- Pohlit AM, Rezende AR, Baldin ELL, Lopes NP & Neto VFA. Plant Extracts, Isolated Phytochemicals, and Plant-Derived Agents Which Are Lethal to Arthropod Vectors of Human Tropical Diseases – A Review. *Planta Med.* 2011. 77: 618–630.
- Prado AP & Guimarães. Estado atual de dispersão e distribuição do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy na região tropical (Díptera: Calliphoridae). *Revista Bras. Entomologia*. 1982. 26: 225-231.
- Prins AJ. Morphological and biological notes on six south African blow-flies (Diptera, Calliphoridae) and their immature stages. *South African Museum, Cape Town*. 1982. 4(90): 201-217.
- Pujol-Luz JR & Santana FH. Chave de Identificação de moscas (Diptera) com especial atenção para as de interesse para a entomologia forense. Departamento de Zoologia – Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2004.
- Queiroz MMC & Milward-de-Azevedo EMV. Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Zoologia (Impresso)* (Cessou em 2008. Cont. ISSN 1984-4670 *Zoologia (Curitiba. Impresso)*, São Paulo. 1991. 8: 75-84.
- Queiroz MMC, Mello RP, Lima MM. Morphological Aspects of the Larval Instars of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) Reared in the Laboratory. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 1997. 92(2): 187-196.
- Queiroz MMC. Aspectos da bioecologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório. Tese de Mestrado, Parasitologia Veterinária, UFRRJ. 72 pp. 1991.
- Queiroz MMC. Temperature requirements of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera, Calliphoridae) under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1996 91(6): 785-788.

- Rafael JA, Melo, Gabriel AR, Carvalho CJB, Casari AS, Constantino R. Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. 1. ed. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 2012. v.1. 810p.
- Rao PU, Sesikeran B, Rao PS, Naidu AN, Rao VV & Ramachandran EP. Short term nutritional and safety evaluation of fenugreek. *Nutrition Research*. 1996. 16(9): 1495–1505.
- Rattan RS. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*. 2010. 29: 913-920.
- Reis SF, Stangenhuis G, Godoy WAC, Von-Zuben CJ & Ribeiro OB. Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*. 1994. 38: 33-46.
- Remón RH, Alarcón ZA, Almeida SM, Viera TY, Ramos EM & Bazan OY. Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de los extractos secos de tinturas al 20 % de *Mammea americana* L. *Rev Cubana Plant. Med*. 2012. 17(4).
- Rhodes DJ. Formulation of biological control agents. In: *Exploitation of microorganisms*. Jones DG. (Ed.), Chapman & Hall, London. 1993: 411-439.
- Ribeiro MJR, Dias MFD, Teshima E & Barboni AR. Insalubridade ambiental e aspectos sociais associados a patógenos intestinais isolados de dípteros. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, Rio de Janeiro. 2011. 6(1): 83-90.
- Ribeiro PB & Carvalho CJB. Chave de identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia*. 2000. 9(2): 169-173.
- Ritter L, Solomon KR, Forget J, Stemeroff M & O'leary C. A. Review of Selected Persistent Organic Pollutants. Draft Interim Report: International Program on Chemical Safety, WHO, Geneva, Switzerland, 1995.
- Rivera AM, Carballo GC, Milanés FM, Ramos GR & Orama VRA. Efecto de plaguicidas de origen botánico sobre el áfido *Carolinaia cyperi* Ainslie. *Rev Cubana Plant. Med*. 2003. 8(3).
- Roberts R. Some North American Parasites of Blowflies. *Journal of Agricultural Research*. 1935. 50(6): 479-494.
- Rodrigues-Guimarães RRR, Guimarães EAM, Pile NA, Norberg MMC, Russel GB, Sing P & Fenemore PG. Insect-control chemical from plants. III. Toxic lignans from *Libocedrus bidwillii*. *Aust. J. Biol. Sci*. 1976: 99-103.
- Roel AR. Utilização de Plantas com Propriedades Inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*, 2001, 1(2):43-50.
- Roig MJT. Plantas Medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Ed. Científico-Técnica. La Habana 2012. 2: 622.
- Salles LAB & Rech NL. Efeitos de extratos de nim (*Azadiractha indica*) e cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). *Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas*. 1999. 5(3): 225-227.
- Santos CF, Alves VIC, Matias LJ, Pereira CM, Leite LO & Borges MAZ. Impacto do tratamento com larvicida no parasitismo de *Musca domestica* (Diptera: muscidae) em granja de postura em Montes Claros, MG. *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG.

- Santos MJP & Moya-Borja GE. Estudo Comparativo do Desenvolvimento Pós-embrionário de *Fannia pusio* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Fanniidae) em Diferentes Substratos. Arq. Biol. Tecnol. 1997. 40: 253- 61.
- Schmutterer H. The Neem Tree. Mumbai: Neem Found. 2002: 892.
- Serra-Freire NM, Mello RP. Entomologia & acarologia na medicina veterinária. 1<sup>ed</sup>. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária Ltda. 2006. 1: 200p.
- Sethajintanin D & Anderson KA. Temporal bioavailability of organochlorine pesticides and PCBs. Environ. Sci. Technol. 2006. 15: 3689-3695.
- Sharma RD, Sarkar A, Hazra DK, Misra B, Singh JB & Maheshwari BB. Toxicological evaluation of fenugreek seeds: a long term feeding experiment in diabetic patients. Phytotherapy Research. 1996. 10(6): 519–520.
- Silva ACL. Efeitos dos compostos do látex de *Parahancornia amapa* (Huber) (Apocynaceae) sobre o desenvolvimento de *Chrysomya putoria* (wiedemann, 1818 (Diptera: Calliphoridae). Trabalho monográfico de conclusão de curso de Ciências Biológicas. Universidade Castelo Branco. Dez. 2009.
- Silva CF, Batista MM, Batista D da G, de Souza EM, da Silva PB, de Oliveira GM, Meuser AS, Shareef AR, Boykin DW, Soeiro Mde N. In vitro and in vivo studies of the trypanocidal activity of a diarylthiophene diamidine against *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemother. 2008. 52(9): 3307-3314.
- Silva ICR, Godoy WAC, Von Zuben CJ & Mancera PFA. Populations dynamic of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) at different temperatures. African Entomology. 2004. 12(2): 157-163.
- Silva SLC, Carvalho MG, Gualberto AS, Carneiro-Torres DS, Vasconcelos KCF & de Oliveira NF. Bioatividade do extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). Acta Veterinaria Brasilica. 2010. 4(4): 252-258.
- Snow JW, Whitten CJ, Salinas A, Ferrer J & Sudlow WH. The screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), in Central America and proposed plans for its eradication South to the Darien gap in Panama. Journal of Medical Entomology. 1985. 22(4): 353-360.
- Stanley PC. Trees and Shrubs of Mexico. Smithsonian Institution. Washington, Govt. Print. Off. 1923: 1120.
- Stevens J & Wall R. (1996) Classification of the genus *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae): a preliminary parsimony analysis. J. Nat. Hist. 1996. 30: 1087- 1094.
- Stevens J & Wall R. Genetic variation in populations of the blow flies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Random amplified polymorphic DNA and mitochondrial DNA sequences. Biochemical Systematics and Ecology. 1997. 25(2): 81-97.
- Sukontason KL, Bunchoo M, Khantawa B, Piangjai S, Sukontason K, Methanitikorn R & Rongsriyam Y. Mechanical carrier of bacterial enteric pathogens by *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in Chiang Mai, Thailand. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health. 2000. 31 (Suppl. 1): 157-61.

