

FIOCRUZ

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

Bioatividade de óleos essenciais extraídos de duas espécies de *Piper* (Piperaceae) sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Calliphoridae), em laboratório.

RAQUEL FERNANDES SILVA CHAGAS DO NASCIMENTO

Orientadora: Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz

Rio de Janeiro - RJ

2018

Fernandes Silva Chagas do Nascimento, Raquel.

Bioatividade de óleos essenciais extraídos de duas espécies de Piper (Piperaceae) sobre o desenvolvimento pós-embriônico de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Calliphoridae), em laboratório. / Raquel Fernandes Silva Chagas do Nascimento. - Rio de Janeiro, 2018.
150 f.; il.

Monografia (Especialização) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Entomologia Médica, 2018.

Orientadora: Margareth Maria de Carvalho Queiroz.

Bibliografia: f. 133-149

1. Controle biológico. 2. Mosca varejeira. 3. Piperaceae. I. Título.

RAQUEL FERNANDES SILVA CHAGAS DO NASCIMENTO

Bioatividade de óleos essenciais extraídos de duas espécies de *Piper* (Piperaceae) sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Calliphoridae), em laboratório

Monografia submetida como requisito parcial para obtenção do grau de especialista em Ensino em Entomologia Médica, Curso de Especialização em Entomologia Médica, pelo Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ.

Laboratório de Entomologia Médica e Forense

Data: 09/04/2018

_____ Assinatura do Aluno

_____ Assinatura do Orientador

*“Quando o ser humano se mostrou inteligente o bastante para observar e imitar a natureza,
ele, também, foi muitas vezes recompensado com o sucesso”*

Rachel Carson

Primavera Silenciosa

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, que são os grandes amores da minha vida. Obrigada por estarem sempre ao meu lado quando preciso, por apoiarem todas as minhas decisões (mesmo que não concordem com algumas) e por me incentivarem sempre a buscar o melhor de mim em tudo o que eu fizer. Sou grata ao universo por ter pais tão amorosos, amigos e presentes como vocês. Sou o que sou graças aos seus ensinamentos, conselhos e puxões de orelha. Principalmente puxões de orelha. Vocês sempre foram e sempre serão o meu espelho.

Pai, obrigada por me mostrar que a gente só vive uma vez só. Que apesar dos compromissos e responsabilidades que nos comprometemos a fazer, temos que cuidar de nós mesmos e de quem nos faz e nos quer bem. Obrigada por me mostrar sempre o lado bom de tudo, pelo seu alto-astrol e pelas risadas. Você, tão diferente e tão igual a mim ao mesmo tempo, sempre será o único homem da minha vida.

Mãe, obrigada por me ensinar a ser uma pessoa honesta, correta e completamente apaixonada por tudo o que eu fizer. Apesar de você jurar que não foi por sua causa que eu me tornei bióloga, foi sim. Sempre admirei seu amor pela pesquisa e sua curiosidade científica. Amava tanto quando você me levava para o laboratório e me mostrava (e explicava em mil detalhes) as coisas que você fazia e descobria que no meu coração não houve espaço para dúvidas quanto ao que eu ser: igual a minha mãe. Espero um dia ser metade da mulher que você é, tanto profissionalmente, quanto socialmente.

Gostaria de agradecer às minhas irmãs queridas por todas as risadas, todo companheirismo e toda cumplicidade. Não consigo imaginar a minha vida sem vocês, as minhas melhores amigas. Vocês são a primeira coisa que eu penso quando levanto e a última que penso quando vou deitar. Meu coração é de vocês duas. Obrigada por cuidarem muito bem dele.

Anna, apesar de você odiar responder as perguntas que fazem a irmãos gêmeos o tempo inteiro, e tentar arduamente explicar o quanto elas são surreais e sem sentido, você sabe que não é verdade. No fundo, eles estão certos. Sim, eu sinto o que você sente. Sim, temos uma conexão forte e inexplicável. Sim, fazemos as mesmas coisas (mas de forma diferente). Quando você se magoa, eu me magoo também. Quando você se alegra, eu me alegro também. Quando você chora, eu choro. De tristeza pelos seus experimentos do mestrado não terem dado certo ou de tanto rir (normalmente das bobagens que a Isabel e meu pai fazem). Obrigada por ser uma excelente ouvinte, por me fazer engolir o choro muitas vezes e “tocar o barco” e por ser a única que me incentiva a fazer mil coisas ao mesmo tempo. “Você acha que eu dou conta, Anna?”. “Claro! Eu dou também.”. Paulo Leminski estava certo. “O outro que há em mim, é você.”

Isabel, você foi o maior presente que a vida me deu. Você sempre vai ser a minha irmãzinha querida. Sempre vou me preocupar com você e querer que você continue sendo essa mulher responsável e dedicada. Obrigada por me alegrar, estar ao meu lado e me forçar a “distrair a cabeça”. Obrigada por me fazer enxergar que tenho que me dar mais valor e exigir menos de mim mesma.

Gostaria de agradecer aos meus avós por todo o conhecimento, amizade e ombro amigo. Obrigada por me ensinarem que temos que nos esforçar para ver sempre o melhor das pessoas e do mundo. Por me mostrarem que a vida é muito curta para guardar mágoas e sentir raiva. Obrigada por todos os conselhos, por serem sempre calorosos com a minha visita e por fazerem questão de saber e acompanhar de todas as minhas conquistas pessoais e profissionais, apesar de até hoje não saberem direito o que eu faço.

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Dra. Margareth Queiroz, pelas oportunidades e ensinamentos. Por sempre me incentivar a crescer academicamente, a ser organizada, a ser estudiosa, a acreditar em mim mesma e a não depender de ninguém. Por me fazer “respirar fundo” e ter “pensamento positivo” nos momentos em que nada parecia dar certo. Obrigada por respeitar as minhas decisões, por apoiar as minhas ideias e por ter me apresentado o mundo da entomologia forense, com seus defeitos e qualidades. Serei eternamente grata a você por ter me recebido em seu laboratório de braços abertos e por sempre me ajudar da melhor maneira que pode.

Gostaria de agradecer à Dra. Ana Amaral por ter cedido às substâncias para os meus testes e ter realizado toda a análise química do mesmo. Obrigada por estar sempre disposta a sanar minhas dúvidas. Obrigada pelas sugestões, incentivos, ideias e entusiasmo. Sempre irei admirar seu amor e dedicação pelo trabalho. Obrigada por ter abraçado o meu projeto e me ajudado sempre que precisei.

Gostaria de agradecer à Arith e Jefferson, por toda a ajuda e suporte que me deram desde a realização dos testes até a análise dos resultados. Mais do que colegas de bancada, vocês são para mim amigos queridos. Tenho muita sorte de ter conhecido vocês.

Gostaria de agradecer ao meu namorado Alexandre por todo o seu amor, carinho e dedicação. Obrigada por ter me ensinado a usar o equipamento de fotografia para registrar os espécimes e por corrigir, dar sugestões e me ajudar na escrita da tese. Por sempre me animar quando estou triste, sempre me ajudar quando preciso e por sempre zelar pela minha segurança e bem-estar. Você me fez acreditar novamente no amor com o seu coração gigante. Obrigada pela paciência, cumplicidade e companhia. Por ser exatamente o homem que eu mereço: íntegro, honesto, amoroso, gentil, cuidadoso e respeitoso. Você é mais do que um amante. É o meu amigo, o meu crítico mais sincero, o meu professor mais paciente e o melhor colega de trabalho que alguém poderia ter. Obrigada por ser o meu porto seguro.

Gostaria de agradecer a todos os meus colegas de laboratório pela ajuda, amizade, risadas e momentos de alegria. Ter encontrado um ambiente com pessoas tão amigas, dedicadas e perseverantes foi crucial para o meu aprendizado e bem-estar. Pensarei sempre em vocês com carinho e torço muito pela felicidade e sucesso de cada um.

Isabel e Lorrane, obrigada por terem me recebido e tratado tão bem desde o instante em que conheci vocês. Por serem amigas verdadeiras, por se preocuparem comigo e por estarem sempre ao meu lado quando precisei. Por não terem me deixado desistir em muitos momentos e por terem me ajudado a enfrentar todas as dificuldades encontradas ao longo do trabalho com otimismo, confiança e certeza de que tudo acabaria bem. Obrigada principalmente por dividirem comigo o peso emocional que a vida acadêmica nos trás. Vocês são cientistas e mulheres incríveis. Não deixem nunca alguém insinuar o contrário.

Isadora, Thiany, Paloma e Eliane obrigada por serem amigas tão queridas. Pelos conselhos, sugestões e ideias. Por todos os momentos de alegria, descontração e desabafo. Sou muito grata a vocês por toda a ajuda, ensinamentos, abraços e carinho. Obrigada por serem mulheres tão gentis, companheiras e de bom coração. Continuem iluminando as pessoas da mesma maneira que me iluminam.

Rodrigo, Vitor e Márcio, obrigada por serem amigos incríveis. Por sempre terem me tratado com respeito, igualdade e carinho. Obrigada por todo o apoio, ombro amigo e momentos de felicidade. Em vocês encontrei mais do que colegas de trabalho competentes e maravilhosos de se conviver. Encontrei irmãos que nunca tive. Agradeço por sempre tentarem me ajudar, sempre se importarem com o andamento do meu trabalho e sempre estarem dispostos a parar tudo o que estão fazendo e me ouvirem e me animarem. Agradeço acima de tudo pelas risadas, nos bares ou na copa do laboratório. Levarei vocês pra sempre no meu coração e na minha vida.

Gostaria de agradecer a todos os amigos que fiz ao longo da minha vida fora do laboratório. Pelo apoio e incentivo a sempre investir e não desistir da minha vida acadêmica, apesar de verem o quanto ela me deixa exausta. Imagino o quanto deve ser difícil, e chato às vezes, ter uma amiga que demora pra responder as mensagens porque esta sempre ocupada fazendo mil coisas, uma amiga que está quase sempre na FIOCRUZ trabalhando e que no tempo livre estuda, arruma a casa ou resgata bichos na rua. Apesar disso, vocês estão sempre do meu lado me desejando boa sorte e oferecendo abrigo quando tudo ao redor parece que vai desmoronar. Obrigada pela paciência e compreensão por todas as vezes que furei um encontro porque precisava fazer experimento, cuidar das colônias ou escrever a monografia. Mas principalmente, por todo o carinho, companheirismo, elogios e pelas lembranças inesquecíveis.

Amanda, Dayane, Daniela e Laís obrigada por fazerem parte das minhas lembranças mais antigas. Por terem crescido ao meu lado sempre me apoiando, incentivando, aconselhando e me socorrendo quando preciso (mesmo quando digo que não preciso). Não consigo imaginar a minha vida sem vocês. Sem seus toques, afeto e amor. Vocês são mulheres fantásticas.

Erika, Larissa, Karoline, Rodrigo, Pedro e Marcus, amigos tão queridos que o curso de ciências biológicas me deu. Sou eternamente grata a vocês pela amizade, carinho e parceria. Obrigada por todas as risadas, todos os abraços, todas as lindas memórias que construímos juntos. Por entenderem a minha vida corrida, se preocuparem com a minha saúde mental e física e me darem forças pra continuar lutando pelo que eu acredito. Vocês são pessoas maravilhosas.

João, meu irmão e amigo do peito. Quem iria imaginar que no curso de inglês eu iria me identificar tanto com uma pessoa completamente diferente de mim. Hoje não imagino como seria a minha vida sem a sua risada, seu abraço e seu carinho. Obrigada por todo o afeto, companheirismo e amizade. Obrigada por sempre desejar a minha felicidade e sucesso, profissional e pessoal. E por me fazer enxergar que a vida é curta demais para ser tradicionalzinha e quadrada. Grande parte da ousadia que tenho hoje em dia veio de você (a outra parte veio da Anna).

Jéssika, Mariana, Vitória, Isabelle, Eduarda, Eduardo, Rafael e Rodrigo, amigos que o curso de ciências ambientais me deu. Obrigada por todas as risadas, conselhos, incentivos e ombro amigo. Por sempre me receberem com abraços e sorrisos sinceros em todos os nossos encontros. Como nosso curso era noturno, acabaram conhecendo a minha versão depois de um dia de estudo de manhã e trabalho de tarde: exausta, com sono e muitas das vezes sem paciência. Obrigada por amarem e compreenderem essa Raquel e a aceitarem como ela é. Com seus defeitos e qualidades.

Gostaria de agradecer às mulheres incríveis com que tive contato em minhas atividades fora do ambiente de trabalho. Foram vocês que em muitos momentos me distraíram e acalmaram com suas aulas. Hoje, reconheço que não teria conseguido manter a minha mente tranquila e focada no trabalho, se não houvesse nossos momentos de descontração.

Obrigada a Daiane por ter me apresentado o mundo do pole dance, e ter me mostrado que sou capaz de ser quem eu quiser. Obrigada a você e à Giovanna por terem me ajudado a libertar a mulher empoderada, ousada e que não tem medo de ser feliz que estava adormecida dentro de mim. Obrigada principalmente por investirem tanto em mim e me fazerem acreditar em mim mesma e no meu potencial.

Obrigada Aline, minha mestre querida, por ser a minha fonte de paz espiritual. Por ter me mostrado as belezas da yoga e me fazer acreditar nas grandezas divinas novamente. O momento da nossa prática é onde mais dialogo com as minhas emoções e pensamentos. Você é um dos principais motivos por atualmente eu ser uma mulher sem conflitos emocionais, mais paciente e compreensiva.

Obrigada a todos aqueles que fizeram e que fazem parte da minha vida e que em algum momento me dirigiram palavras de carinho, incentivo e amor durante o período da minha especialização. Amo muito cada um de vocês.

Gostaria de agradecer ao Dr. Rubens Pinto de Mello, Dra. Valéria Magalhães Aguiar, Dr. Carlos Manuel Dutok Sánchez e Dr. Alexandre da Silva Xavier por terem gentilmente aceitado participar da minha banca de especialização. Fico honrada de poder compartilhar o meu trabalho com pessoas tão maravilhosas e qualificadas quanto vocês.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer à Fundação Oswaldo Cruz e à coordenação do curso de pós-graduação em Entomologia Médica. Muito obrigada pelo suporte e pela oportunidade.