- Sukontason KL, Narongchal P, Sripakdee D, Boonchu N, Chaiwong T, Ngern-Klun R, Piangjai S, Sukontason K. First report of human myiasis caused by *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) in Thailand, and its implication in forensic entomology. *Journal of Medical Entomology*. 2005. 42: 702–704.
- Takeda M. Photoperiodic time measurement and related physiological mechanisms in insects and mites. *Annual Review Entomology*. 1997. 42: 323–49.
- Tervuren Xylarium Wood Database. Based on (Jacq.) H.E.Moore & Stearn publicado em *Taxon* 16(5): 383. 1967. Verificado: 07/11/2015, disponível em: <http://www.africanmuseum.be/collections/browsecollections/naturalsciences/earth/xylarium/species/SN10067>
- Thompson FC. *The Diptera site*. The biosystematic database of world Diptera. Nomenclator status statistics. Version 10.5 [www.sl.barc.usda.gov/diptera/names/Status/bdwdstat.htm](http://www.sl.barc.usda.gov/diptera/names/Status/bdwdstat.htm) Acesso em maio 2015, 2008.
- Thyssen PJ, Moretti TC, Ueta MT, & Ribeiro OB. O papel de insetos (Blattodea, Diptera e Hymenoptera) como possíveis vetores mecânicos de helmintos em ambiente domiciliar e peridomiciliar. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2004. 20(4): 1096-1102.
- Timm BL, da Silva PB, Batista MM, da Silva FH, da Silva CF, Tidwell RR2, Patrick DA, Jones SK, Bakunov SA, Bakunova SM & Soeiro M de N. In vitro and in vivo biological effects of novel arylimidamide derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. Doi: 10.1128/AAC.02353-14. 2014. 58(7): 3720-3726.
- Turchetto M & Vanin S. Forensic Entomology and Climatic change. *Forensic Science International*. 2004. 146: 207-209.
- Ullerich F. Geschlechtschromosomen ug geschlechtsbestimmung bei einigen Calliphorinen (Calliphoridae, Diptera). *Chromosoma*. 1963. 14: 46-110
- Urzúa A. Insecticide Properties of the essential oils from *Haplopappus foliosus* and *Bahia ambrosoides* against the house fly, *Musca domestica* L. *J. Chil. Chem. Soc*. 2010. 55(3).
- Van BT & de Groot A. Terpenoides antialimentadores. Parte I. Una visión general de antialimentadores terpenoides de origen natural. *Trav.Chim Rec. Pays-Bas*. 1986:105-112.
- Van DR & Bellows JRTS. *Biological Control*. New York, Chapman & Hall, 1996: 447.
- Van Emden H. F, Peakall D. B. *Beyond Silent Spring: Integrated pest management and chemical safety*. Springer. 1996: 320.
- Vianna EES, Costa PRP, Fernandes AL & Ribeiro PB. Abundância e flutuação populacional das espécies de *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia*. 2004. 94(3): 231-234
- Viegas-Júnior C. Terpenos com Atividade Inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*. 2003. 26(3): 390-400.
- Vieira PC, Mafezoli J & Biavatti MW. Inseticidas de Origem Vegetal. In: Ferreira, J. T. B.; Corrêa, A. G.; Vieira, P. C. (org.). *Produtos Naturais no Controle de Insetos*. 1ª ed. São Carlo: Editora da UFSCar. 2001. Cap. 2: 23 – 45

- Von-zubem CJ. Comportamento de oviposturas individuais, porcentagem de peso larval mínimo para pupação em populações de *Chrysomya megacephala*. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. 1998. 27(4): 525-533.
- Wallace-Hayes A. Principles and Methods of Toxicology, Raven Press, New York, NY, USA, 2nd edition, 1994.
- Wells JD, Lunt N, Villet MH. Recent African derivation of *Chrysomya putoria* from *C. chloropyga* and mitochondrial DNA paraphyly of cytochrome oxidase subunit one in blowflies of forensic importance. Med. Vet. Entomol. 2004 Dec.18(4):445-8.
- Wells JD. *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) has reached the continental United States: Review of its biology, pest status, and spread around the world. J. med. Ent. 1991. 28: 471-473.
- Whalon ME, Mota SD & Hollingworth RM. Global Pesticides Resistance in Arthropods. Londres: Oxfordshire. 2008.
- Wiegmann BM, Trautwein MD, Winkler IS, Barr NB, Kim JW, Lambkin C, Bertone MA, Cassel BK, Bayless KM, Heimberg AM, Wheeler BM, Peterson KJ, Pape T, Sinclair BJ, Skevington JH, Blagoderov V, Caravas J, Kutty SN, Schmidt-Ott U, Kampmeier GE, Thompson FC, Grimaldi DA, Beckenbach AT, Courtney GW, Friedrich M, Meier R, Yeates DK. Episodic radiations in the fly tree of life. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011. 108: 5690-5695.
- Wilfredo C. Secretos de Plantas Medicinales. Apuntes para la Fitoterapia Dominicana. Disponível em: [http://www.diariolibre.com/noticias/2005/11/14/i79718\\_zapote.html](http://www.diariolibre.com/noticias/2005/11/14/i79718_zapote.html). Data de atualização: Fev, 2015.
- Xu M, McCanna DJ & Sivak JG. Use of the viability reagent Presto Blue in comparison with Alamar Blue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. J Pharmacol Toxicol Methods. Doi: 10.1016/j.vascn. 2014.11.003. 2015. 71:1-7.
- Zucchi RA, Silveira-Neto S & Nakano O. Guia de identificação de pragas agrícolas. Piracicaba, SP: ESALQ, 139p., 1993.
- Zumt F. Myiasis in man and animals in the Old World. Butterworths, London. 1965.

## 7 ANEXOS

### ANEXO I. Certidão de classificação e depósito do material vegetal.



#### HERBARIO DEL CENTRO ORIENTAL DE ECOSISTEMAS Y BIODIVERSIDAD Museo de Historia Natural "Tomás Romay"

José Antonio Saco No. 601 - Santiago de Cuba. Cuba - CP: 90100 - Teléfono: + (53) (22) 62-3277

Clasificación de material vegetal presentado por:

Msc: Carlos M. Dutok Sánchez

No.: Hae No 468

Nombre científico: *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist

Nombre vulgar: "Zapote" "Romay colorao"