RESUMO

Apesar de sua importância ecológica, a espécie de díptero muscoide denominada *Chrysomya megacephala* é capaz de produzir míases e veicular patógenos aos homens e animais. Por possuir a capacidade de se adaptar a diferentes ambientes, esta espécie se distribui por todo o território brasileiro, tornando necessário o controle de sua população. Apesar de este controle ser realizado principalmente com o uso de inseticidas sintéticos, os estudos voltados para o uso de produtos naturais como alternativa a estes compostos químicos têm apresentado resultados satisfatórios. As plantas e os insetos coexistem a milhares de anos. Esta longa coevolução selecionou plantas que produzem substâncias inseticidas naturais como mecanismo de defesa contra o ataque destes artrópodes. Além de não causarem danos ao ecossistema, essas substâncias naturais podem apresentar atividades inseticidas, larvicidas, ovicidas e repelentes com grande potencial. Os óleos essenciais extraídos de plantas pertencentes ao gênero *Piper* têm mostrado grande potencial para controlar a população de diversos insetos. Apesar disso, até o presente momento, poucos testes com esse gênero foram realizados contra moscas. Assim, o presente estudo objetivou verificar os possíveis efeitos do óleo essencial extraído de *Piper aduncum* e *Piper* sp. (PI-02) sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *C. megacephala*. A colônia de *C. megacephala* foi estabelecida a partir da coleta de adultos em armadilhas do tipo Shannon, instaladas no campus do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro. O interior da mesma continha peixe em estado de putrefação como atrativo. Carne bovina putrefata foi oferecida às colônias para estimular a oviposição. Após a postura, 980 neolarvas foram separadas para os testes com *P. aduncum* e para os testes com *Piper* sp. (PI-02), totalizando 1960 neolarvas. Cada teste continha sete grupos: controle puro, controle dimetilsulfóxido (DMSO) e cinco grupos com concentrações 25, 50, 100, 200 e 300%. Cada grupo conteve 140 neolarvas (quatro repetições de 35 larvas por grupo). As diferentes concentrações dos óleos essenciais, bem como o DMSO foram aplicadas sobre as neolarvas de forma tópica (1 µL/neolarva), sendo que no grupo controle não houve aplicação. As larvas foram transferidas para recipientes contendo 35g de carne putrefata (1g/larva). Esses recipientes foram alocados dentro de um pote maior contendo vermiculita e identificados de acordo com o grupo ao qual pertenciam. Os recipientes, vedados com tecido escaline, foram mantidos em estante ventilada com temperatura e umidade regulada à 27 ± 1 °C, 60 ± 10 % URA e 12 h de fotofase. Ao abandonarem a dieta, as larvas maduras foram coletadas, pesadas e individualizadas em tubos de ensaio e observadas diariamente para aferir a duração do desenvolvimento larval, pupal e de neolarva a adulto. Além disso, foi calculada a mortalidade para cada uma das concentrações e para os grupos controles. Todas as concentrações tiveram índices de mortalidade maior do que aqueles encontrados nos grupos controles. A maior mortalidade larval, pupal e de neolarva-adulto foi encontrada na concentração de 200 mg de PI-02 e 200 mg de *P. aduncum*, respectivamente. No presente estudo foi observado um peso maior em machos do que em fêmeas, contudo, todas as concentrações testadas contendo as substâncias mostraram ser capazes de reduzir o peso larval de *C. megacephala*. A maioria das concentrações apresentou algum efeito sobre a proporção obtida na razão sexual de *C. megacephala*, e a concentração 200 mg de *Piper* sp. (PI-02) foi aquela que mais diferenciou dos resultados obtidos nos grupos controles. No presente trabalho foi constatada uma maior porcentagem de atrofia em fêmeas do que em machos. A concentração 25 mg de *P. aduncum* foi aquela em que se obteve uma maior porcentagem de mortalidade total (machos e fêmeas).

Palavras-chave: Controle biológico; mosca varejeira; Piperaceae

ABSTRACT

Despite its ecological importance, the muscoid dipterous species *Chrysomya megacephala* is capable of producing myiases and vehicular pathogens to humans and animals. Because it has the capacity to adapt to different environments, this species is distributed throughout the Brazilian territory, making it necessary to control its population. Although this control is carried out mainly with the use of synthetic insecticides, studies aimed at the use of natural products as an alternative to these chemical compounds have presented satisfactory results. Plants and insects coexist for thousands of years. This long coevolution has selected plants that produce natural insecticidal substances as a defense mechanism against the attack of these arthropods. In addition to not causing damage to the ecosystem, these natural substances may exhibit insecticidal, larvicidal, ovicidal and repellent activities with great potential. Essential oils extracted from plants belonging to the genus *Piper* have shown great potential to control the population of several insects. However, until now, just a few tests have been performed against flies. Thus, the present study aimed to verify the possible effects of the essential oil extracted from *Piper aduncum* and *Piper* sp. (PI-02) on the post-embryonic development of *C. megacephala*. The *C. megacephala* colony was established from the collection of adults in Shannon-type traps, installed at the campus of the Oswaldo Cruz Institute (IOC / FIOCRUZ), Rio de Janeiro. The interior of it contained putrefying fish as attractive. Putrefied beef was offered to the colonies to stimulate oviposition. After the laying, 980 neolarvas were separated for the tests with *P. aduncum* and for the tests with *Piper* sp. (PI-02), totaling 1960 neolarvas. Each test contained seven groups: pure control, dimethylsulfoxide control (DMSO) and five groups with concentrations of 25, 50, 100, 200 and 300%. Each group contained 140 neolarvas (four replicates of 35 larvae per group). The different concentrations of the essential oils as well as the DMSO were applied on the neolarvas topically (1 μ L / neolarva), and in the control group there was no application. The larvae were transferred to containers containing 35g of rotten flesh (1g / larvae). These containers were placed inside a larger pot containing vermiculite and identified according to the group to which they belonged. The containers, sealed with escaline tissue, were kept in ventilated shelves with temperature and humidity regulated at 27 ± 1 °C, $60 \pm 10\%$ URA and 12 h of photophase. Upon leaving the diet, mature larvae were collected, weighed and individualized in test tubes and observed daily to assess the larval, pupal and neolarva development to adult development. In addition, mortality was calculated for each of the concentrations and for the control groups. All concentrations had higher mortality rates than those found in the control groups. The highest larval, pupal and neolarva-adult mortality was found in the concentration of 200 mg of PI-02 and 200 mg of *P. aduncum*, respectively. In the present study a greater weight was observed in males than in females, however, all the concentrations tested containing the substances showed to be able to reduce the larval weight of *C. megacephala*. Most of the concentrations had some effect on the proportion obtained in the sexual ratio of *C. megacephala*, and the concentration 200 mg of *Piper* sp. (PI-02) was the one that most differentiated from the results obtained in the control groups. In the present study, a higher percentage of atrophies was observed in females than in males. The 25 mg concentration of *P. aduncum* was the one that gave a higher percentage of total mortality (males and females).

Key words: Biological control; blowfly; Piperaceae

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Armadilha do tipo Shannon posicionada no campus do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, para a coleta de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae)..... 33
- Figura 2 - Placa de identificação do Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF/IOC)..... 33
- Figura 3 - Colônia de *Chrysomya megacephala* recebendo carne bovina em estado de putrefação para estimular a oviposição e solução açucarada..... 34
- Figura 4 - Placa de Petri contendo um papel filtro de 0,5 x 0,5 cm para garantir a permanência das larvas neste local enquanto são submetidas à aplicação tópica dos óleos essenciais de Piper. 34
- Figura 5 - Aplicação tópica das diferentes concentrações dos óleos essenciais de Piper sobre as larvas depositadas em papel filtro. 35
- Figura 6 - Balança de precisão onde se obteve a quantidade em gramas (35 g) exata para cada grupo. 36
- Figura 7 - Transferência das larvas que receberam as diferentes concentrações dos óleos essenciais de Piper para um pote plástico contendo 35 g de carne bovina putrefata. 36
- Figura 8 - Potes de plástico com as larvas que foram submetidas à aplicação dos óleos essenciais de Piper em 35 g de dieta (pote menor) e vermiculita no fundo do pote maior. 37
- Figura 9 - Esquema dos itens presentes no pote plástico maior: Pote plástico menor contendo 35 g de dieta e as larvas que receberam os óleos de *Piper aduncum* e Piper sp. (PI-02) (localizadas anteriormente sobre papel filtro na placa de Petri). 37
- Figura 10 - Recipiente do experimento, contendo os substratos de criação devidamente identificado. 38
- Figura 11 - Estante ventilada com temperatura e umidade regulada a 27 ± 1 °C, 70 ± 10 % URA e 12 h de fotofase onde o experimento foi mantido. 38
- Figura 12 - Tubos de ensaio mostrando as etapas que foram observadas no ciclo de vida de *Chrysomya megacephala*. Contendo respectivamente: larva, pupa e adulto na vermiculita. 39
- Figura 13 - Microscópio estereoscópico presente no Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF) onde os espécimes foram devidamente identificados. 40

Figura 14 - Espécime de <i>Chrysomya megacephala</i> alfinetado para ser observado ao microscópio estereoscópio.....	40
Figura 15 - Espécime de <i>Chrysomya megacephala</i> registrado no microscópio estereoscópio.	40
Figura 16 - Estereomicroscópio acoplado a uma câmera fotográfica digital e ao computador localizado na Coleção Malacológica do Instituto Oswaldo Cruz (CMIOC).	41
Figura 17 - Coleção entomológica didática do Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF/ IOC).....	41
Figura 18 - Espécimes de <i>Chrysomya megacephala</i> sem atrofia do grupo controle puro.	50
Figura 19 - Espécimes de <i>Chrysomya megacephala</i> com apenas as asas atrofiadas do grupo controle puro.....	51
Figura 20 - Espécimes de <i>Chrysomya megacephala</i> totalmente atrofiado do grupo controle puro.....	52
Figura 21 - Espécimes de <i>Chrysomya megacephala</i> sem atrofia da concentração 25 mg de óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	53
Figura 22 - Espécimes de <i>Chrysomya megacephala</i> com apenas as asas atrofiadas da concentração 25 mg de óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	54
Figura 23 - Espécimes de <i>Chrysomya megacephala</i> totalmente atrofiada da concentração 25 mg de óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	55
Figura 24 - Espécimes de <i>Chrysomya megacephala</i> sem atrofia tratadas com a concentração 200 mg de óleo essencial de <i>Piper sp.</i> (PI-02).	62
Figura 25 - Espécimes de <i>Chrysomya megacephala</i> com apenas as asas atrofiadas tratadas com a concentração 200 mg de óleo essencial de <i>Piper sp.</i> (PI-02).....	63
Figura 26 - Espécimes de <i>Chrysomya megacephala</i> totalmente atrofiadas tratadas com a concentração 200 mg de óleo essencial de <i>Piper sp.</i> (PI-02).	64
Figura 27 - Alterações morfológicas registrada por Cabral et al. (2007) em testes feitos com a concentração 25 mg do óleo essencial extraído de <i>Ocotea duckei</i> contra <i>Chrysomya megacephala</i>	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da análise por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR), acoplada a espectrometria de massas (EM) do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	43
Tabela 2 - Resultados da análise por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR), acoplada a espectrometria de massas (EM) do óleo essencial de <i>Piper sp.</i> (PI-02).....	43
Tabela 3 Massa, em miligramas, das larvas de <i>Chrysomya megacephala</i> quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> , comparadas ao grupo controle puro e controle com DMSO.	44
Tabela 4 - Tempo de desenvolvimento, em dias, das etapas do ciclo de vida de <i>Chrysomya megacephala</i> quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	45
Tabela 5 - Mortalidade, em porcentagem, das larvas de <i>Chrysomya megacephala</i> quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> , comparadas ao grupo controle puro e controle com DMSO.	46
Tabela 6 - Razão sexual encontrada nos experimentos com <i>Chrysomya megacephala</i> quando esta foi submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	47
Tabela 7 – Massa larval média dos machos e das fêmeas de <i>Chrysomya megacephala</i> quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> , em comparação com os grupos controle.	48
Tabela 8 - Porcentagem de machos e fêmeas atrofiados quando submetidos à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> , em comparação com os grupos controle.	49
Tabela 9 - Tipos de atrofias de machos e fêmeas quando submetidos à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> , em comparação com os grupos controle.	49
Tabela 10 - Massa, em miligramas, das larvas de <i>Chrysomya megacephala</i> quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Piper sp.</i> , comparadas ao grupo controle puro e controle com DMSO.	56
Tabela 11 - Tempo de desenvolvimento, em dias, das etapas do ciclo de vida de <i>Chrysomya megacephala</i> quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de o <i>Piper sp.</i> (PI-02), comparadas ao grupo controle puro e controle com DMSO.	57
Tabela 12 - Mortalidade, em porcentagem, das larvas de <i>Chrysomya megacephala</i> quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Piper sp.</i> , comparadas ao grupo controle puro e controle com DMSO.	58
Tabela 13 - Razão sexual encontrada nos experimentos com <i>Chrysomya megacephala</i> quando esta foi submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Piper sp.</i> (PI-02).....	59

Tabela 14 – Massa larval média dos machos e das fêmeas de <i>Chrysomya megacephala</i> quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Piper</i> sp. (PI-02), em comparação com os grupos controle.	60
Tabela 15 - Porcentagem de machos e fêmeas de <i>Chrysomya megacephala</i> atrofiados quando submetidos à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Piper</i> sp. (P1-02), em comparação com os grupos controle.	61
Tabela 16 - Tipos de atrofia de machos e fêmeas de <i>Chrysomya megacephala</i> quando submetidos à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Piper</i> sp., em comparação com os grupos controle.	61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Ordem Diptera	19
1.2 Dípteros muscoides.....	21
1.2.1 Família Calliphoridae.....	22
1.2.1.1 Gênero <i>Chrysomya</i>	23
1.3 Controle químico e biológico	25
1.4 Família Piperaceae.....	26
1.4.1 Gênero Piper.....	27
1.4.1.1 <i>Piper aduncum</i> e <i>Piper</i> sp. (PI-02).....	28
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3 METODOLOGIA.....	31
3.1 Obtenção e preparação dos óleos essenciais.....	31
3.1.1 Material vegetal.....	31
3.1.2 Extração dos óleos essenciais.....	31
3.1.3 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR) acoplada à espectrometria de massas (EM).....	31
3.2 Estabelecimento das colônias de <i>Chrysomya megacephala</i>	32
3.3 Aplicação dos óleos essenciais nas neolarvas e análise dos dados obtidos.....	33
4 RESULTADOS	43
4.1 Análise química dos óleos essenciais	43
4.2 Efeito do óleo extraído de <i>Piper aduncum</i> sobre o desenvolvimento pós-embriônico de <i>Chrysomya megacephala</i>	44
4.2.1 Massa larval de <i>Chrysomya megacephala</i> após tratamento tópico com o óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	44
4.2.2 Duração dos estágios do desenvolvimento pós-embriônico de <i>Chrysomya megacephala</i> após tratamento tópico com o óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	44
4.2.3 Mortalidade de <i>Chrysomya megacephala</i> após tratamento tópico com o óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	46
4.2.4 Razão sexual de <i>Chrysomya megacephala</i> após tratamento tópico com o óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	47

4.2.5 Massa larval de machos e fêmeas de <i>Chrysomya megacephala</i> após tratamento tópico com o óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	47
4.2.6 Atofias de <i>Chrysomya megacephala</i> após tratamento tópico com o óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	48
4.3 Efeitos do óleo essencial extraído de <i>Piper</i> sp. (PI-02) sobre o desenvolvimento pós-embrionário de <i>Chrysomya megacephala</i>	56
4.3.1 Massa larval de <i>Chrysomya megacephala</i> após tratamento tópico com o óleo essencial de <i>Piper</i> sp. (PI-02).....	56
4.3.2 Duração das etapas do desenvolvimento pós-embrionário de <i>Chrysomya megacephala</i> após tratamento tópico com o óleo essencial de <i>Piper</i> sp. (PI-02)	56
4.3.3 Mortalidade de <i>Chrysomya megacephala</i> após tratamento tópico com o óleo essencial de <i>Piper</i> sp. (PI-02).....	57
4.3.4 Razão sexual de <i>Chrysomya megacephala</i> após tratamento tópico com o óleo essencial de <i>Piper</i> sp. (PI-02).....	58
4.3.5 Massa larval de machos e fêmeas de <i>Chrysomya megacephala</i> após tratamento tópico com o óleo essencial de <i>Piper</i> sp. (PI-02)	59
4.3.6 Atofias de <i>Chrysomya megacephala</i> após tratamento tópico com o óleo essencial de <i>Piper</i> sp. (PI-02)	60
5 DISCUSSÃO	65
5.1 Metodologia empregada no presente estudo.....	65
5.2 Efeitos sobre o estágio larval	71
5.2.1 Massa larval.....	71
5.2.2 Duração do estágio larval dos grupos controle	77
5.2.3 Duração do estágio larval dos grupos tratados com diferentes concentrações dos óleos	82
5.2.4 Mortalidade do estágio larval	91
5.3 Efeito sobre o estágio pré-pupa.....	104
5.3.1 Duração do estágio de pré-pupa do grupo controle e dos grupos tratados com diferentes concentrações dos óleos	104
5.4 Efeitos sobre o estágio pupal	106
5.4.1 Duração do estágio pupal dos grupos controle.....	106
5.4.2 Duração do estágio pupal dos grupos tratados com diferentes concentrações dos óleos	108
5.4.3 Mortalidade no estágio pupal	112
5.5 Efeitos sobre o período de neolarva-adulto	118

5.5.1 Duração do período de neolarva-adulto dos grupos controle.....	118
5.5.2 Duração do período de neolarva-adulto dos grupos tratados com diferentes concentrações dos óleos	119
5.5.3 Mortalidade do período de neolarva-adulto e outras observações constatadas neste estágio.....	123
5.6 Observações gerais sobre os resultados obtidos até o presente momento	132
6 CONCLUSÕES	134
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
8 ANEXO.....	150

1 INTRODUÇÃO

Tendo surgido no início do Devoniano (Grimaldi e Engel 2005), os insetos correspondem ao maior e mais bem-sucedido grupo de organismos terrestres já existentes (Trautwein et al. 2012). Possuem o corpo dividido em cabeça, tórax e abdome e são conhecidos por apresentar exoesqueleto de quitina, três pares de pernas articuladas, peças bucais do tipo ectógnata, asas, inúmeras cerdas, um par de olhos compostos e um par de antenas (Resh e Cardé 2003; Macedo 2010). A classe Insecta é constituída por aproximadamente 80 milhões de espécies (Gullan e Cranston 2008) e compreende 53% do total de organismos existentes no planeta (Halffter et al. 2001).

A riqueza taxonômica desse grupo é atribuída principalmente às suas associações com as plantas, que datam do Carbonífero, há 300 milhões de anos atrás. Ao longo da história evolutiva, plantas e insetos provocaram uma série de interações e interdependências de caráter coevolutivo (Jansen 1980; Ricklefs 2003). As modificações morfológicas e estruturais que as plantas sofreram, por exemplo, beneficiaram sua adaptação a diversos ambientes. Isso desencadeou um aperfeiçoamento dos hábitos alimentares dos insetos que possuíam interações específicas com essas plantas (Jolivet 1992). A descoberta de fósseis de plantas contendo marcas de diferentes tipos de mandíbula evidencia os variados comportamentos fitofágicos dos insetos, corroborando a teoria de coevolução inseto-planta. Assim, esses invertebrados se tornaram cada vez mais complexos e adaptados a diversas regiões e hábitat (Thomanzini e Thomanzini 2002).

Embora as características de cada família sejam variáveis, alguns fatores comuns estão relacionados com o sucesso evolutivo dessa classe, tais como: tamanho reduzido, plasticidade genética, alta capacidade sensorial e neuromotora, diversidade de interações evolutivas com outros organismos, desenvolvimento de metamorfose completa, adultos alados, conquista do ambiente terrestre, eusocialismo e seleção sexual (Gullan e Cranston 2008; Engel 2015).

Por estarem relacionados à reciclagem de nutrientes, polinização e dispersão de sementes, controle de pragas, produção de materiais utilizados pelo homem, e servirem como fonte alimento, esses organismos apresentam grande importância ecológica e econômica. Somado a isso, algumas espécies podem atuar como excelentes modelos experimentais para a pesquisa (Silva 2009; Finkler 2013).

Apesar dos aspectos positivos que a presença dos insetos traz ao meio ambiente, alguns podem transmitir agentes patogênicos e causar doenças (Aguilar-Santos et al. 2013; Kappagoda e Ionnidis 2014; Fonseca 2016; Rocha 2016; Puccioni-SOHLER et al. 2017), desencadear processos alérgicos (Pitchon 2014), se tornarem pragas em plantações (Silva et al. 2001; Barrigossi, 2002; Barrigossi 2006; Andrade et al. 2016), em áreas urbanas (Zorzenon 2002) e em florestais (Hernández e Jaffe 1995; Penteado et al. 2000; Freitas et al. 2002; Penteado 2009). Assim, o conhecimento sobre a bionomia desses invertebrados é de fundamental importância para a implementação de medidas de controle.

Moscas, mosquitos, borrachudos e mosquito palha são alguns exemplos que ameaçam o bem-estar do homem e dos animais (Camargo 2008). Esses indivíduos fazem parte da ordem Diptera, uma das cinco ordens de insetos com maior riqueza de espécies e que compreende aproximadamente 15% da biodiversidade mundial. O fato de serem encontrados em diferentes locais (Gullan e Cranston 2008) mostra a incrível capacidade de adaptação desse grupo e ressalta a dificuldade em estabelecer medidas de controle eficazes contra o mesmo (Maia et al. 2014; Zara et al. 2016; Von-Zuben e Donalísio 2016).

1.1 Ordem Diptera

Estudos apontam a origem dos dípteros como provenientes do Permiano, há cerca de 250 milhões de anos (Yates e Wiegmann 2005). A ordem Diptera é constituída por aproximadamente 160 famílias (Pape et al. 2011) e inclui os insetos conhecidos popularmente como moscas, mosquitos, mutucas, borrachudos, maruins dentre outros (Lima e Serra 2008; Ahid 2009).

Esses invertebrados correspondem a um dos grupos de insetos mais diversos que existe, ocupando todos os continentes e quase todos os habitats (Courtney e Merritt 2008). Os dípteros apresentam o segundo par de asas modificados em estruturas responsáveis pela manutenção do equilíbrio durante o voo, conhecidas como halteres ou balacins. Dessa forma, o nome da ordem faz menção ao número de suas asas funcionais (*di* = duas, *pteron* = asa) (Borror e De Long 2011).

Classicamente essa ordem é dividida em duas subordens, Brachycera e Nematocera. A subordem Nematocera é constituída pelos mosquitos, pernilongos e outros dípteros que possuem flagelo antenal fino, composto de muitos segmentos e multiarticulado. Estudos filogenéticos sugerem que as relações existentes entre as seis infraordens presentes em

Nematocera sejam incertos (Yates e Wiegmann et al. 1999; Wiegmann et al. 2003). Brachycera constitui um grupamento monofilético. Esse monofiletismo é sustentado por algumas características da larva e da forma adulta. A forma imatura desses insetos possui cabeça alongada, inclusa no protórax e mandíbula dividida. O adulto possui até oito artícu­los no flagelo antenal, podendo conter uma arista, dois nos palpos e apresenta a genitália dividida em epândrio e hipândrio (Yates e Wiegmann et al. 1999; Gullan e Cranston 2008).

A subordem Brachycera é composta pelas infraordens Tabanomorpha, Stratiomyomorpha, Xylophagomorpha e Muscomorpha (Yeates et al. 2007). Tabanomorpha abriga aqueles insetos conhecidos popularmente por mutucas, estes apresentam grandes olhos compostos e peças bucais robustas com um clípio convexo (Santos 2008). Os indivíduos que correspondem à infraordem Stratiomyomorpha apresentam de cinco a seis segmentos antenais, asas membranosas e possuem hábito saprófago em sua fase imatura (Rozkosny 1991). Xylophagomorpha é um pequeno grupo composto por espécimes que apresentam o terceiro segmento antenal alongado e larvas predadoras (Baladan e Baladan 2004). A infraordem Muscomorpha é sustentada pela presença do espiráculos posterior, das formas imaturas, no último segmento abdominal (Da-Silva-Xavier 2016). Essa infraordem abriga os chamados dípteros muscoides, insetos que estão entre os grupos de maior importância econômica e médica-veterinária.

O ciclo de vida desses organismos varia em torno de 30 dias até muitos anos. Seus ovos possuem diferentes formatos e podem ser postos na água, em locais próximos a ela, sobre matéria orgânica em decomposição ou em diversos outros substratos (Ahid 2009). As larvas não possuem pernas verdadeiras, apresentando normalmente aspecto vermiforme. Suas cápsulas cefálicas podem ser do tipo completa, parcialmente não-desenvolvida ou ausente. Essas formas imaturas podem ser de vida livre, ter hábito parasitoide ou parasita (Gullan e Cranston 2008; Rafael et al. 2012), e estar presentes em diversos habitat como pedras, plantas, sobre o sedimento, e até mesmo em lagos, rios e zonas marinhas (Courtney e Merritt 2008; Pinho 2008).

Suas pupas podem ser do tipo adéctica, oblecta ou exarata. As pupas exaratas são aquelas cujos apêndices não se encontram aderidos ao corpo, enquanto que, as pupas oblectas são aquelas que apresentam cutícula esclerotizada e apêndices unidos ao corpo. Aqueles dípteros que se transformam em pupas do tipo exaratas, apresentam mandíbulas não-articuladas, ou adécticas (Rafael et al. 2012).

Os adultos possuem peças bucais principalmente do tipo picador-sugador ou lambedor (Gullan e Cranston 2008), seu tamanho varia de 0,5 mm até 60 mm e apresentam prototórax e metatórax muito reduzidos. A maioria se alimenta de néctar e pólen, mas em algumas espécies as fêmeas podem ser hematófagas ou predadoras (Rafael et al. 2012).

1.2 Dípteros muscoides

A infraordem Muscomorpha é composta pelas seções Aschiza e Schinozophora. A seção Aschiza possui duas superfamílias, sendo caracterizada pela ausência da sutura ptilinial. A seção Schinozophora apresenta 13 superfamílias, sendo caracterizada pela presença da sutura ptilinial. Esta seção se divide em duas subseções: Acalyptratae e Calyptratae. A denominação destes dois grandes grupos se baseia no tamanho da caliptra inferior, contudo por ser um caráter variável não é o indicado para caracterizá-los completamente. Acalyptratae não possui uma monofilia bem suportada, assim há dificuldade em delimitar suas famílias. Calyptratae corresponde a um grupo bem suportado filogeneticamente, apresentando características específicas como um sulco na base do pedicelo, sutura transversal completa no mesonoto, dentre outras (Rafael et al. 2012).

A subseção Calyptratae é composta pelas superfamílias Hippoboscoidea, Muscoidea e Oestroidea. A superfamília Hippoboscoidea é caracterizada, dentre outras coisas, pelo seu desenvolvimento por viviparidade adenotrófica, enquanto que a Muscoidea se caracteriza por possuir a abertura anal do macho localizada acima dos cercos e a Oestroidea por uma série vertical de cerdas no mero (McAlpine e Wood 1989; Amorim e Yeates 2006; Yeates et al. 2007).

A superfamília Oestroidea é composta pelas famílias Sarcophagidae, Calliphoridae, Oestridae, Mesembrinellidae, Mystacinobiidae, Rhiniidae, Rhinophoridae, Tachinidae e mais recentemente Ulurumyiidae (Cerretti et al. 2017; Michelsen e Pape 2017). Esta superfamília apresenta grande importância ecológica por seus indivíduos possuírem a capacidade de degradar a matéria orgânica animal e vegetal (Linhares 1979), atuarem como indicadores de impacto ambiental (Martins 2001; Wink et al. 2005), polinizadores (Nascimento et al. 2012), e servirem como fonte de alimento (Halloran e Vantomme 2015). Além disso, os conhecimentos sobre a biologia desses insetos podem ser aplicados em diversos campos de estudo, como o da entomologia forense e terapia larval (Rafael et al. 2012; Ansueto 2015). Dentro da superfamília Oestroidea, a família Calliphoridae corresponde a uma das famílias

mais importantes para o ramo da entomologia médica por possuir espécies com grande importância sanitária (Rafael et al. 2012).

Apesar dos benefícios para o meio ambiente e à sociedade, estes organismos podem causar danos severos à saúde. Além de serem capazes de abrigar e veicular diversos agentes causadores de doença (bactérias, vírus, fungos, protozoários, larvas e ovos de helmintos), os dípteros muscoides ainda são responsáveis pela produção de miíases no homem e nos animais (Greenberg 1971 e 1973; Paiva 1994).

Tanto as moscas como os potenciais patógenos que elas possam vir a carrear encontram condições favoráveis de proliferação em locais de clima quente, com condições de higiene precárias. Assim, os fatores climáticos e socioambientais da região Neotropical aceleram seu ciclo de vida e permitem a intensificação de sua dispersão populacional, favorecendo a transmissão de agentes etiológicos de doenças (Mello et al. 1997; Rey 2001). Dessa forma, a Organização Mundial de Saúde busca alternativas para controlar a proliferação desses insetos e impedir a disseminação dos patógenos carreados por eles. O controle destes dípteros é feito quase que exclusivamente com a utilização de inseticidas sintéticos (organofosforados e piretroides) que podem acarretar sérios danos ambientais, tanto por serem tóxicos aos seres vivos, quanto por aumentarem a frequência de insetos resistentes na população (Faria 2003; Eyer et al. 2004). Desta forma, surge a necessidade de investimento em pesquisas que objetivem uma metodologia segura ao homem sem prejuízos para o ecossistema.

1.2.1 Família Calliphoridae

Os califorídeos apresentam uma fauna mundial composta de 1.525 espécies e 97 gêneros, divididos em oito subfamílias (Pape et al. 2011). Esses insetos possuem o mesotórax alargado, protórax e metatórax reduzidos e um par de asas membranosas curtas, porém fortes. Os constituintes dessa família possuem um porte que varia de médio a grande (em média 1,5 cm de comprimento), uma grande variação de cores metálicas com tons azulados, violáceos ou esverdeados, apesar de algumas espécies possuírem cores opacas, caliptra bem desenvolvida, uma fileira de cerdas na margem posterior do meron, duas cerdas (raramente três) na notopleura e arista geralmente plumosa além da metade basal (Furusawa e Cassino 2006; Amat et al. 2008).

As varejeiras, como são popularmente conhecidos os insetos dessa família, são responsáveis pela veiculação de uma série de enteropatógenos, principalmente porque muitas de suas espécies possuem hábito endófilo, o que aumenta o contato desses dípteros com alimentos de consumo humano (Mariluis 1999).