Familia: Sapotaceae

Localidad: El Caney Stgo de Cuba

Provincia: Stgo de Cuba Coord.: \_\_\_\_\_

Leg.: Msc: Carlos M. Dutok Sánchez

Fecha: 21 / 2 / 2012 Hábito: \_\_\_\_\_

Formación vegetal: \_\_\_\_\_

Sustrato: \_\_\_\_\_ Altitud: \_\_\_\_\_

Fenología: \_\_\_\_\_ Det.: Félix Acosta Cantillo

Especialista: Srq. Forestal Félix Acosta Cantillo



M.Sc. Gustavo Dolanco Durán

## ANEXO II. Evidências qualitativas da aparição das classes químicas.

METABÓLITOS	TESTES	EVIDÊNCIAS QUALITATIVAS DA PRESENÇA DAS CLASSES QUÍMICAS
<b>Alcaloides</b>	Dragendorff	Formação de um precipitado laranja avermelhado.
	Mayer	Formação de um precipitado branco ou amarelo claro, amorfo ou cristalino.
	Wagner	Formação de um precipitado marrom.
<b>Triterpenos esteroides</b>	e/ou Lieberman-Burchard	Variações de cor que começam a progredir desde uma cor rosa-lilás passando por verde claro até uma cor verde muito escura.
	Solkowski	Cor vermelha na fase superior e uma cor amarela avermelhada com fluorescência verde na fase inferior.
<b>Quinonas</b>	Borntreger	Aparecimento de uma cor rosa na fase aquosa alcalina.
	Variante ácido sulfúrico	Aparecimento de uma cor amarela na fase benzeno e cor rosa na fase alcalina.
<b>Cumarinas</b>	Baljet	Formação de um precipitado vermelho de claro a escuro.
	Legal	Aparecimento de uma cor vermelha intensa que desaparece depois de vários minutos.
<b>Lipídeos e/ou Óleos essenciais</b>	Sudão	Aparecimento de uma cor vermelha-laranja.
	Ensaio para óleos essenciais com papel branco sem reagente	Quando se coloca uma gota e se deixa secar ao ar, no caso positivo a mancha se apresenta transparente quando olhada a contraluz. Se se esquentar o papel a 110 °C: caso exista óleos essenciais vai desaparecer a transparência do papel. Quando se esquentar, se a mancha ficar mais transparente, é sinal positivo para de óleos e gorduras.
	Ensaio para óleos fixos	Quando 5 mL do extrato é colocado sobre um vidro de relógio ou placa de Petri a temperatura ambiente. O aparecimento de um líquido oleoso depois da evaporação, se ficar uma mancha de gordura sobre o papel de filtro, indica presença de óleos fixos. Se ao evaporar o solvente aparecer uma película fina resinosa, indica a presença de óleo secante. Se ao se evaporar o solvente aparecer um líquido oleoso aromático que não deixa mancha de gordura sobre o papel de filtro, indica a presença de óleos essenciais.
<b>Mucilagens</b>	Prova para mucilagens	Formação de um gel delicado ou consistência borrachosa ao tato.
<b>Saponinas</b>	Prova de espuma	Formação de uma coluna de espuma de 2 cm que seja estável por 24 horas.
<b>Fenóis Taninos</b>	e/ou Prova de Cloreto Férrico	Aparecimento de uma cor verde escura e azul na fase aquosa.
<b>Aminoácidos</b>	Ninhidrina	Aparecimento de uma cor azul até tons de lilás.
<b>Açúcares redutores</b>	Fehling	Formação de um precipitado intenso de vermelho a marrom.
	Benedict	Formação de um precipitado intenso de vermelho a marrom.
<b>Glicosídeos cardiotônicos</b>	Kedde	Formação do complexo de Meisenheimer que possui como evidência o aparecimento de uma cor vermelha-lilás.
	Ácido sulfúrico concentrado	Aparecimento de uma cor laranja gelo.
<b>Flavonoides</b>	Shinoda	Aparecimento de uma cor amarela a laranja.
	Prova Alcalina (Álcali)	Aparecimento de uma cor amarela a laranja.
	Rosemheim	Aparecimento de uma cor vermelha.
<b>Glicosídeos cianogênicos</b>	Guignard	Em 15 minutos, uma tira de papel de filtro tratado com uma solução de picrato de sódio, muda de amarelo para tons de vermelhos.
<b>Resinas</b>	Prova de Resinas	Aparecimento de um precipitado quando a 2 mL do extrato suspenso em etanol são adicionados 10 mL de água destilada.

## ANEXO III. Aprovação do Comité de Ética “Facultad de Ciencias Naturales Universidad de Oriente” Cuba.



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE**

**COMITÉ DE ÉTICA**

---

Universidad de Oriente - Alturas de Quintero - Patricio Lumumba - Santiago de Cuba, CP: 90500 - CUBA  
Teléfono: +(53) (22) 63-2263 - Fax: +(53) (22) 63-2689 - E-mail: [decanocnt@cnt.uo.edu.cu](mailto:decanocnt@cnt.uo.edu.cu)

---

### AVAL PARA INVESTIGACIÓN

**Santiago de Cuba, 21 de diciembre de 2001.**

El Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Naturales mediante la presente emite, su criterio final acerca de la investigación situada dentro del marco del proyecto aprobado CAPES/MES-Cuba, número 130/11 titulado: “*Dípteros muscoides de importancia sanitaria y forense: Bionomía y control alternativo a través de la evaluación de extractos de especies vegetales cubanas*”. Coordinado por la Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz, Investigadora Titular en Salud Pública del Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz de Rio de Janeiro-Brasil, y por el Dr. Bernardo Reyes Tur, Profesor Titular de la Universidad de Oriente-Cuba.

El estudio que se somete a consideración constituye una investigación novedosa y necesaria que contribuirá al conocimiento de los aspectos bioecológicos y bionómicos de las diversas especies de dípteros muscoides de las familias Calliphoridae, Muscidae y Sacophagidae, de modo que permite el uso estos insectos como modelos biológicos en diversos experimentos en instituciones de investigación. Asimismo, dar subsidios al conocimiento de la biología de las diferentes especies de muscoides de importancia sanitaria que es insipiente en la literatura y reducir los casos de enfermedades parasitarias e infecciosas transmitidas y causadas por dípteros muscoides (moscas).

Dentro de este proyecto, como parte de la tesis de Doctorado del M.Sc. Carlos Manuel Dutok Sánchez se prevé: Evaluar la seguridad y la eficacia de los extractos acuoso e hidroalcohólico a 25%, de las semillas de *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist para el control alternativo de dípteros muscoides de la familia Calliphoridae y de la especie *Musca domestica* (Díptera: Muscidae).

En nuestro país al árbol de “Zapote o Mamey” se le encuentra frecuentemente en jardines caseros, a lo largo de las calles y como sombra de café, porque pierde mucho de sus hojas justamente en el periodo cuando las plantas de café necesitan sol. Precisamente, su característica de desfoliarse en una época del

año, permite aprovechar esta parte del árbol sin que surja el riesgo de causar daño de extinción a esta especie, ni al medio ambiente. De igual forma las semillas una vez que el fruto ha sido consumido son desechadas cuando podrían ser utilizadas como materia prima en la obtención de aceites de interés y otros derivados.

Considerando además los efectos colaterales que causa la exposición a los pesticidas tradicionales, así como su acumulación en los diferentes biomas se hace necesario la realización de estudios toxicológicos en modelos *in vivo* que de fe de un uso seguro de un futuro producto, tanto para el hombre, animales o ecosistema en general.

Por lo que los miembros de este Comité Científico reunidos en la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente el día 21 de diciembre de 2011, aprueban la colecta del material vegetal (hojas exfoliadas y semillas de *Pouteria mammosa*) para la presente investigación, así como la realización de ensayos con animales de laboratorio siempre que sean llevados a cabo en un centro acreditado para los debidos fines y por personal calificado.