Além disso, esses dípteros são causadores de miíases primárias e secundárias e também podem atuar como vetores forético dos ovos da espécie *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Oestridae). Esta espécie é também causadora de miíase furuncular cuja larva é conhecida popularmente por “berne”. A dermatobiose, como também é conhecida, é uma patologia que afeta diversos hospedeiros como o homem, bovinos, suínos, ovelhas e outros, sendo responsáveis por danos econômicos à agropecuária (James 1947; Zumpt 1965).

O padrão de ocorrência geográfico das espécies que compõem a família Calliphoridae está bem definido, mas ainda não se sabe claramente quais fatores ambientais determinam a estrutura dessas espécies (Azevedo et al. 2013).

Dentro desta família, o gênero *Chrysomya* é um dos que mais se destacam por abrigar espécies de grande importância epidemiológica e econômica, tanto do ponto de vista benéfico, quando participa da cadeia alimentar como insetos detritívoros e do processo de polinização de algumas plantas, quanto prejudiciais, atuando como veiculadores de patógenos ao homem e animais (Furlanetto et al. 1984; Catts e Goff 1992; Carvalho et al. 2000; Li e Zhang 2007). As espécies deste gênero são robustas, apresentam espiráculos torácicos anteriores podendo ter a coloração branca, marrom escura ou amarela e corpo esverdeado, azul escuro ou violeta (Irish 2014).

1.2.1.1 Gênero *Chrysomya*

O gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy, 1830 é constituído por 12 espécies e possui origem nas regiões geográficas que compreendiam o chamado Velho Mundo. Conhecidas vulgarmente como moscas varejeiras, sua invasão acidental no Brasil, principalmente na região sudeste, foi causada pelo grande fluxo de comércio entre a América do Sul e Europa e pela chegada de navios com refugiados provenientes de Angola (Guimarães et al. 1978).

A proliferação e desenvolvimento bem-sucedido de diferentes espécies do gênero *Chrysomya*, em nosso território, foi aparentemente causada pelo deslocamento de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775), uma espécie nativa das Américas, por ocupar seu

nicho. Essa capacidade de adaptação permite que as espécies pertencentes a este gênero causem grande desequilíbrio ambiental (Guimarães et al. 1978 ;1979; Mariconi et al. 1999; São-Paulo 2013).

Imbiriba et al. (1977) foram responsáveis pelos primeiros registros de *Chrysomya* no país ao identificar *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) no Paraná. Posteriormente, Guimarães et al. (1978) relataram a ocorrência de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), e *C. putoria* em São Paulo.

Por apresentarem alto grau de sinantropia, dispersão e adaptação, o estudo ecológico da espécie *C. megacephala* mostra-se importante para o controle da disseminação de doenças e agentes patogênicos e apresenta um papel fundamental para estudos visando à vigilância epidemiológica dessas epizootias (Batista-da-Silva et al. 2010; Baltazar et al. 2011).

Espécie *Chrysomya megacephala*

A espécie *C. megacephala* teve sua origem na Austrália e região Oriental, sendo amplamente distribuída na África do Sul, nas regiões Orientais e Paleárticas (Zumt 1965). Essa espécie foi introduzida de forma acidental no continente americano provavelmente pela chegada de navios, que conseqüentemente traziam grande quantidade de lixo em seu interior (Guimarães et al. 1978).

Essa varejeira apresenta grande importância ecológica e forense, por ser capaz de degradar a matéria orgânica animal e vegetal (Greenberg 1992). Possui também um papel de destaque na entomologia médica-veterinária e sanitária por produzir miíases no homem e nos animais. Santos (2005) ressalta que por se tratar de um vetor de enteropatógenos, a presença e abundância dessas moscas influenciaria também o aumento de casos de diarreia infantil, e conseqüentemente, mortalidade infantil. Esse cenário se agrava principalmente em locais com deficiência sanitária.

Por ser considerada cosmopolita e criar-se facilmente no meio urbano, essa espécie é difícil de ser controlada quimicamente, o que atribui a ela um risco ao ambiente como um todo (Carvalho et al. 2004). Atualmente o controle destes dípteros é feito quase que exclusivamente com a utilização de inseticidas sintéticos (organofosforados e piretroides) que podem acarretar sérios danos ambientais, tanto por serem tóxicos aos seres vivos, quanto por aumentarem a frequência de insetos resistentes na população (Faria 2003; Eyer et al. 2004). Desta forma, surge a necessidade de investimento em pesquisas que objetivem uma metodologia segura ao homem sem prejuízos para o ecossistema.

1.3 Controle químico e biológico

O crescimento populacional somado à presença de pragas na agricultura tornou-se um fator limitante na produção de alimentos. Além disso, algumas espécies exóticas de insetos conseguem sobreviver no ambiente em que se encontram devido a um clima mais favorável, ausência ou pequeno número de predadores naturais e boas condições para reprodução. A degradação ambiental e a caça indiscriminada de animais predadores de insetos intensificam o desequilíbrio ecossistêmico, aumentando, dentre outras coisas, o índice de doenças vetoradas e causadas por insetos.

Dessa forma, para satisfazer principalmente a demanda de alimentos, diversas empresas utilizam fertilizantes e diversos produtos químicos para o crescimento das plantações e redução dos danos gerados pelas pragas, respectivamente (Menezes 2005; Medina 2001). Os inseticidas químicos são as principais substâncias usadas com o intuito de afastar e matar insetos. Até a década de 40 eram utilizados produtos naturais (de origem orgânica e inorgânica) com atividades inseticidas, porém, estes foram quase que completamente substituídos com a chegada de produtos sintéticos a partir de pesquisas de biocidas realizadas durante II Guerra Mundial.

Por mais que compostos químicos como o hexacloroexano, diclorodifeniltricloreto (DDT), aldrin, dieldrin e clordano tenham contribuído para uma maior oferta de alimentos, seu uso indiscriminado durante os anos causou grave impacto ao meio ambiente. Além de perderem a atividade ao longo do tempo, o uso exacerbado de inseticidas provoca danos severos ao meio ambiente, tais como: o intenso acúmulo de resíduos tóxicos nos alimentos, nos animais (por meio da bioacumulação), contaminação da água e do solo, aparecimento de pragas resistentes e danos aos produtores rurais pelo contato direto com essas substâncias e ainda a destruição da camada de ozônio (Kim et al. 2003; Costa et al. 2004).

Diferentes iniciativas de proteção ambiental, como o lançamento do livro “Silent Spring” de Rachel Carson em 1962, motivaram comunidades acadêmicas a estudarem e compreenderem melhor a relação inseto-planta, respeitando o equilíbrio ecossistêmico.

A dificuldade encontrada para a utilização de inseticidas naturais deve-se ao fato de que alguns deles podem apresentar inconstância em sua eficiência por conta de seu baixo efeito residual, demandando constantes aplicações (Costa et al. 2004). Essa característica dificulta sua comercialização, devido ao baixo interesse que geram nos produtores agrícolas e investidores de uma forma geral, por se tornar de um produto mais oneroso.

O uso de extratos de plantas pelo homem tem ocorrido desde a Idade Antiga, persistindo até os dias atuais. Ultimamente, há um aumento significativo em pesquisas voltadas para a utilização de produtos botânicos para o controle biológico, para a geração de alimentos saudáveis, livres de agrotóxicos e diminuição da incidência de insetos resistentes (Kim et al. 2003).

Algumas plantas possuem mecanismos naturais contra insetos, os chamados metabólitos secundários, que podem gerar uma ação repelente, inseticida, inibidora da alimentação ou bloqueadora do desenvolvimento pós-embrionário (Stoka 1987). O Brasil possui uma flora com grande abundância e diversidade, o que fornece subsídio para as pesquisas de controle biológico que utilizam compostos naturais extraídos de plantas (Pletsch e Santana 1995).

De acordo com Miranda (2002), as espécies pertencentes à família Piperaceae apresentam grande potencial inseticida, podendo ser úteis no combate a insetos pragas-agrícolas, bem como, no controle de insetos vetores e causadores de doenças.

1.4 Família Piperaceae

É uma família de plantas Magnoliídeas que possui as pimentas como produto comercial mais utilizado. Englobando dez gêneros e aproximadamente 2000 espécies, essa família encontra ampla distribuição na região Neotropical e apresenta grande diversidade de espécies principalmente nas Américas Central e do Sul (Yuncker 1958, Medeiros e Guimarães 2007, Bardelli et al. 2008).

São consideradas fósseis vegetais vivos por pertencerem as angiospermas basais. No Brasil ocorrem cerca de 450 espécies distribuídas entre os gêneros *Ottonia* Spreng., *Peperomia* Ruiz e Pav., *Piper* L., *Pothomorphe* Miq. e *Sarcorrhachis* Trel (Tebbs 1989, Bardelli et al. 2008).

As espécies pertencentes a estes gêneros apresentam diferentes aplicações na medicina, na culinária e na ciência (Guimarães et al. 1978). Uma importante qualidade dessas plantas é a presença de óleos essenciais que são característicos de cada espécie (Nigam e Purohit 1962), tornando diversos os constituintes químicos que podem ser utilizados dessa família, sendo os mais comuns os alcaloides, terpenos, flavonoides, piperidina, entre outros (Delgado et al. 2007).

O gênero *Piper* apresenta papel de destaque dentro da família Piperaceae por apresentar importantes metabólitos secundários, como as lignanas e amidas, utilizados pela planta em sua defesa contra insetos predadores. O controle biológico utilizando os componentes químicos presentes nessas angiospermas vem se tornando cada vez mais estudado, por se tratar de uma aplicação ainda inexplorada dessas substâncias.

1.4.1 Gênero *Piper*

Com mais de 700 espécies distribuídas entre os hemisférios (Lawrence 1951), esse gênero conta com diversos metabólitos como alcaloides, hidrochalconas (Parmar et al. 1997), propenilfenóis (Benevides et al. 1999), ácidos benzoicos prenilados (Lago et al. 2004), terpenos (Andrade et al. 1998), flavonoides etc. Essas características permitem que as espécies deste gênero possuam diferentes aplicações como seu uso para fins terapêuticos e alimentícios.

A espécie *Piper umbellata* (conhecida popularmente no Brasil como pariparoba), por exemplo, apresenta efeitos positivos no combate a doenças do fígado. Folhas, sementes e raízes da pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) também podem ser usadas como medicamento para tratar doenças como alergias, bronquites, doenças venéreas e reumatismo, além de sua importância como condimento (Amorim 1988; Blitz e Simpson 1995).

Além destas aplicações, pesquisas voltadas para o uso de plantas deste gênero contra insetos vêm sendo amplamente realizadas (Miranda 2002). Em 1961, Irvine constatou atividades inseticidas nas sementes de *P. nigrum*, enquanto que Matsui e Munskata (1975) observaram a capacidade das folhas de *Piper tutokatsura* de reduzir a alimentação da espécie *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera). As folhas de *Piper hispidum* também mostraram uma ação significativa contra o coleóptero *Hypothenemus hampei* Ferrari, 1867 em estudos realizados por Santos et al. 2010.

Ivbijaro e Bolaji (1990) estudaram os efeitos inseticidas das espécies africanas, *Piper rotundistipulum* e *Piper guineense*, sobre as pragas que acometem a espécie vegetal *Vigna unguiculata*. Miyakado et al. (1989) também observaram esses efeitos em extratos de *Piper longum*, *Piper beetle*, *Piper peepuloides* e *Piper cubeba* contra Coleoptera e Diptera.

Diversas espécies de Diptera mostraram serem susceptíveis aos compostos provenientes de espécies do gênero *Piper*. Dessa maneira, há a possibilidade de usar extratos

provenientes destas plantas para combater insetos de importância médica-veterinária, além daqueles tidos como praga.

Em 1993, Olsen et al. constataram atividades inseticidas em extratos provenientes de *Piper falconeri* contra *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Muscidae) e *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Culicidae). Em 2009, Gomes et al. relataram os efeitos tóxicos que os extratos de *Piper maeginatum* e *Piper purusanum* desencadeavam em dípteros pertencentes a família Tephritidae. Outras espécies como *A. aegypti* e *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald 1901 (Culicidae) também se mostraram susceptíveis as atividades inseticidas de *Piper tuberculatum* (Bazán-Calderón et al. 2011).

Apesar dos efeitos inseticidas dos extratos provenientes das espécies do gênero *Piper* serem mundialmente conhecidos (Oliveira 2010), poucos são os estudos voltados para o uso destas plantas contra dípteros muscoides. Os trabalhos existentes na literatura, até o presente momento, utilizaram somente óleos essenciais extraídos de *P. falconeri* contra *M. domestica* (Parmar et al. 1997), como já mencionado, *P. nigrum* contra *M. domestica* e *Lucilia cuprina* (Wiedeman, 1830) (Calliphoridae) (Júnior et al. 2007), *P. nigrum* contra *M. domestica* (Lopes et al. 2010), *P. aduncum*, *P. hispidum*, *P. sanctum*, *P. diandrum*, *P. amalago*, *P. udum*, *P. psilorhachis*, *P. auritum*, *P. umbelatum* contra *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) (Carmona-Hernández et al. 2014) e *P. tuberculatum* contra *Haematobia irritans* Linnaeus, 1758 (Muscidae) (Braga et al. 2017).

A espécie *P. aduncum* se distribui por várias regiões brasileiras e são conhecidas principalmente por suas propriedades medicinais (Revilla 2000; Navickiene et al. 2000; Guimarães e Valente 2001) e inseticidas (Asprey e Thornton 1954; Alécio et al. 1998). Por possuírem atividades letais contra insetos, os estudos voltados para seus usos como alternativa ao controle químico são primordiais para a manutenção do equilíbrio ecossistêmico.

1.4.1.1 *Piper aduncum* e *Piper* sp. (PI-02)

A espécie *Piper aduncum* L. é conhecida por diversos nomes no Brasil como jaborandi-do-mato, pimenta-de-fruto-ganchoso, pimenta-de-macaco, dentre outros (Pio-Corrêa 1926; Botsaris 1997; Maia et al. 1998), sendo comumente encontrada na Amazônia. Presente em diferentes países tropicais e subtropicais, este arbusto possui ricas propriedades medicinais, sendo utilizado como diurético, antimalárico, sedativo, laxante, para curar dores estomacais etc. (Ciccio e Ballestro 1997; Revilla 2000).

Apesar de suas propriedades inseticidas serem conhecidas, só existe um trabalho na literatura que utiliza esta espécie contra dípteros muscoides (Carmona-Hernández et al. 2014), o que ressalta a necessidade de mais estudos nesta área.

A segunda espécie de Piperaceae utilizada no presente estudo ainda não foi identificada pelo botânico responsável, por conta disso, a mesma será referida por *Piper* sp., bem como pelo código PI-02.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos após a aplicação tópica dos óleos essenciais obtidos a partir das espécies *Piper aduncum* e *Piper* sp. (PI-02) (Piperaceae) sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Calliphoridae), em condições de laboratório.