Dr.C. Adrian Trapero Quintana.  
Jefe del Departamento de Biología.  
Miembro del Consejo Científico.

Dr.C. Julio César Escalona Arranz.  
Jefe del Departamento de Farmacia.  
Miembro del Consejo Científico.



M.Sc. Tania López González  
Jefa de la Línea de Investigación.  
Medicina Comp. y Serv. Farmacéuticos.

Dra.C. Rosa María Pérez Silva.  
Vicedecana de Investigación y Postgrado  
Secretaria del Comité Científico.

## ANEXO IV. Declaração de credenciamento do “Centro de Toxicología e Biomedicina - TOXIMED” para o Manuseio de Animais de Laboratório.



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
CENTRO DE TOXICOLOGÍA Y BIOMEDICINA  
Santiago de Cuba



El Centro de Toxicología y Biomedicina (**TOXIMED**) creado desde 1997 en la Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba es una Unidad de Desarrollo Científico Tecnológico acorde al Registro Nacional de Entidades de Ciencia e Innovación Tecnológica del CITMA, Certificado No. 006 3 04, con fecha 3 de diciembre del 2004. Tiene como **misión** contribuir a la disminución de la morbilidad y la mortalidad por intoxicaciones así como proteger el medio ambiente del riesgo químico, con un alcance nacional, mediante prestación de servicios científico-técnicos, capacitación de recursos humanos y ejecución de investigaciones biomédicas aplicadas. Dentro de sus **encargos sociales** se encuentra efectuar acuerdos de colaboración con instituciones nacionales y extranjeras; ofrecer servicios de consultorías y trabajos investigativos especializados a entidades extranjeras y Organismos Internacionales en moneda libremente convertible de acuerdo a las estrategias de colaboración aprobadas; prestar servicios a la población y a empresas estatales de consultoría sobre toxicología en pesos cubanos. Todas estas actividades además de ser avaladas por el prestigio adquirido por el centro y sus investigadores a nivel nacional e internacional desde su creación, están amparadas por **cuerpos legales** que complementan la definición de las actividades que se desarrollan en TOXIMED, ellos son:

- Resolución Ministerial MINSAP No. 139, con fecha 6/09/1996. Define los centros que forman la Red Nacional de Centros de Toxicología y la Red Funcional de Implantología en el país y establece las tareas técnicas a cumplir.
- Resolución Ministerial MINSAP No. 86/04. Crea la Red Nacional de Laboratorios para el Diagnóstico de Certeza del Consumo de Drogas de Abuso.
- Resolución Ministerial MINSAP No. 29/2011. Establece los centros facultados para la ejecución de pruebas de detección de drogas tóxicas, sustancias alucinógenas, hipnóticas, estupefacientes u otras de efectos similares.
- Indicación No. 4/2010 del Ministro de Salud Pública para la implementación de la metodología del plan de reducción de desastres químicos y radiológicos en las instituciones de salud.

Dr. Ernesto Alvarez Fontanet

Dr. Ernesto Alvarez Fontanet  
Director  
TOXIMED

MSc. Mirley E. Romero Gainza  
Unidad de Garantía de la Calidad  
TOXIMED



Research Article

# Acute Toxicity and Dermal and Eye Irritation of the Aqueous and Hydroalcoholic Extracts of the Seeds of “Zapote” *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist

Carlos M. S. Dutok,<sup>1,2,3</sup> Clara Azalea Berenguer-Rivas,<sup>4</sup> Elizabeth Rodríguez-Leblanch,<sup>4</sup> Lilliana Pérez-Jackson,<sup>4</sup> Idelsy Chil-Nuñez,<sup>1,2,3</sup> Julio César Escalona-Arranz,<sup>3</sup> Bernardo Reyes-Tur,<sup>5</sup> and Margareth M. C. Queiroz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Entomologia Médica e Forense, Instituto Oswaldo Cruz-Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Avenida Brasil, 4365 Pavilhão Herman Lent, Sala 14, Térreo, Manguinhos, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, Bolsista com Financiamento CAPES/MES-Cuba Projeto 130/11, Instituto Oswaldo Cruz-Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Avenida Brasil 4365, Secretaria Acadêmica, Pavilhão Arthur Neiva, Manguinhos, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Patricio Lumumba y Avenida de Las Américas, 90500 Santiago de Cuba, Cuba

<sup>4</sup>Centro de Toxicología y Biomedicina, Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba, Autopista Nacional Km. 1.5, Apartado 4033, 90400 Santiago de Cuba, Cuba

<sup>5</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Patricio Lumumba y Avenida de Las Américas, 90500 Santiago de Cuba, Cuba

Correspondence should be addressed to Carlos M. S. Dutok; [cmdutok@gmail.com](mailto:cmdutok@gmail.com) and Margareth M. C. Queiroz; [mmcqueiroz@ioc.fiocruz.br](mailto:mmcqueiroz@ioc.fiocruz.br)

Received 17 March 2015; Accepted 29 June 2015

Academic Editor: Petros Samaras

Copyright © 2015 Carlos M. S. Dutok et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The common use of *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist, “Mamey or Zapote,” in food and ethnobotanic medicine shows its low or absent toxicity as fruit extracts prepared from seeds. However, it is essential to conduct security trials to scientifically support their use in drug therapy. This study evaluated the aqueous and hydroalcoholic extract (25%) Acute Oral Toxicity, obtained from the seeds of *P. mammosa*, in Sprague Dawley rats and dermal and eye irritability in New Zealand rabbits. The 404 and 405 acute dermal and eye irritation/corrosion guidelines were used, as well as the 423 Acute Oral Toxicity guideline, Acute Toxic Class Method of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). The aqueous extract was located in the following category: not classified as toxic (CTA 5), while hydroalcoholic extract at 25% was classified as dangerous (CTA 4). Both extracts can be used without side reaction that irritates the skin which permitted classification as potentially not irritant. *P. mammosa* in the two extracts caused mild and reversible eye irritation, and it was classified as slightly irritating.

## 1. Introduction

It is believed that the word “Zapote” has as origin the Aztec word “tzapotl,” which was generally applied to all sweet and soft fruits. For a long time this has been the common name for *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist. This plant fruit has been traditionally used for its medicinal properties against

fever, inflammation, skin rashes, ulcers, nausea, vomiting, and diabetes, besides being a rich source of nutrients [1]. In Cuba, the milky bark juice has been used since at least 1864 to destroy warts, while the extract of the seeds is used as emollient in painful skin diseases [2]. Also, infusions of the seed are used to treat cough and bronchitis, not only in Cuba but also in Costa Rica [3].