2.2 Objetivos específicos

1. Descrever os possíveis efeitos das diferentes concentrações destes óleos essenciais no processo de alimentação dos imaturos de *Chrysomya megacephala* utilizando como parâmetro os valores de massa corporal das larvas no instar L3 no momento do abandono da dieta.
2. Determinar os possíveis efeitos das diferentes concentrações dos óleos essenciais sobre a duração do período pós-embrionário: larval, pupal e de neolarva a adulto de *Chrysomya megacephala*.
3. Determinar os possíveis efeitos das diferentes concentrações dos óleos essenciais sobre a mortalidade larval, pupal e de neolarva a adulto de *Chrysomya megacephala*.
4. Descrever os possíveis efeitos das diferentes concentrações testadas sobre a estabilidade da colônia de *Chrysomya megacephala* utilizando como parâmetro o cálculo da razão sexual dos adultos.
5. Descrever possíveis alterações morfológicas provocadas à espécie *Chrysomya megacephala* como resultado da aplicação tópica dos óleos essenciais através do estereomicroscópio.

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção e preparação dos óleos essenciais

3.1.1 Material vegetal

Os materiais botânicos, relacionados às duas espécies distintas de *Piper*, foram coletados no Campus da Universidade Federal do Amazonas – UFAM em setembro de 2015. As plantas frescas foram fragmentadas antes da hidrodestilação para extração dos óleos essenciais. As exsiccatas de cada planta foram preparadas e depositadas no Herbário da UFAM - HUAM, Manaus, AM. Uma das exsiccatas foi identificada como *Piper aduncum*, número HUAM 7295. A segunda está aguardando a identificação botânica.

3.1.2 Extração dos óleos essenciais

As folhas frescas fragmentadas de *P. aduncum* e *Piper* sp. (PI-02) foram submetidas à hidrodestilação, utilizando aparelhagem do tipo “Clevenger” com algumas modificações conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira (2010). Neste método, os materiais frescos fragmentados foram adicionados à água destilada em balão de fundo redondo com volume suficiente para que esta encobrisse totalmente o material vegetal. Esta mistura foi, então, aquecida durante três horas. Os óleos essenciais obtidos foram separados da água por centrifugação, com rotação 15000 rpm/min, durante cinco minutos. A extração destes óleos foi realizada pela Dra. Ana Amaral e sua equipe.

3.1.3 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR) acoplada à espectrometria de massas (EM)

As análises qualitativas dos óleos essenciais destas espécies foram realizadas por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR), acoplada a espectrometria de massas (EM). Para isso, foi utilizado um cromatógrafo gasoso modelo HP7590 A (Agilent Technologies, USA) equipado com coluna capilar DB-5MS, de dimensões 30 m x 0,32 mm e 0,25 µm de espessura de filme. As condições de análise em Cromatografia Gasosa consistiram em uma temperatura inicial de 40 C e final de 290 C, à 4 C por minuto com isoterma de 5 minutos. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL utilizando-se Hélio como

gás de arraste, com fluxo de 0,5 mL por minuto. As análises por espectrometria de massas foram realizadas utilizando espectrômetro de massas modelo HP5972 A, com analisador de íons quadrupolo e ionização por impacto de elétrons a 70 eV.

A identificação de cada constituinte foi realizada com base comparativa de tempos e índices de retenção (Kovats). Estes dados foram calculados a partir das análises de dois padrões de séries homólogas de hidrocarbonetos: C8-C20 (Fluka Analytical) e C10-C40 (Sigma-Aldrich), obtidos nas mesmas condições dos óleos essenciais. Os fragmentos no espectro de massas e o índice de retenção de cada sinal foram comparados com o espectro de massa existente nos bancos de dados do equipamento e com os índices de retenção descritos na literatura (Adams 2001).

3.2 Estabelecimento das colônias de *Chrysomya megacephala*

As colônias foram estabelecidas a partir da coleta dos adultos no campus do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro (22°51'06"S 43°14'27"W). As moscas foram coletadas ativamente por tubos Falcon no interior de armadilhas do tipo Shannon (Da-Silva-Xavier et al. 2015), contendo carcaças de ratos albinos (*Mus musculus* L.) em estágio inicial de putrefação (**Figura 1**).

Os insetos coletados foram transportados ao Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF/IOC), onde foram identificados através de chave específica para o grupo e criados por metodologia estabelecida por Queiroz e Milwald-De-Azevedo (1991), alterando apenas a dieta oferecida aos mesmos (**Figura 2**). As colônias tiveram suas posturas induzidas por meio da oferta de carne bovina moída em estado de putrefação (**Figura 3**).

As carnes foram compradas previamente e mantidas em freezers até o momento em que foram utilizadas para a realização do experimento. Estas foram retiradas do freezer, deixadas descongelando por dois dias em temperatura ambiente e por fim, mantidas durante cinco dias na geladeira.



Figura 1 - Armadilha do tipo Shannon posicionada no campus do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, para a coleta de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae).



Figura 2 - Placa de identificação do Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF/IOC).

3.3 Aplicação dos óleos essenciais nas neolarvas e análise dos dados obtidos

Uma dieta à base de carne bovina moída em estágio inicial de putrefação foi oferecida às colônias para estimular a oviposição (**Figura 3**). Desta maneira, o experimento foi realizado com a geração F2 de *C. megacephala*.



Figura 3 - Colônia de *Chrysomya megacephala* recebendo carne bovina em estado de putrefação para estimular a oviposição e solução açucarada.

Após a obtenção das posturas, 280 neolarvas foram separadas e divididas em dois grupos: controle puro e controle com DMSO (Dimetilsulfóxido). Posteriormente, 1960 neolarvas foram separadas e divididas em sete grupos com as concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mg dos óleos essenciais, de maneira que ficassem 980 neolarvas para os testes com *P. aduncum* e 980 neolarvas para os testes com *Piper* sp. (PI-02). Cada grupo conteve quatro repetições com 35 larvas cada, totalizando 140 larvas por grupo. Assim, estas foram retiradas das posturas por meio de pincéis e transferidas para uma placa de Petri contendo um pedaço de papel filtro (0,5 x 0,5 cm) para garantir a permanência das mesmas neste local (**Figura 4**).

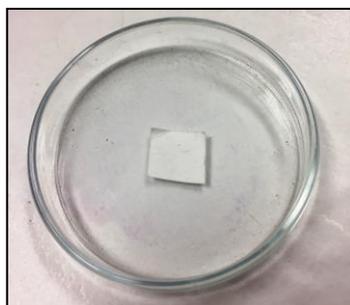


Figura 4 - Placa de Petri contendo um papel filtro de 0,5 x 0,5 cm para garantir a permanência das larvas neste local enquanto são submetidas à aplicação tópica dos óleos essenciais de *Piper*.

As diferentes concentrações dos óleos, bem como o diluente DMSO foram aplicadas diretamente sobre as neolarvas de forma tópica (0,5 µL/neolarva) (**Figura 5**). Não se fez necessário usar touca ou máscara para a realização deste processo, pois o material manipulado não se tratava de medicamentos ou substâncias tóxicas e alergogênicas.

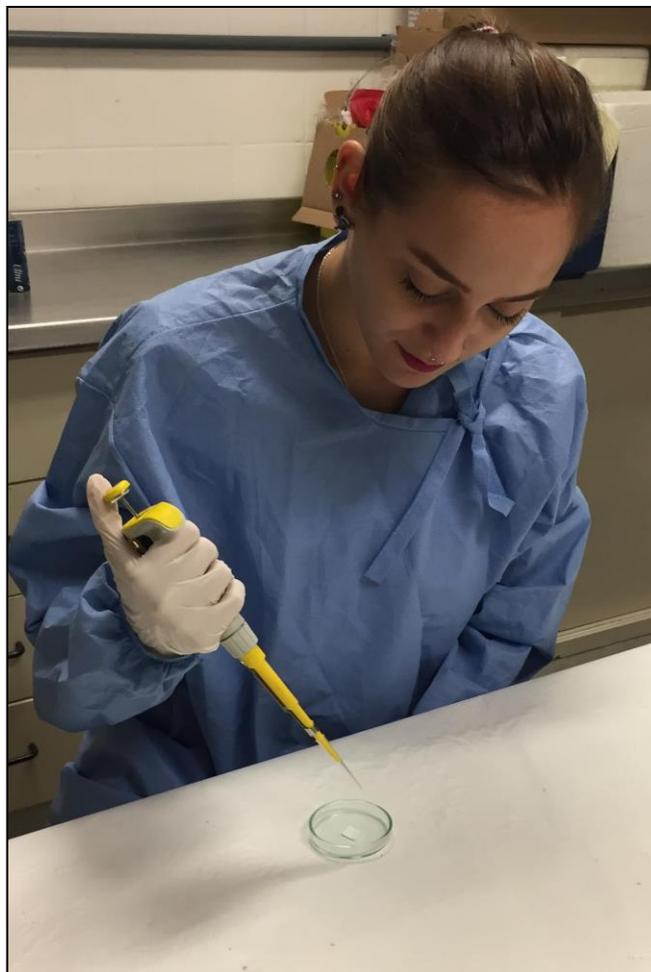


Figura 5 - Aplicação tópica das diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Piper* sobre as larvas de *Chrysomya megacephala*, depositadas em papel filtro.

Após a aplicação tópica, as larvas foram transferidas para os recipientes contendo 35 g de dieta à base de carne bovina putrefata em cada um deles, obtendo-se então a proporção de 1 g/1 larva, de acordo com estudo preconizado por Queiroz e Milwald-de-Azevedo (1991) (**Figura 6 e Figura 7**). Estes recipientes foram alocados dentro de um pote plástico maior contendo vermiculita (utilizado como substrato de pupação das larvas) e identificados de acordo com o grupo ao qual elas pertencem (**Figura 8, Figura 9 e Figura 10**).



Figura 6 - Balança de precisão onde se obteve a quantidade em gramas (35 g) exata para cada grupo.



Figura 7 - Transferência das larvas de *Chrysomya megacephala* que receberam as diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Piper* para um pote plástico contendo 35 g de carne bovina putrefata.

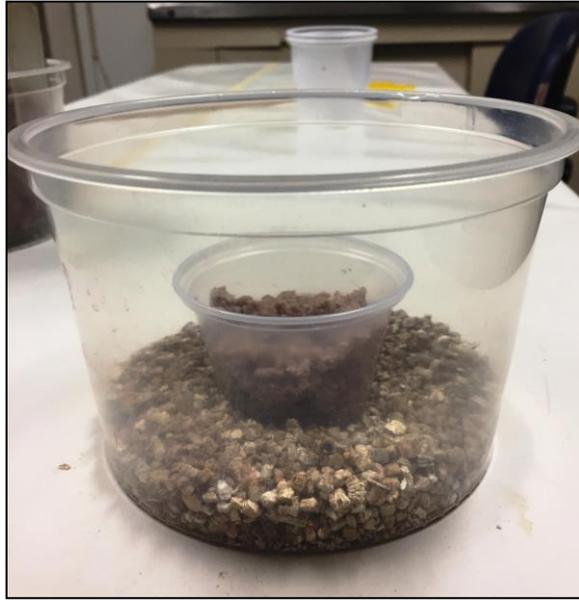


Figura 8 - Potes de plástico com as larvas de *Chrysomya megacephala* que foram submetidas à aplicação dos óleos essenciais de *Piper* em 35 g de dieta (pote menor) e vermiculita no fundo do pote maior.



Figura 9 - Esquema dos itens presentes no pote plástico maior: Pote plástico menor contendo 35 g de dieta e as larvas de *Chrysomya megacephala* que receberam os óleos de *Piper aduncum* e *Piper* sp. (PI-02) (localizadas anteriormente sobre papel filtro na placa de Petri).

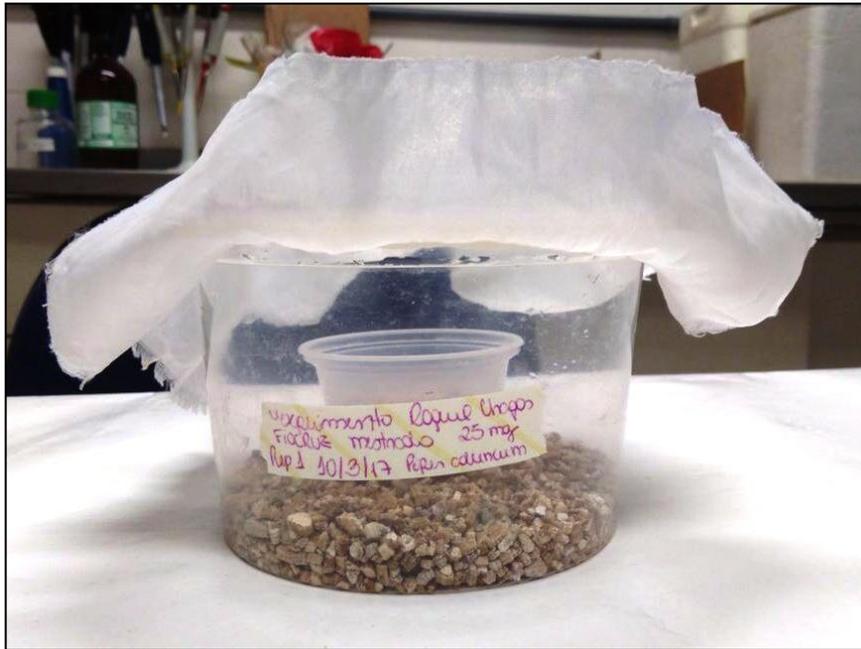


Figura 10 - Recipiente plástico com os testes de controle biológico com *Chrysomya megacephala* em seu interior, devidamente identificado.

Os recipientes foram tampados com um tecido de náilon tipo escaline, presos por elásticos e mantidos em estante ventilada com temperatura e umidade regulada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ URA e 12 h de fotofase (**Figura 10 e Figura 11**).



Figura 11 - Estante ventilada com temperatura e umidade regulada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ URA e 12 h de fotofase onde o experimento foi mantido.

Ao abandonarem a dieta, as larvas maduras foram coletadas, pesadas e individualizadas em tubos de ensaio contendo vermiculita e foram, também, tampados com tecido escaline preso por elástico (**Figura 12**). As larvas permaneceram acondicionadas nos tubos de ensaio e foram observadas diariamente com o intuito de aferir a duração de cada fase do desenvolvimento larval, pré-pupal, pupal e de neolarva até emergência do adulto, obtendo-se, assim suas viabilidades. As anotações foram realizadas na tabela de registros de dados primários preconizada por Queiroz (1991) e atualizada e modificada por Dutok (2015) (Anexo).

A viabilidade larval foi calculada através da seguinte fórmula:

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

A viabilidade pupal foi calculada através da seguinte fórmula:

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

A viabilidade de neolarva a adulto foi calculada através da seguinte fórmula:

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



Figura 12 - Tubos de ensaio mostrando as etapas que foram observadas no ciclo de vida de *Chrysomya megacephala*. Contendo respectivamente: larva, pupa e adulto na vermiculita.

Os adultos recém-emergidos foram sexados e analisados morfológicamente por meio de microscópio estereoscópico (**Figura 13, Figura 14 e Figura 15**).



Figura 13 - Microscópio estereoscópico presente no Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF) onde os espécimes foram devidamente identificados.



Figura 14 - Espécime de *Chrysomya megacephala* alfinetado para ser observado ao microscópio estereoscópico.