Species from the Sapotaceae family have been well studied for their insecticidal and larvicidal actions such as the case of *Pouteria venosa* (Mart.) Baehni. In this species, four isolated triterpenes (taraxerol, ursolic acid, 3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,23-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid, and 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,19 $\alpha$ ,23-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid) and a phytosteroid (spinasterol) were active against 4th instar larvae of *Aedes aegypti* [4]. In wood and bark extracts of *Pouteria guianensis* Aubl. chemical compounds with repellent properties against *Nasutitermes* sp. were identified [5]. Pouterin, a lectin-like protein isolated from *Pouteria torta* (Mart.) Radlk. seeds, caused 50% mortality in larvae of the insect *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera) when incorporated in the diet [6]. It is also known that this protein presents an insecticidal effect against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae [7]. These insects are recognized as a major cause of loss in stored grains throughout the world. Recently the activity of *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist aqueous extract in the postembryonic development of the blowfly *Chrysomya putoria* (Calliphoridae) was evaluated [8]. The results revealed a 47.5% decrease in the viability of the flies. The production of myiasis by flies and its affinity with humans and domestic animals has been known since antiquity [9, 10]. These results place *P. mammosa* as a candidate for alternative insect control, which is currently performed almost exclusively with the use of organophosphate insecticides, which are toxic to living beings, can cause serious environmental damage, and may induce or develop resistant insects [11, 12].

The ancient and common use of "Zapote" as food and/or therapeutic alternative signs it as not dangerous for human health. However, to scientifically support its use in drug therapy, it is essential to accomplish trials attesting its security. This study therefore evaluated the Acute Oral Toxicity and the Dermal and Eye Irritability tests of the aqueous and hydroalcoholic extracts (25%), obtained from the seeds of *P. mammosa*.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Plant Material.** *Pouteria mammosa* fruits were collected in February of 2012 in the town of "El Caney" Santiago de Cuba. Leaves and seeds were taxonomically identified by specialists of "Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO)" from the Natural History Museum Tomas Romay—Santiago de Cuba City. Desiccated specimens were deposited into the herbarium of the same institution under the registration number Hac 468.

**2.2. Zapote Seeds Extracts.** The endocarp from seeds of *P. mammosa* was removed and the endosperm pulverized in a knife mill. Aqueous and hydroalcoholic (25%) extracts in the proportion of 40 grams in 100 milliliters were prepared by maceration with agitation in a sieve for 8 hours. The extracts were filtered, bottled in amber flasks, and stored at 8°C. A qualitative phytochemical screening was carried out to determine the presence of alkaloids, triterpenes and/or steroids, quinones, coumarins, lipid and/or essential oils, mucilage, saponins, phenols and/or tannins, amino acids,

TABLE 1: Classification of substances according to the guideline 423 of the Organization for Economic Cooperation and Development [14].

DL <sub>50</sub> ranges (mg/kg)	ATC	Classification
DL <sub>50</sub> > 2000 mg/kg	ATC 5	Not classified
300 < DL <sub>50</sub> ≤ 2000 mg/kg	ATC 4	Dangerous
50 < DL <sub>50</sub> ≤ 300 mg/kg	ATC 3	Toxic
5 < DL <sub>50</sub> ≤ 50 mg/kg	ATC 2	Very toxic
DL <sub>50</sub> < 5 mg/kg	ATC 1	Highly toxic

reducing sugars, cardiac glycosides, flavonoids, cyanogenic glycosides, and resins [13].

**2.3. Animals and Ethical Considerations.** All the animals included in the study received during their lifetime water and food *ad libitum*. They were maintained under favorable environmental conditions with a temperature of 25°C, relative humidity between 40 and 70%, and cycles of light and darkness of 12/12 hours. Experiments were carried out following ethical guidelines towards animals and on the established principles of Reduction and Refinement. For Acute Oral Toxicity tests, six nulliparous female Sprague Dawley rats were used, aged between 5 and 6 weeks and weighing between 170 and 206 grams, provided by the National Center for Laboratory Animal Production (CENPALAB/Health Certificate number 08001414). Tests for Dermal and Eye Irritability were based, in each case, on three New Zealand line rabbits with ages of 11 ± 1 weeks and weight from 2 to 3 kg. Rabbits were provided by the Center for Reproduction of Rabbits "El Modelo" of Santiago de Cuba (Health Certificated number 0314).

**2.4. Acute Toxicity Test.** The *Guidelines for Testing of Chemicals*, Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method 423 of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), was used [17]. Substances ranges are set in toxic classes of not classified, dangerous, toxic, very toxic, and highly toxic as shown in Table 1.

Food was suspended 12 hours before starting the study and the body mass was determined moments before the administration of the extract. Animals were randomly assigned to two groups of three rats each: a control group treated with physiological saline and another group treated with the extracts. To the first experimental group a dose of 300 mg/kg was given using an orogastric tube. Clinical observations of animals were performed four times per day, paying attention to behavior, general physical condition, nasal mucosa, changes in skin and fur, respiratory frequency, somatomotor activity, and possible occurrence of signs such as tremors, convulsions, diarrhea, lethargy, drooling, low response to stimuli, sleep, photophobia, and coma. Palpation of the abdomen was carried out as well. After 48 hours of clinical observation without any signs of toxicity, a second experimental group was carried out administering 2000 mg/kg of extract. Animals were weighed on the seventh and fourteenth days. The animals were humanely euthanized

TABLE 2: Dermal Irritation Scores ranges established by Draize et al. 1944 [15] for classification of substances irritating effect on the skin.

Ranges of Dermal Irritation Score	Classification of dermal irritability
$0 < DIS < 0.4$	Not irritant
$0.4 \leq DIS < 2.0$	Slightly irritating
$2.0 \leq DIS < 5.0$	Moderately irritating
$5.0 \leq DIS \leq 8.0$	Severely irritating

TABLE 3: Ocular Irritation Scores ranges established under the Cuban method for classification of eye irritation/corrosion [16].

Ranges of Ocular Irritation Score	Classification of eye irritability
$0 < OIS < 10$	Not irritant
$10 \leq OIS < 20$	Slightly irritating
$20 \leq OIS < 30$	Moderately irritating
$30 \leq OIS \leq 110$	Severely irritating

at the end of the study by administering an overdose of the anesthetic ketamine intraperitoneally. Internal organs were subsequently studied macroscopically.

**2.5. Dermal Irritation Test.** Animals were shaved 24 hours before the application of the extracts on the back and both flanks (10% body surface). Skin was washed with sterile water and allowed to stand for 24 hours. Patches with 0.5 mL of extract were applied on an area of about 6 cm<sup>2</sup> of one flank, and the other flank was used as a reference. Animals were exposed to the extract for four hours after which the patches were removed and the application area was washed with sterile water. Observations were recorded at 1, 24, 48, and 72 hours after the removal of the patches. Behavior, general condition, posture and reflexes, attitude towards food, water, and hygiene were evaluated. Weights were recorded and compared at the beginning and the end of the study. Evaluation of edema and erythema was performed and the *Dermal Irritation Score* (DIS) was calculated by the following formula:

$$DIS = \frac{\text{Value (erythema + edema)}}{\text{Nr. of animals} \times \text{Nr. of observations}} \quad (1)$$

The extracts were classified as proposed by Draize et al., 1944, scale [15] (Table 2) and under the guidance for the evaluation of chemicals issued by the Organization for Economic Cooperation and Development, methodology used for determining the degree of acute dermal irritation/corrosion, 404 [17].

**2.6. Eye Irritation Test.** The guide for the evaluation of chemical substances issued by the Organization for Economic Cooperation and Development was used, following the methodology for determining the degree of acute eye irritation/corrosion, 405 [18]. A total of three rabbits per test group were subjected to a rigorous study of the ocular

structures: cornea, iris, and conjunctiva. A volume of 0.1 mL of extract was instilled to the bottom of the right conjunctival sac, keeping eyelids together over the next 20 minutes. Both eyes of each animal were examined at the time and 24, 48, and 72 hours after, always by the same specialist. Corneal damage was determined in a dark room with the use of a solution of 2% sodium fluorescein, and physiological saline was used to remove excess solution from the instilled developer substance. Finally an ultraviolet light was used for observation. Observations were made up to five days to assess reversibility of the effects, and animals were weighed at the end of the study to compare variations in this parameter. The *Ocular Irritation Score* (OIS) was determined using the formula below [18]:

$$OIS = \sum \frac{\text{Individual observations}}{\text{Nr. animals} \times \text{Nr. observations}} \quad (2)$$

The value obtained was compared with the ranges defined in Table 3 to give the results of approval or rejection, at the discretion of the Cuban method proposed by García-Simón et al., 1988, defined as OIS approval limits from 0 to 19 and rejection from 20 to 110 [16].

**2.7. Statistical Analyses.** Results were presented as means of at least three replications. Unpaired "t" test with Welch's correction for body weight comparisons was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA.

### 3. Results and Discussion

**3.1. Phytochemical Screening.** It was determined that both extracts (aqueous and hydroalcoholic at 25%) contained, in similar intensities, coumarins, saponins, phenols, and tannins, suggesting similar amounts. More flavonoids and cyanogenic glycosides were present in the aqueous extract than in the hydroalcoholic one. None of the extracts showed the presence of resins, cardiogenic glycosides, and mucilages. Metabolites which caused most differences between the two extracts were lipids and/or essential oils, amino acids, and reducing sugars that are only contained in the aqueous extract. Alkaloids, quinones and triterpenes, and steroids were evident only in the hydroalcoholic extract at 25% of *P. mammosa*.

**3.2. Acute Toxicity.** The employed doses of the aqueous extract of *P. mammosa* (2000 mg/kg) did not cause significant changes in the clinical signs in rats within 24 to 72 hours. After this period one of the animals showed little response to stimuli and subsequently died. The other two rats were subjected to a strict observation and clinical assessment within 14 days of the study, not presenting any alteration or irregularity in clinical signs. In the case of the hydroalcoholic extract at 25%, the first dose level (300 mg/kg) did not result in significant changes in clinical signs in rats. At 48 hours, the highest dose (2000 mg/kg) was administered. Three animals died. One rat died at 6 hours having presented cyanosis, little response to stimuli, and loose stools before death. Two

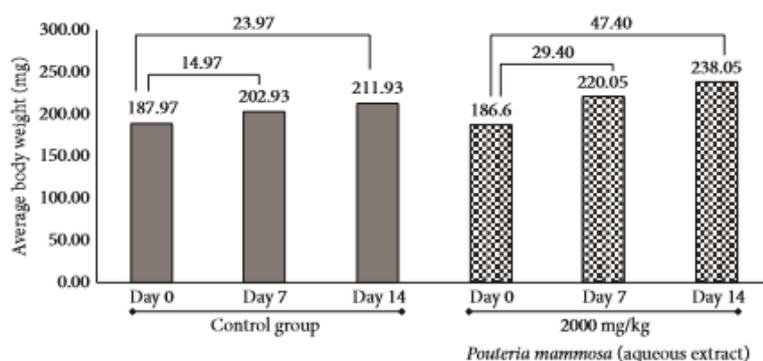


FIGURE 1: Behavior of body weight of rats in the Acute Oral Toxicity test of aqueous extract of the seeds of *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist (Zapote). Numbers on the horizontal lines represent weight gain in milligrams (mg) from day 0 until the seventh and final day of the trial.

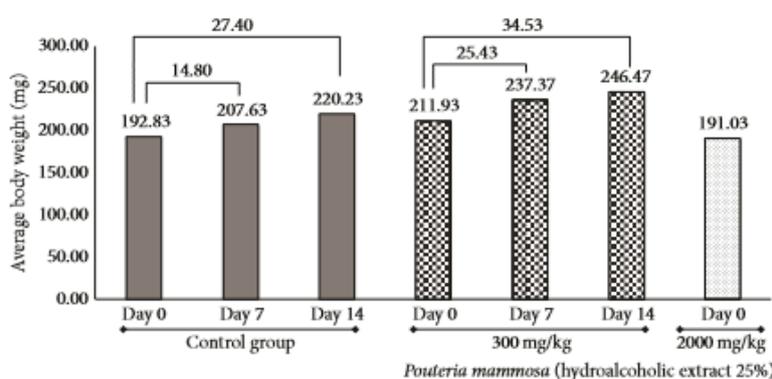


FIGURE 2: Behavior of the body weight of rats in Acute Oral Toxicity test of hydroalcoholic extract at 25% of seeds of *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist (Zapote). Numbers on the horizontal lines represent weight gain in milligrams (mg) from day 0 until the seventh and final day of the trial.

other rats died at 7 and 12 hours, showing similar clinical signs of rectal bleeding. At necropsy, the animals showed no macroscopic alterations of the organs except in the case of the dead rat at the dose level of 2000 mg/kg of the aqueous extract of *P. mammosa*, whose stomach showed an increase in size caused by gases. Intestinal edema with fibrinous exudate and distended cecum was also observed, which can be found related to the presence of cyanogenic glycosides contained in the extract.

According to Alemán and Gad et al., body weight is often the most sensible indicator of an adverse effect [19–21]. Other authors, such as Mosberg and Hayes, have argued that the data referring to body weight have a high sensitivity to alterations due to chemicals with low toxicity [22]. It is considered that among the indicators that provide more information in toxicological studies is the rapid loss of body weight (approximately 15 to 29% loss of body weight in a period of five to seven days) [23, 24].

It was observed that the body weight was not affected after administration of the extracts (Figures 1 and 2), showing a normal increase, which corresponds to standard references to the use and care of laboratory animals, in relation to the

species used [23, 25]. When the aqueous extract was analyzed (Figure 1), in the case of the group treated with *P. mammosa*, weight gain was 47.40 g (21.61%) and an increase in weight of 23.97 g (representing 11.31%) was observed in the control group. These results were corroborated by statistical analysis and significant differences,  $p < 0.05$ , in the unpaired “t” test were found with Welch’s correction. The treated group assimilated the maximum dose of 2000 mg/kg.

The hydroalcoholic extract of *P. mammosa* at 25% proved to have a superior level of toxicity because the maximum dose that was assimilated by the rats was 300 mg/kg (Figure 2). The control group had a 27.40 g increase until the end of study representing a 12.44% weight gain and treated group had an average increase of 34.53 g representing a 14.01% weight gain. No significant differences were found between the treated and the control groups when performing statistical analysis. When the 2000 mg/kg dose of hydroalcoholic extract of *P. mammosa* at 25% was administered all animals died. Weight gain was evident in all animals included in the study and was greater in those treated with extracts of *P. mammosa* in both forms, aqueous and hydroalcoholic 25%. This effect found for body weight is consistent with results obtained by

TABLE 4: Evaluation of ophthalmic damage caused by the aqueous and hydroalcoholic 25% extracts of seeds of *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist (Zapote).