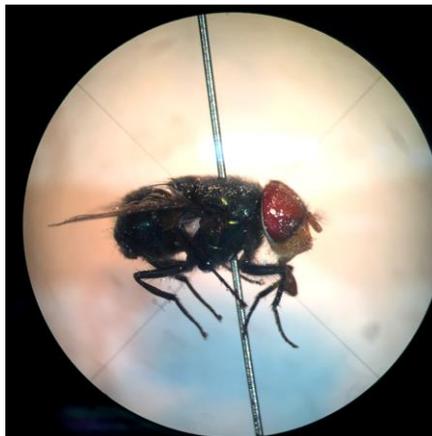


Figura 15 - Espécime de *Chrysomya megacephala* registrado no microscópio estereoscópico.

A razão sexual dos adultos foi calculada através da seguinte fórmula:

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

As alterações morfológicas foram caracterizadas através de um estereomicroscópio localizado na Coleção Malacológica do Instituto Oswaldo Cruz (CMIOC) com o objetivo de investigar quais estruturas teriam sido afetadas pelo uso dessas substâncias (**Figura 16**).



Figura 16 - Estereomicroscópio acoplado a uma câmera fotográfica digital e ao computador localizado na Coleção Malacológica do Instituto Oswaldo Cruz (CMIOC).

Os espécimes registrados neste experimento foram depositados na coleção entomológica presente no Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF) (**Figura 17**).



Figura 17 - Coleção entomológica didática do Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF/IOC).

As informações coletadas ao longo dos testes foram transferidas para o programa Microsoft® Excel® para a posterior construção de tabelas e gráficos. A mortalidade dos testes foi corrigida utilizando a fórmula de Abbot (1925):

$$\frac{\text{Mortalidade do teste} - \text{Mortalidade do grupo controle}}{\text{Viabilidade do grupo controle}} \times 100$$

Para a interpretação da variável massa corporal foi utilizado o programa estatístico Stadgraphy 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, assim como para a obtenção dos valores mínimos e máximos encontrados.

4 RESULTADOS

4.1 Análise química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Piper* sp. e *P. aduncun* obtidos por hidrodestilação foram analisados por CGAR/EM e os cromatogramas obtidos apresentaram boa resolução entre os componentes dos óleos essenciais, expressando a eficiência do método cromatográfico aplicado. A análise química dos extratos foi realizada a partir da comparação dos índices de retenção de cada substância com os valores encontrados na literatura (Adams 2001) e pela comparação com os espectros de massa da biblioteca do equipamento (**Tabela 1** e **Tabela 2**).

Tabela 1 - Resultados da análise por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR), acoplada a espectrometria de massas (EM) do óleo essencial de *Piper aduncun*.

Constituintes	Abundância Relativa (%)
α -Copaeno	0,47
trans – Cariofileno	6,45
α – Humuleno	0,79
Germacreno D	0,51
Δ – Cadineno	0,66
Dilapiol	86,20
Total identificado	95,08

Tabela 2 - Resultados da análise por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR), acoplada a espectrometria de massas (EM) do óleo essencial de *Piper* sp. (PI-02).

Constituintes	Abundância Relativa (%)
α -Terpineno	1,30
o-Cimeno	15,02
γ -Terpineno	1,22
α -Terpinoleno	0,48
4-Terpineol	1,11
α -Cubebeno	2,85
(E) – Cariofileno	6,71
10s,11s-Himachala-3(12),4-diene	4,11
4,11-Selinadieno	5,23
β – Selineno	22,74
α – Selineno	22,78
γ -cadineno	1,42
Δ – Cadineno	2,88
1S, (Z) – calamenene	1,75
Óxido de cariofileno	0,90
N.I.	1,13
α – Cadinol	0,90
N.I.	2,98

4.2 Efeito do óleo extraído de *Piper aduncum* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala*

4.2.1 Massa larval de *Chrysomya megacephala* após tratamento tópico com o óleo essencial de *Piper aduncum*

A **Tabela 3** expressa as diferentes massas das larvas encontradas nos testes com cada concentração. A massa larval média do grupo controle puro foi de $73,2 \pm 11,5$ mg e do grupo controle DMSO foi de $61,2 \pm 11,7$ mg. A concentração 200 mg apresentou a menor média de massa larval, com $46,6 \pm 18,0$ mg. A concentração 150 mg mostrou a maior média de massa larval dos grupos tratados com o óleo, com um valor de $65,6 \pm 10,94$ mg (**Tabela 3**).

Tabela 3 Massa, em miligramas, das larvas de *Chrysomya megacephala* quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper aduncum*, comparadas ao grupo controle puro e controle com DMSO.

Concentração (17,5 mL/35mg de dieta / 35 neolarvas)	Massa (mg) Média \pm DP
Controle	$73,2 \pm 11,5^a$
Controle DMSO	$61,2 \pm 11,7^b$
Concentração 25	$60,8 \pm 13,7^b$
Concentração 50	$64,5 \pm 9,8^b$
Concentração 100	$62,7 \pm 10,4^b$
Concentração 150	$65,6 \pm 10,94^b$
Concentração 200	$46,6 \pm 18,0^d$
Concentração 250	$64,5 \pm 8,85^b$
Concentração 300	$55,2 \pm 14,5^c$

DP: Desvio padrão; a, b, c, d: Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey

4.2.2 Duração dos estágios do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* após tratamento tópico com o óleo essencial de *Piper aduncum*

A **Tabela 4** apresenta a duração obtida de todas as etapas do ciclo de vida de *C. megacephala* quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo extraído de *P. aduncum*.

A duração média do período larval foi de $4,2 \pm 0,5$ dias no grupo controle e de $3,5 \pm 0,7$ dias no controle DMSO. As concentrações 50 e 100 mg apresentaram o menor tempo de duração deste estágio, com uma média de 3,1 dias e 0,6 e 0,4 de desvio padrão,

respectivamente. A concentração 250 mg apresentou o maior tempo de duração deste estágio, com $4,3 \pm 0,5$ dias (**Tabela 4**).

No grupo controle, o estágio de pré-pupa durou $1,2 \pm 0,4$ dias, enquanto que no grupo controle DMSO durou $1,1 \pm 0,3$ dias. Os experimentos realizados com a concentração 50, 200, 250 e 350 mg obtiveram a média de $1,0 \pm 0,0$ dias, equivalendo aos menores valores encontrados para esta etapa. Os maiores valores obtidos foram àqueles registrados para os testes das concentrações 25, 100 e 300 mg ($1,1 \pm 0,2$ dias) (**Tabela 4**).

O período pupal durou $5,0 \pm 0,8$ dias nos testes do grupo controle e $4,4 \pm 1,2$ dias no controle DMSO. Foi constatado o menor tempo de duração na concentração 200 mg ($2,7 \pm 1,3$ dias) e o maior tempo de duração na concentração 100 mg ($6,4 \pm 0,8$ dias) (**Tabela 4**).

No período de neolarva a adulto, a média de dias para o grupo controle foi de $9,4 \pm 0,6$ dias e para o grupo controle DMSO foi de $8,0 \pm 1,1$ dias. O grupo tratado que apresentou a menor média de duração deste estágio foi o com a concentração 200 mg ($7,5 \pm 1,5$ dias), à medida que a concentração 100 mg apresentou a maior média ($10,4 \pm 0,6$ dias) (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Tempo de desenvolvimento, em dias, das etapas do ciclo de vida de *Chrysomya megacephala* quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper aduncum*.

Concentração (17,5mL/ 35mg de dieta/ 35 neolarvas)	Estágio larval (dias)	Estágio pré-pupa (dias)	Estágio pupal (dias)	Neolarva-adulto (dias)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Controle	$4,2 \pm 0,5$ ^{a, b}	$1,2 \pm 0,4$ ^a	$5,0 \pm 0,8$ ^b	$9,4 \pm 0,6$ ^b
Controle DMSO	$3,5 \pm 0,7$ ^c	$1,1 \pm 0,3$ ^{a, b}	$4,4 \pm 1,2$ ^c	$8,0 \pm 1,1$ ^{c, d}
Concentração 25	$3,6 \pm 0,7$ ^c	$1,1 \pm 0,2$ ^b	$5,9 \pm 1,1$ ^b	$9,1 \pm 0,9$ ^b
Concentração 50	$3,1 \pm 0,6$ ^d	$1,0 \pm 0,0$ ^b	$4,2 \pm 0,5$ ^c	$8,2 \pm 0,5$ ^{c, d}
Concentração 100	$3,1 \pm 0,4$ ^d	$1,1 \pm 0,2$ ^{a, b}	$6,4 \pm 0,8$ ^a	$10,4 \pm 0,6$ ^a
Concentração 150	$3,2 \pm 0,5$ ^d	$1,0 \pm 0,0$ ^b	$5,2 \pm 0,6$ ^b	$9,4 \pm 0,5$ ^b
Concentração 200	$3,9 \pm 0,4$ ^a	$1,0 \pm 0,0$ ^b	$2,7 \pm 1,3$ ^d	$7,5 \pm 1,5$ ^d
Concentração 250	$4,3 \pm 0,5$ ^a	$1,0 \pm 0,0$ ^b	$5,1 \pm 1,3$ ^b	$10,3 \pm 24,3$ ^a
Concentração 300	$3,9 \pm 0,5$ ^{b, c}	$1,1 \pm 0,2$ ^b	$4,3 \pm 0,6$ ^c	$9,1 \pm 0,5$ ^b

DP: Desvio padrão; a, b, c, d: Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey

4.2.3 Mortalidade de *Chrysomya megacephala* após tratamento tópico com o óleo essencial de *Piper aduncum*

A **Tabela 5** apresenta a mortalidade obtida de todas as etapas do ciclo de vida de *C. megacephala* quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo extraído de *P. aduncum*.

A mortalidade larval observada no grupo controle foi de 2,86 % e no grupo DMSO foi de 11,80 %. O grupo tratado com o óleo que obteve menor mortalidade larval foi a concentração 50 mg (10,29 %), ao passo que, o grupo tratado com a maior mortalidade larval foi a concentração 200 mg (61,03 %) (**Tabela 5**).

A mortalidade pupal constatada no grupo controle puro foi de 9,56 %, enquanto que no grupo controle com DMSO foi de 8,34 %. A concentração que apresentou a menor porcentagem de mortalidade deste estágio foi a 150 mg (3,67 %), enquanto que a concentração 200 mg apresentou a maior mortalidade deste estágio (30,01 %) (**Tabela 5**).

A mortalidade de neolarva-adulto do grupo controle puro foi de 12,15 % e do grupo DMSO foi de 10,6 %. A concentração 25 mg obteve a menor porcentagem de mortalidade deste estágio (25,4 %). A concentração 200 mg teve a maior porcentagem de mortalidade do estágio de neolarva a adulto, com um valor de 72,38 % (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Mortalidade, em porcentagem, das larvas de *Chrysomya megacephala* quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper aduncum*, comparadas ao grupo controle puro e controle com DMSO.

Concentração (17,5 mL/35mg de dieta/35 neolarvas)	Mortalidade (%)		
	Estágio larval	Estágio pupal	Estágio neolarva-adulto
Controle	2,86	9,56	12,15
Controle DMSO	11,80	8,34	10,60
Concentração 25	14,70	13,50	25,40
Concentração 50	10,29	27,56	34,14
Concentração 100	37,50	8,88	34,30
Concentração 150	30,88	3,67	32,52
Concentração 200	61,03	30,01	72,38
Concentração 250	56,47	9,88	51,89
Concentração 300	33,00	7,59	41,40

4.2.4 Razão sexual de *Chrysomya megacephala* após tratamento tópico com o óleo essencial de *Piper aduncum*

A **Tabela 6** retrata a razão sexual encontrada nos experimentos com *C. megacephala* quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo *P. aduncum*, em comparação com os grupos controle. A razão sexual do grupo controle puro foi de 0,4, enquanto que a razão sexual do grupo controle com DMSO foi de 0,5. Os grupos que obtiveram o menor percentual foram as concentrações 25 e 100 mg, com 0,4 ambos. As concentrações 100, 150 e 250 mg obtiveram os maiores valores referentes à razão sexual (0,6).

Tabela 6 - Razão sexual encontrada nos experimentos com *Chrysomya megacephala* quando esta foi submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper aduncum*.

Concentração (mg)	Razão sexual
Controle	0,4
Controle DMSO	0,5
Concentração 25	0,4
Concentração 50	0,5
Concentração 100	0,4
Concentração 150	0,6
Concentração 200	0,6
Concentração 250	0,6
Concentração 300	0,5

4.2.5 Massa larval de machos e fêmeas de *Chrysomya megacephala* após tratamento tópico com o óleo essencial de *Piper aduncum*

A **Tabela 7** apresenta a massa larval dos machos e a massa larval média das fêmeas quando submetidos aos testes com *P. aduncum*. A média de massa larval dos insetos adultos machos foi de $76,82 \pm 8,86$ mg, no grupo controle e de $63,89 \pm 10,62$ mg no grupo controle DMSO. A média de massa larval dos insetos adultos fêmeas foi de $70,72 \pm 7,35$ mg, no grupo controle e de $61,88 \pm 10,58$ mg no grupo controle DMSO.

A concentração 200 mg apresentou a menor média de massa larval dos machos e a menor média de massa larval das fêmeas dos grupos tratados com o óleo: $53,20 \pm 17,22$ mg e $55,23 \pm 12,67$ mg, respectivamente. A concentração 150 mg apresentou a maior média de

massa larval dos machos ($70,21 \pm 9,26$ mg), enquanto que a concentração 50 mg apresentou a maior média de massa larval de fêmeas ($65,21 \pm 8,18$ mg).

Tabela 7 – Massa larval média dos machos e das fêmeas de *Chrysomya megacephala* quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper aduncum*, em comparação com os grupos controle.

Concentração (mg)	Massa machos (mg)	Massa fêmeas (mg)
	Média \pm DP	Média \pm DP
Controle	$76,82 \pm 8,86$	$70,72 \pm 7,35$
Controle DMSO	$63,89 \pm 10,62$	$61,88 \pm 10,58$
Concentração 25	$64,85 \pm 12,43$	$62,66 \pm 7,81$
Concentração 50	$68,93 \pm 5,96$	$65,21 \pm 8,18$
Concentração 100	$67,00 \pm 6,50$	$61,55 \pm 7,02$
Concentração 150	$70,21 \pm 9,26$	$63,70 \pm 10,72$
Concentração 200	$53,20 \pm 17,22$	$55,23 \pm 12,67$
Concentração 250	$67,97 \pm 7,74$	$62,64 \pm 6,60$
Concentração 300	$59,09 \pm 12,17$	$55,72 \pm 11,09$

DP: Desvio padrão

4.2.6 Atrofias de *Chrysomya megacephala* após tratamento tópico com o óleo essencial de *Piper aduncum*

A **Tabela 8** apresenta a porcentagem de machos e fêmeas atrofiados que emergiram dos experimentos feitos com as sete concentrações do óleo extraído de *P. aduncum*. O grupo controle apresentou 22,22 % de atrofia em machos, 28,45 % de atrofia em fêmeas e 37,25 % de insetos adultos atrofiados no total.

O grupo controle DMSO apresentou 18,86% de atrofia em machos, 14,03 % de atrofia em fêmeas e 16,36 % de insetos adultos atrofiados no total. A concentração 300 mg apresentou a menor porcentagem de atrofias em machos (24,32 %) e em fêmeas (12,50 %). A concentração 25 mg apresentou a maior porcentagem de atrofias em machos (62,26 %) e a concentração 100 mg apresentou a maior porcentagem de atrofias em fêmeas (77,77 %).

Em relação ao total de atrofias (machos e fêmeas) com as diferentes concentrações do óleo extraído de *P. aduncum*, a concentração 300 mg apresentou a menor porcentagem de atrofias, com 18,18 %, enquanto que a concentração 25 mg apresentou a maior porcentagem, com 59,34 %.

Tabela 8 - Porcentagem de machos e fêmeas atrofiados quando submetidos à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper aduncum*, em comparação com os grupos controle.

Concentração (mg)	Atrofia (%)		
	Machos atrofiados	Fêmeas atrofiadas	Total
Controle	22,22	28,45	37,25
Controle DMSO	18,86	14,03	16,36
Concentração 25	62,26	55,26	59,34
Concentração 50	51,21	42,50	46,91
Concentração 100	34,09	77,77	50,70
Concentração 150	22,50	33,33	28,23
Concentração 200	38,46	21,05	28,12
Concentração 250	31,81	30,30	30,90
Concentração 300	24,32	12,50	18,18

Após a emergência dos adultos, os espécimes foram divididos em três grupos: Espécimes sem atrofia, espécimes com apenas as asas atrofiadas e espécimes totalmente atrofiados. O cálculo da porcentagem de atrofia levou em consideração tanto os adultos que possuíam apenas as asas atrofiadas quanto àqueles que eram totalmente atrofiados. A **Tabela 9** mostra o número exato de espécimes que continham apenas as asas atrofiadas e aqueles que estavam completamente atrofiados, bem como a relação destes tipos de atrofia com o sexo dos mesmos.

Tabela 9 - Tipos de atrofia de machos e fêmeas quando submetidos à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper aduncum*, em comparação com os grupos controle.

Concentração	Tipo de atrofia		
	Apenas as asas atrofiadas	Totalmente atrofiados	Total
Controle	1 ♀ / 2 ♂	18 ♀ / 16 ♂	19 ♀ / 18 ♂
Controle DMSO	0 ♀ / 2 ♂	8 ♀ / 8 ♂	8 ♀ / 10 ♂
Concentração 25	2 ♀ / 4 ♂	19 ♀ / 29 ♂	21 ♀ / 33 ♂
Concentração 50	0 ♀ / 0 ♂	17 ♀ / 21 ♂	17 ♀ / 21 ♂
Concentração 100	0 ♀ / 0 ♂	21 ♀ / 15 ♂	21 ♀ / 15 ♂
Concentração 150	0 ♀ / 0 ♂	15 ♀ / 9 ♂	15 ♀ / 9 ♂
Concentração 200	0 ♀ / 1 ♂	4 ♀ / 4 ♂	4 ♀ / 5 ♂
Concentração 250	1 ♀ / 1 ♂	9 ♀ / 6 ♂	10 ♀ / 7 ♂
Concentração 300	0 ♀ / 0 ♂	5 ♀ / 9 ♂	5 ♀ / 9 ♂

Apesar de ter sido realizada a fotografia de todos os adultos que emergiram ao longo do experimento, no presente trabalho foram incluídas apenas as fotos das concentrações de *P. aduncum* e *P. gaudichaudianum* com maior taxa de atrofia, ou seja, a concentração 25 mg

e 200 mg, respectivamente. A **Figura 18**, **Figura 19** e **Figura 20** mostram exemplos de espécimes do grupo controle que se encaixam nos três grupos. A **Figura 21**, **Figura 22** e **Figura 23** mostram exemplos de espécimes da concentração 25 mg de *P. aduncum* que se encaixam nos três grupos.

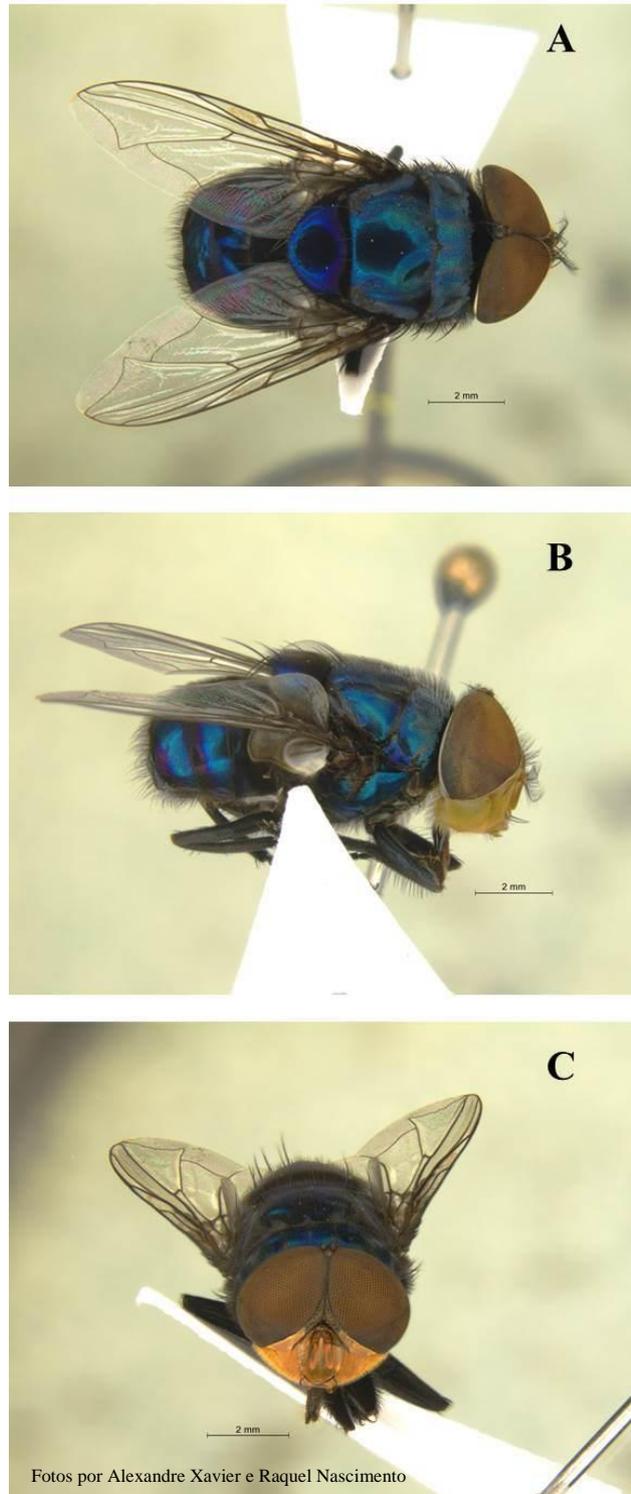


Figura 18 - Espécimes de *Chrysomya megacephala* sem atrofia do grupo controle puro.



Fotos por Alexandre Xavier e Raquel Nascimento

Figura 19 - Espécimes de *Chrysomya megacephala* com apenas as asas atrofiadas do grupo controle puro.



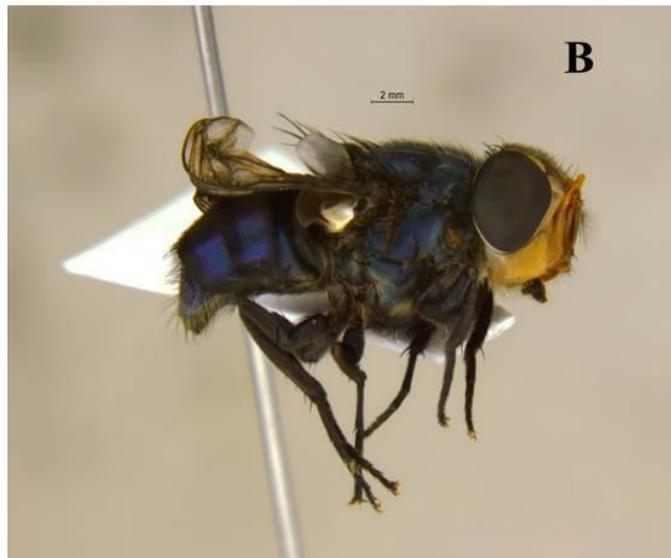
Fotos por Alexandre Xavier e Raquel Nascimento

Figura 20 - Espécimes de *Chrysomya megacephala* totalmente atrofiados do grupo controle puro.



Fotos por Alexandre Xavier e Raquel Nascimento

Figura 21 - Espécimes de *Chrysomya megacephala* sem atrofia da concentração 25 mg de óleo essencial de *Piper aduncum*.



Fotos por Alexandre Xavier e Raquel Nascimento

Figura 22 - Espécimes de *Chrysomya megacephala* com apenas as asas atrofiadas da concentração 25 mg de óleo essencial de *Piper aduncum*.



Fotos por Alexandre Xavier e Raquel Nascimento

Figura 23 - Espécimes de *Chrysomya megacephala* totalmente atrofiada da concentração 25 mg de óleo essencial de *Piper aduncum*.

4.3 Efeitos do óleo essencial extraído de *Piper sp.* (PI-02) sobre o desenvolvimento pós-embriônico de *Chrysomya megacephala*

4.3.1 Massa larval de *Chrysomya megacephala* após tratamento tópico com o óleo essencial de *Piper sp.* (PI-02)

A **Tabela 10** expressa as diferentes massas larvais encontradas nos testes com cada concentração. A massa média das larvas do grupo controle puro foi de $73,2 \pm 11,5$ mg e do grupo controle DMSO foi de $61,2 \pm 11,7$ mg. A concentração 50mg apresentou a menor média de massa larval, com $55,2 \pm 9,7$ mg. A concentração 250 mg mostrou a maior média de massa larval dos grupos tratados com o óleo, com um valor de $66,6 \pm 8,43$ mg (**Tabela 10**).

Tabela 10 - Massa, em miligramas, das larvas de *Chrysomya megacephala* quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper sp.*, comparadas ao grupo controle puro e controle com DMSO.

Concentração (17,5 mL/35 mg de dieta / 35 neolarvas)	Massa (mg) Média \pm DP
Controle	$73,2 \pm 11,5^a$
Controle DMSO	$61,2 \pm 11,7^b$
Concentração 25	$63,3 \pm 10,3^b$
Concentração 50	$55,2 \pm 9,7^b$
Concentração 100	$63,5 \pm 9,2^b$
Concentração 150	$63,3 \pm 6,59^b$
Concentração 200	$57,4 \pm 20,0^b$
Concentração 250	$66,6 \pm 8,43^{a,b}$
Concentração 300	$58,1 \pm 17,7^b$

DP: Desvio padrão; a, b: Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey

4.3.2 Duração das etapas do desenvolvimento pós-embriônico de *Chrysomya megacephala* após tratamento tópico com o óleo essencial de *Piper sp.* (PI-02)

A **Tabela 11** apresenta a duração obtida de todas as etapas do ciclo de vida de *C. megacephala* quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo extraído de *Piper sp.* (PI-02).

A duração média do período larval foi de $4,2 \pm 0,5$ dias no grupo controle e de $3,5 \pm 0,7$ dias no controle DMSO. A concentração 100 mg apresentou o menor tempo de duração deste estágio, com uma média de $3,1 \pm 0,3$ dias. A concentração 250mg apresentou o maior tempo de duração deste estágio, com $4,5 \pm 0,5$ dias (**Tabela 11**).

No grupo controle, o estágio de pré-pupa durou $1,2 \pm 0,4$ dias, enquanto que no grupo controle DMSO durou $1,1 \pm 0,3$ dias. Os experimentos realizados com a concentração 25, 100, 150, 200, 250 e 350 mg obtiveram a média de 1,0 dias, com desvio padrão de 0,0, 0,3, 0,3, 0,4, 0,2 e 0,0 dias, respectivamente, equivalendo aos menores valores encontrados para esta etapa. O maior valor obtido foi aquele registrado para os testes da concentração 50 mg ($1,1 \pm 0,5$ dias) (**Tabela 11**)

O período pupal durou $5,0 \pm 0,8$ dias nos testes do grupo controle e $4,4 \pm 1,2$ dias no controle DMSO. Foi constatado o menor tempo de duração na concentração 200 mg ($3,5 \pm 1,2$ dias) e o maior tempo de duração na concentração 100 mg ($6,1 \pm 0,4$ dias) (**Tabela 11**).

No período de neolarva a adulto, a média de dias para o grupo controle foi de $9,4 \pm 0,6$ dias e para o grupo controle DMSO foi de $8,0 \pm 1,1$ dias. O grupo tratado que possuiu a menor média de duração deste estágio foi a concentração 25 mg ($7,5 \pm 0,64$), à medida que a concentração 250 mg apresentou a maior média ($10,6 \pm 1,2$ dias) (**Tabela 11**).

Tabela 11 - Tempo de desenvolvimento, em dias, das etapas do ciclo de vida de *Chrysomya megacephala* quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper sp.* (PI-02), comparadas ao grupo controle puro e controle com DMSO.

Concentração (17,5 mL/35 mg de dieta/35 neolarvas)	Estágio larval (dias)	Estágio pré- pupa (dias)	Estágio pupal (dias)	Neolarva-adulto (dias)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Controle	$4,2 \pm 0,5^b$	$1,2 \pm 0,4^a$	$5,0 \pm 0,8^c$	$9,4 \pm 0,6^c$
Controle DMSO	$3,5 \pm 0,7^d$	$1,1 \pm 0,3^{a,b}$	$4,4 \pm 1,2^d$	$8,0 \pm 1,1^e$
Concentração 25	$3,5 \pm 0,5^d$	$1,0 \pm 0,0^b$	$4,0 \pm 0,8^e$	$7,5 \pm 0,64^f$
Concentração 50	$3,2 \pm 0,5^e$	$1,1 \pm 0,5^a$	$3,7 \pm 0,4^{e,f}$	$7,7 \pm 0,4^{e,f}$
Concentração 100	$3,1 \pm 0,3^e$	$1,0 \pm 0,3^{a,b}$	$6,1 \pm 0,4^a$	$10,2 \pm 0,5^{a,b}$
Concentração 150	$4,2 \pm 0,5^b$	$1,0 \pm 0,3^{a,b}$	$4,8 \pm 0,9^{c,d}$	$9,93 \pm 1,1^b$
Concentração 200	$3,5 \pm 0,6^d$	$1,0 \pm 0,4^{a,b}$	$3,5 \pm 1,2^f$	$8,0 \pm 1,6^e$
Concentração 250	$4,5 \pm 0,5^a$	$1,0 \pm 0,2^{a,b}$	$5,2 \pm 0,8^{b,c}$	$10,6 \pm 1,2^a$
Concentração 300	$3,8 \pm 0,6^c$	$1,0 \pm 0,0^b$	$4,4 \pm 0,6^{d,e}$	$8,7 \pm 0,5^d$

DP: Desvio padrão; a, b, c, d, e, f: Teste de Comparação Múltipla de Médias de Tukey

4.3.3 Mortalidade de *Chrysomya megacephala* após tratamento tópico com o óleo essencial de *Piper sp.* (PI-02)

A **Tabela 12** apresenta a mortalidade obtida de todas as etapas do ciclo de vida de *C. megacephala* quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo extraído de *Piper sp.* (PI-02).