Hours	Damage observed in the group treated with aqueous extract of seeds of <i>Pouteria mammosa</i>			Damage observed in the group treated with hydroalcoholic 25% extract of seeds of <i>Pouteria mammosa</i>		
	Conjunctiva	Iris	Cornea	Conjunctiva	Iris	Cornea
1	34	20	40	26	20	110
24	18	10	10	24	10	20
48	12	5	0	12	0	0
72	8	0	0	8	0	0
96	0	0	0	0	0	0
Total	72	35	50	70	30	130
Number of observations	157			230		
Ocular Irritation Score	10.5			15.3		

Petit et al.; Sharma et al.; Rao et al.; and Elmnan et al. that studied the effect of fenugreek seeds over metabolism of rats (*Trigonella foenum-graecum* L.). They reported that saponins increased food consumption, thus resulting in increased weight gain in rats [26–29]. In phytochemical screening of *P. mammosa* it was determined that both extracts (aqueous and hydroalcoholic at 25%) contained saponins, in similar intensities, which could justify the same effect in this study. Coincidentally a similar result was obtained in invertebrate organisms by Carriço et al. that studied the effect of *P. mammosa* on immature stages of *Chrysomya putoria*, wherein the groups treated with the aqueous extract of leaves resulted in an increase in body weight of maggots [8].

The group treated with 25% hydroalcoholic extract of *P. mammosa* showed the same evidence for the three dead rats at the dose level used: distended stomach with bloody walls, edematous and hemorrhagic bowel, and cyanotic walls of the stomach and intestinal mucosa. These results could be expected considering the abundance of alkaloids observed in the chemical composition of the hydroalcoholic extract, shown by the phytochemical screening. Some alkaloids of plant substances can act on cholinergic receptors at some neuroeffector junctions (acting as cholinomimetic agent) and the myenteric plexus in the gastrointestinal tract (GI) significantly stimulating the digestive tract. They can also induce tracheobronchial secretions and stimulate bronchial smooth muscle, resulting in intense bronchoconstriction and reduced vital capacity [30].

**3.3. Dermal Irritation.** Rabbits showed no signs of irritation or skin edema. The skin was intact when patches were removed and within 72 hours of the study. The Dermal Irritation Score for aqueous and hydroalcoholic 25% extracts of seeds of *P. mammosa* was equal to "0." Body weight in rabbits was not affected in any case after the application of extracts. A normal increase of body weight was observed corresponding to the established rules for handling laboratory animals, in relation to the species [23].

**3.4. Eye Irritation.** Ocular Irritation Score was 10.5 in the aqueous and slightly higher in the hydroalcoholic 25% extract

of *P. mammosa* (OIS = 15.3). The index for both cases is within acceptable limits as set by García-Simón et al. [16]. It was evident that the effects on the eye were reversible within 96 hours for those that occurred in the conjunctiva, 72 hours for those that occurred in the iris, and 48 hours for those on the cornea (Table 4). The behavior of body weight in rabbits was not affected after administration of the extracts. No clinical signs or changes in the behavior of animals associated with the administration of the extracts were evident.

#### 4. Conclusions

Aqueous extract of *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist was located in the following category: not classified as toxic (CTA 5), established by the guideline 423 of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). However, due to the occurrence of death of an animal and the manifestation of several clinical signs, the assessment of the subchronic toxicity is suggested by a toxicity test repeated dose for 28 days. The hydroalcoholic extract 25% at the dose of 2000 mg/kg showed clinical signs of toxicity and death of all animals, gross lesions in organs and organ systems. The extract was classified as dangerous (CTA 4), with a LD<sub>50</sub> mortality range between 300 and 2000 mg/kg. Neither extract induced any apparent adverse clinical signs in animals when applied on the skin, showing that *P. mammosa* can be used without side reaction on organs. Both extracts were classified as potentially not irritant, according to guideline 404 of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) which evaluates acute dermal irritation/corrosion. Both extracts obtained from seeds of *P. mammosa* caused mild and reversible damage. They were classified as slightly irritant, according to the guideline 405 of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) which evaluates acute eye irritation/corrosion.

#### Conflict of Interests

The authors declare that they have no financial and commercial interests. No conflict of interests has been declared.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Ministério de Educación Superior de Cuba (MES); Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado de Rio de Janeiro (FAPERJ); Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq), and Instituto Oswaldo Cruz, IOC/FIOCRUZ. For the English language correction of this paper the authors would like to thank Marina Vianna Braga, Trícia Augustin, and Josselin Rouillard.

## References

- [1] A. M. Cíntia, L. A. Silva, and D. S. Simeoni, "Genus *Pouteria*: chemistry and biological activity," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 19, no. 2, 2009.
- [2] R. Grosourdy, *El Médico Botánico Criollo*, TIII, no. 6, Librería de Francisco Brachet, Paris, France, 1864.
- [3] P. C. Stanley, "Contributions from the United States National Herbarium," in *Trees and Shrubs of Mexico*, vol. 23, p. 1120, Government Printing Office, Washington, DC, USA, 1923.
- [4] L. H. M. Montenegro, P. E. S. Oliveira, L. M. Conserva et al., "Terpenoides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae)," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 16, pp. 611–617, 2006.
- [5] A. P. Barbosa, C. S. Nascimento, and J. W. Morais, "Estudos de propriedades antitermíticas de extratos brutos de madeira e casca de espécies florestais da Amazônia Central, Brasil," *Acta Amazonica*, vol. 37, no. 2, pp. 213–218, 2007.
- [6] A. P. D. A. Boleti, M. D. G. M. Freire, M. B. Coelho et al., "Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 7, pp. 2653–2658, 2007.
- [7] A. P. D. A. Boleti, C. E. G. Kubo, and M. L. R. MacEdo, "Effect of pouterin, a protein from *Pouteria torta* (Sapotaceae) seeds, on the development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae)," *International Journal of Tropical Insect Science*, vol. 29, no. 1, pp. 24–30, 2009.
- [8] C. Carriço, Z. T. Pinto, C. M. S. Dutok et al., "Biological activity of *Pouteria sapota* leaf extract on postembryonic development of blowfly *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) (Calliphoridae)," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 24, no. 3, pp. 304–308, 2014.
- [9] F. Zumpt, *Myiasis in Man and Animals in the Old World*, Butterworths, London, UK, 1965.
- [10] K. L. Sukontason, P. Narongchai, D. Sripakdee et al., "First report of human myiasis caused by *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) in Thailand, and its implication in forensic entomology," *Journal of Medical Entomology*, vol. 42, no. 4, pp. 702–704, 2005.
- [11] S. Q. Liu, J. J. Shi, H. Cao, F. B. Jia, X. Q. Liu, and G. L. Shi, "Survey of pesticidal component in plant," in *Entomology in China in 21st Century*, L. Benjing, Ed., Science & Technique Press, Beijing, China, 2000.
- [12] P. M. Mendonça, M. G. Lima, L. R. M. Albuquerque, M. G. Carvalho, and M. M. C. Queiroz, "Effects of latex from 'Amapazeiro' *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) on blowfly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) post-embryonic development," *Veterinary Parasitology*, vol. 178, no. 3–4, pp. 379–382, 2011.
- [13] J. A. Domínguez, *Métodos de Investigación Fitoquímica*, Editorial Limusa, México City, Mexico, 1979.
- [14] OECD/OCDE, "Test guideline 423: acute oral toxicity—acute toxic class method," in *OECD/OCDE—Organization for Economic Cooperation and Development Guideline for Testing of Chemicals*, OECD, 2012.
- [15] J. H. Draize, G. Woodward, and O. Calvary, "Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 82, no. 3, pp. 377–390, 1944.
- [16] G. García-Simón, M. Palacios, L. Pérez, R. García, G. Díaz, and R. Gazapo, "Elaboración de una metodología para evaluar la irritabilidad oftálmica. Validación con distintos métodos," *Revista Cubana de Farmacia*, vol. 22, no. 2, p. 54, 1988.
- [17] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) and OCDE, *Guideline for Testing of Chemicals. Test Guideline 404. Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), OCDE, 2000.
- [18] OECD/OCDE, *Guideline for Testing of Chemicals. Test Guideline 405. Acute Eye Irritation/Corrosion*, Organization for Economic Cooperation and Development, 2002.
- [19] C. L. Alemán, R. M. Más, I. Rodeiro et al., "Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months," *Laboratory Animals*, vol. 32, no. 4, pp. 457–466, 1998.
- [20] C. Alemán, "Reference database for the principal physiological indicators in three species of laboratory animal," *Laboratory Animals*, vol. 34, no. 1, pp. 358–378, 2000.
- [21] S. C. Gad, Ch. H. Frith, and D. G. Goodman, "The mouse," in *Animal Models in Toxicology*, S. C. Gad, Ed., vol. 46, pp. 25–72, Taylor & Francis, New York, NY, USA, 2nd edition, 2007.
- [22] A. T. Mosberg and W. A. Hayes, "Subchronic toxicity testing," in *Principles and Methods of Toxicology*, A. Wallace-Hayes, Ed., Raven Press, New York, NY, USA, 2nd edition, 1989.
- [23] Canadian Council on Animal Care (CCAC), *Guideline for Selecting Appropriate End Points in Specific Areas of Biomedical Research and Testing. Guide to the Care and Use of Experimental Animal*, vol. 1, chapter 6, Canadian Council on Animal Care (CCAC), Ottawa, Canada, 2nd edition, 1993, [http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate\\_endpoint.pdf](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf).
- [24] HMA—Harvard Medical Asea Guideline, *Guidelines for Animal Studies Involving Death as an End Point*, HMA, 1999.
- [25] A. Wallace-Hayes, *Principles and Methods of Toxicology*, Raven Press, New York, NY, USA, 2nd edition, 1994.
- [26] P. R. Petit, Y. D. Sauvaire, D. M. Hillaire-Buys et al., "Steroid saponins from fenugreek seeds: extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol," *Steroids*, vol. 60, no. 10, pp. 674–680, 1995.
- [27] R. D. Sharma, A. Sarkar, D. K. Hazra, B. Misra, J. B. Singh, and B. B. Maheshwari, "Toxicological evaluation of fenugreek seeds: a long term feeding experiment in diabetic patients," *Phytotherapy Research*, vol. 10, no. 6, pp. 519–520, 1996.
- [28] P. U. Rao, B. Sesikeran, P. S. Rao, A. N. Naidu, V. V. Rao, and E. P. Ramachandran, "Short term nutritional and safety evaluation of fenugreek," *Nutrition Research*, vol. 16, no. 9, pp. 1495–1505, 1996.

- [29] A. Elmnan, A. Balgees, and J. L. Mangara, "Effect of fenugreek (*Trigonella foenum greacum*) seed dietary levels on lipid profile and body weight gain of rats," *Pakistan Journal of Nutrition*, vol. 11, no. 11, pp. 1004–1008, 2012.
- [30] L. L. Brunton, B. A. Chabner, and B. C. Knollmann, Eds., *Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY, USA, 12th edition, 2011.

ANEXO VI. Tabela de coleta de dados primários Test de Irritabilidade Oftálmica do Extrato Aquoso Bruto de sementes de *Pouteria mammosa*.

Dia de Inicio 23/04/2014

Hora	Animais	Córnea A*B*5										TOTAL	Íris C*5			TOTAL	Conjuntiva (D+E+F)*2												TOTAL	Σ	
		(A) Area					(B) Opacidade						(C)				(D) Eritema				(E) Edema				(F) Secreción						
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4		0	1	2		0	1	2	3	0	1	2	3	4	0	1	2			3
1h	1		x							x		15		x		5			X				x				x			10	30
	2				x			x				15			x	10			X				x				x			14	39
	3			x				x				10		x		5			X				x				x			10	25
24h	1		x					x				5		x		5		x					x				x			6	16
	2		x					x				5		x		5			X				x				x			8	18
	3	x						x				0	x			0		x					x			x			4	4	
48h	1	x						x				0	x			0		x				x				x			2	2	
	2	x						x				0		x		5		x				x				x			6	11	
	3	x						x				0	x			0		x				x				x			4	4	
72h	1	x						x				0	x			0	x					x				x			0	0	
	2	x						x				0	x			0	x					x				x			4	4	
	3	x						x				0	x			0		x				x				x			4	4	
96h	1	x						x				0	x			0	x					x				x			0	0	
	2	x						x				0	x			0	x					x				x			0	0	
	3	x						x				0	x			0	x					x				x			0	0	

Substância Avaliada: Extrato Aquoso de Sementes de *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist. (Zapote)

Téc. Que realizou a prova: Dr. Ernesto Álvarez Fontanet.

ANEXO VII. Tabela de coleta de dados primários Test de Irritabilidade Oftálmica do Extrato Hidroalcoólico 25% de sementes de *Pouteria mammosa*.

Dia de Inicio 23/04/2014

Hora	Animais	Córnea A*B*5										TOTAL	Íris C*5			TOTAL	Conjuntiva (D+E+F)*2												TOTAL	Σ	
		(A) Área					(B) Opacidade						(C)				(D) Eritema				(E) Edema				(F) Secreção						
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4		0	1	2		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3			
1h	1			x					x			20		x		5		x				x							4	29	
	2				x					x		45		x		5			x				x				x			8	58
	3				x					x		45			x	10			x					x		x				14	69
24h	1		x						x			5	x			0		x				x				x			4	9	
	2		x						x			5		x		5			x				x				x		10	20	
	3			x					x			10		x		5			x				x				x		10	25	
48h	1	x						x				0	x			0		x				x				x			4	4	
	2	x						x				0	x			0		x				x				x			4	4	
	3	x						x				0	x			0		x				x				x			4	4	
72h	1	x						x				0	x			0		x			x					x			2	2	
	2	x						x				0	x			0	x					x				x			2	2	
	3	x						x				0	x			0		x				x				x			4	2	
96h	1	x						x				0	x			0		x			x					x			0	0	
	2	x						x				0	x			0		x			x					x			0	0	
	3	x						x				0	x			0		x			x					x			0	0	

Substância Avaliada: Extrato Hidroalcoólico 25% de Sementes de *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist. (Zapote)

Téc. Que realizou a prova: Dr. Ernesto Álvarez Fontanet.