A mortalidade larval observada no grupo controle foi de 2,86 % e no grupo DMSO foi de 11,80 %. O grupo tratado com o óleo que obteve menor mortalidade larval foi a concentração 25 mg (7,35 %), ao passo que, o grupo que apresentou a maior mortalidade larval foi a concentração 250 mg (58,82 %) (**Tabela 12**).

A mortalidade pupal constatada no grupo controle puro foi de 9,56 %, enquanto que no grupo controle com DMSO foi de 8,34 %. A concentração que apresentou a menor porcentagem de mortalidade deste estágio foi a 25 mg (3,97 %), enquanto que a concentração 200 mg apresentou a maior mortalidade deste estágio (30,59 %) (**Tabela 12**).

A mortalidade de neolarva-adulto do grupo controle puro foi de 12,15 % e do grupo DMSO foi de 10,6 %. A concentração 25 mg obteve a menor porcentagem de mortalidade deste estágio (1,62 %). A concentração 250 mg teve a maior porcentagem de mortalidade do estágio de neolarva a adulto, com um valor de 68,29 % (**Tabela 12**).

Tabela 12 - Mortalidade, em porcentagem, das larvas de *Chrysomya megacephala* quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper* sp., comparadas ao grupo controle puro e controle com DMSO.

Concentração (17,5mL/ 35mg de dieta/ 35 neolarvas)	Mortalidade (%)		
	Estágio larval	Estágio pupal	Estágio neolarva-adulto
Controle	2,86	9,56	12,15
Controle DMSO	11,80	8,34	10,60
Concentração 25	7,00	3,97	1,62
Concentração 50	25,10	9,08	30,89
Concentração 100	44,12	5,25	46,34
Concentração 150	27,20	18,45	39,84
Concentração 200	33,00	30,59	45,53
Concentração 250	59,00	24,02	68,29
Concentração 300	37,60	8,89	38,21

4.3.4 Razão sexual de *Chrysomya megacephala* após tratamento tópico com o óleo essencial de *Piper* sp. (PI-02)

A **Tabela 13** retrata a razão sexual encontrada nos experimentos com *C. megacephala* quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo *Piper* sp. (PI-02), em comparação com os grupos controle. A razão sexual do grupo controle puro foi de 0,4, enquanto que a razão sexual do grupo controle com DMSO foi de 0,5. Os grupos que

obtiveram o menor percentual foram às concentrações 25 e 100 mg, com 0,4 ambos. A concentração 200 mg obteve o maior valor referente a razão sexual (0,7).

Tabela 13 - Razão sexual encontrada nos experimentos com *Chrysomya megacephala* quando esta foi submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper* sp. (PI-02).

Concentração (mg)	Razão sexual
Controle	0,4
Controle DMSO	0,5
Concentração 25	0,4
Concentração 50	0,5
Concentração 100	0,4
Concentração 150	0,6
Concentração 200	0,7
Concentração 250	0,5
Concentração 300	0,6

4.3.5 Massa larval de machos e fêmeas de *Chrysomya megacephala* após tratamento tópico com o óleo essencial de *Piper* sp. (PI-02)

A **Tabela 14** apresenta as massas larvais médias dos machos e as massas larvais médias das fêmeas quando submetidos aos testes com *Piper* sp. (PI-02). A média de massa larval dos insetos adultos machos foi de $76,82 \pm 8,86$ mg, no grupo controle e de $63,89 \pm 10,62$ mg, no grupo controle DMSO. A média de massa larval dos insetos adultos fêmeas foi de $70,72 \pm 7,35$ mg, no grupo controle e de $61,88 \pm 10,58$ mg no grupo controle DMSO.

A concentração 50 mg apresentou a menor média de massa larval dos machos e a menor média de massa larval das fêmeas dos grupos tratados com o óleo, proporcionando $59,49 \pm 8,31$ mg e $54,53 \pm 8,13$ mg, respectivamente. A concentração 100 mg apresentou a maior média de massa larval dos machos ($67,05 \pm 6,21$ mg), enquanto que a concentração 250 mg apresentou a maior média de massa larval de fêmeas ($65,02 \pm 6,70$ mg).

Tabela 14 – Massa larval média dos machos e das fêmeas de *Chrysomya megacephala* quando submetida à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper* sp. (PI- 02), em comparação com os grupos controle.

Concentração (mg)	Massa macho (mg)	Massa fêmea (mg)
	Média ± DP	Média ± DP
Controle	76,82 ± 8,86	70,72 ± 7,35
Controle DMSO	63,89 ± 10,62	61,88 ± 10,58
Concentração 25	64,51 ± 9,93	62,19 ± 10,42
Concentração 50	59,49 ± 8,31	54,53 ± 8,13
Concentração 100	67,05 ± 6,21	63,45 ± 5,84
Concentração 150	65,64 ± 6,28	62,01 ± 6,33
Concentração 200	65,48 ± 15,99	62,56 ± 10,72
Concentração 250	66,93 ± 10,25	65,02 ± 6,70
Concentração 300	62,34 ± 12,24	61,89 ± 13,96

DP: Desvio padrão

4.3.6 Atrofias de *Chrysomya megacephala* após tratamento tópico com o óleo essencial de *Piper* sp. (PI-02)

A **Tabela 15** apresenta a porcentagem de machos e fêmeas atrofiados que emergiram dos experimentos feitos com as sete concentrações do óleo extraído de *Piper* sp. (PI-02). O grupo controle apresentou 22,22 % de atrofia em machos, 28,45 % de atrofia em fêmeas e 37,25 % de insetos adultos atrofiados no total. O grupo controle DMSO apresentou 18,86 % de atrofia em machos, 14,03 % de atrofia em fêmeas e 16,36 % de insetos adultos atrofiados no total.

A concentração 100 mg apresentou a menor porcentagem de atrofias em machos (9,75 %) e em fêmeas (12,50 %). A concentração 150 mg apresentou a maior porcentagem de atrofias em machos (43,33 %) e a concentração 200 mg apresentou a maior porcentagem de atrofias em fêmeas (44,44 %).

Em relação ao total de atrofias (machos e fêmeas) com as diferentes concentrações do óleo extraído de *Piper* sp. (PI-02), a concentração 100 mg apresentou a menor porcentagem de atrofias, com 10,76 %, enquanto que a concentração 200 mg apresentou a maior porcentagem, com 43,07 %.

Tabela 15 - Porcentagem de machos e fêmeas de *Chrysomya megacephala* atrofiados quando submetidos à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper* sp. (P1-02), em comparação com os grupos controle.

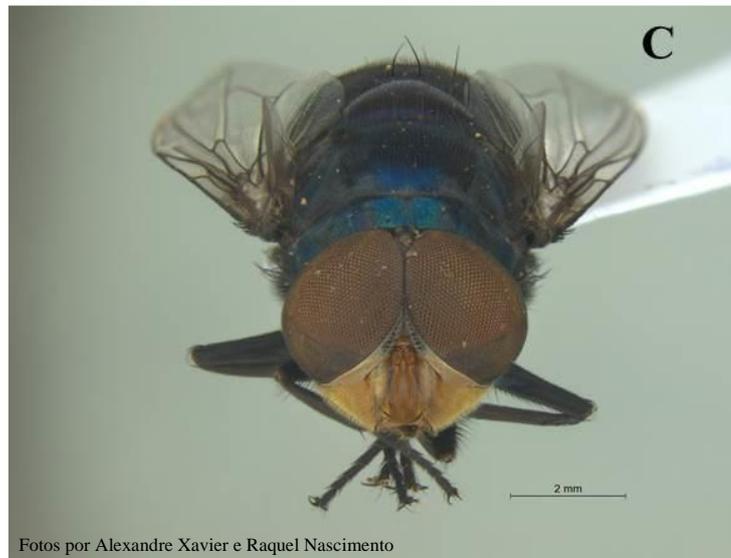
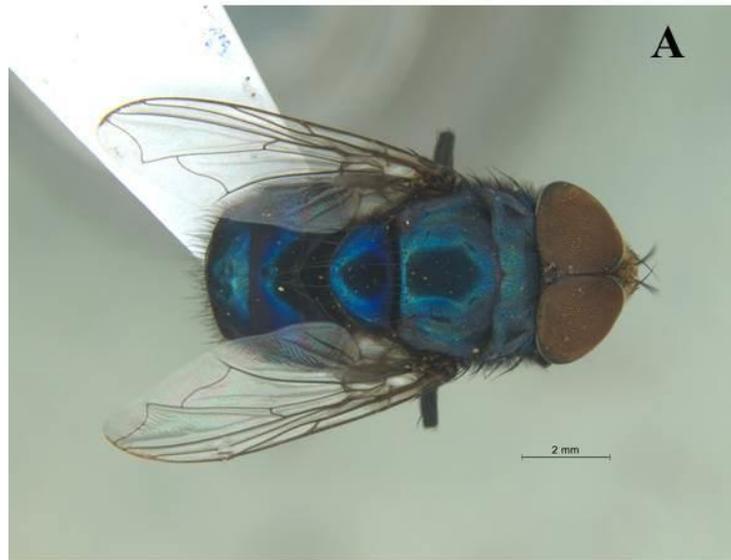
Concentração (mg)	Atrofia (%)		
	Machos atrofiados	Fêmeas atrofiadas	Total
Controle	22,22	28,45	37,25
Controle DMSO	18,86	14,03	16,36
Concentração 25	35,82	37,03	35,48
Concentração 50	19,04	25,58	22,35
Concentração 100	9,75	12,50	10,76
Concentração 150	43,33	23,25	31,50
Concentração 200	40,00	44,44	43,07
Concentração 250	38,88	42,85	41,02
Concentração 300	16,66	14,28	15,27

A **Tabela 16** mostra o número exato de espécimes que continham apenas as asas atrofiadas e aqueles que estavam completamente atrofiados, bem como a relação destes tipos de atrofia com o sexo dos mesmos.

As **Figuras 24, 25 e 26** mostram exemplos de espécimes da concentração 25 mg de *Piper* sp. (PI-02) que se encaixam nos grupos: espécimes sem atrofia, espécimes com apenas as asas atrofiadas e espécimes totalmente atrofiados.

Tabela 16 - Tipos de atrofias de machos e fêmeas de *Chrysomya megacephala* quando submetidos à aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper* sp., em comparação com os grupos controle.

Concentração (mg)	Tipo de atrofia		
	Apenas as asas atrofiadas	Totalmente atrofiados	Total
Controle	1 ♀ / 2 ♂	18 ♀ / 16 ♂	19 ♀ / 18 ♂
Controle DMSO	0 ♀ / 2 ♂	8 ♀ / 8 ♂	8 ♀ / 10 ♂
Concentração 25	5 ♀ / 0 ♂	15 ♀ / 24 ♂	20 ♀ / 24 ♂
Concentração 50	0 ♀ / 0 ♂	11 ♀ / 8 ♂	11 ♀ / 8 ♂
Concentração 100	0 ♀ / 0 ♂	3 ♀ / 4 ♂	3 ♀ / 4 ♂
Concentração 150	0 ♀ / 0 ♂	10 ♀ / 13 ♂	10 ♀ / 13 ♂
Concentração 200	4 ♀ / 1 ♂	16 ♀ / 27 ♂	20 ♀ / 28 ♂
Concentração 250	1 ♀ / 0 ♂	8 ♀ / 7 ♂	9 ♀ / 7 ♂
Concentração 300	0 ♀ / 0 ♂	6 ♀ / 5 ♂	6 ♀ / 5 ♂



Fotos por Alexandre Xavier e Raquel Nascimento

Figura 24 - Espécimes de *Chrysomya megacephala* sem atrofia tratadas com a concentração 200 mg de óleo essencial de *Piper* sp. (PI-02).



Fotos por Alexandre Xavier e Raquel Nascimento

Figura 25 - Espécimes de *Chrysomya megacephala* com apenas as asas atrofiadas tratadas com a concentração 200 mg de óleo essencial de *Piper* sp. (PI-02).



Fotos por Alexandre Xavier e Raquel Nascimento

Figura 26 - Espécimes de *Chrysomya megacephala* totalmente atrofiadas tratadas com a concentração 200 mg de óleo essencial de *Piper* sp. (PI-02).

5 DISCUSSÃO

5.1 Metodologia empregada no presente estudo

Apesar de apresentarem grande importância para a terapia larval (Moreira et al. 2014; Patarroyo 2015), as larvas de dípteros pertencentes principalmente à família Calliphoridae, precisam ser controladas. Além dos danos econômicos que as míases primárias e secundárias causam à agropecuária, estas podem ainda prejudicar a saúde humana e dos animais por serem extremamente invasivas (Greenberg 1971 e 1973; James 1947; Zumpt 1965; Paiva 1994).

Assim, a aplicação de extratos naturais diretamente sobre as neolarvas, como foi realizado no presente estudo, poderia fornecer subsídios para a criação de um fármaco capaz de minimizar os danos causados pelas míases, ou até mesmo eliminá-las. Além disso, esse método de teste também proporciona uma observação mais apurada dos efeitos destas substâncias sobre o ciclo de vida do inseto, pois consegue determinar o estágio de desenvolvimento que sofreu alterações e quais foram elas.

A quantidade de larvas por repetição, assim como a quantidade de repetições que irá se utilizar, deve ser estabelecida visando à significância estatística dos testes. Campos et al. (2000) ao dissertarem sobre essa questão comentam que a escolha de três repetições é a mais comum por “evitar a invariabilidade do número 1 e foge ao perigo da repetição coincidente representado pelo número 2”. Contudo, não existe um número de repetições específico e padronizado para esses tipos de experimento.

A metodologia experimental empregada neste estudo vem sendo utilizada desde 2007 em trabalhos cujo objetivo foi a investigação das possíveis alterações que diferentes concentrações de extratos de planta teriam sobre determinada espécie de inseto. Ao total, somam-se sete trabalhos que a utilizam. Todos realizaram seus testes em insetos pertencentes à ordem Diptera, dos quais cinco abordavam a família Calliphoridae, um a família Muscidae e um a família Phoridae. As famílias de plantas testadas variaram, contudo, nenhum dos estudos realizou testes com a família Piperaceae.

Cabral et al. (2007) testaram a lignina yangambina extraída de *Ocotea duckei* (Lauraceae) contra *C. megacephala*. Mello et al. (2010) testaram o látex extraído de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (Euphorbiaceae) contra *Megaselia scalaris* (Phoridae). Mendonça et al. (2011) testaram o látex extraído de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) contra *C. megacephala*.

LOPES et al. (2014) testaram *Plumbago scandens* L. (Plumbaginaceae) contra *C. putoria*. Carriço et al. (2014) testaram *Pouteria sapota* (Sapotaceae) também contra *C. putoria*. Pinto et al. (2015a) testaram *Cymbopogon citratus* (Poaceae) em *M. domestica* e posteriormente repetiram estes testes em *C. megacephala*, *C. putoria* e *Lucilia cuprina* (Pinto et al. 2015b).

Até o presente momento, o único trabalho de controle biológico existente na literatura no qual foram aplicados óleos do gênero *Piper* sobre a larva do inseto foi o de Gomes et al. (2009). Estes autores aplicaram topicamente diferentes concentrações de extratos obtidos de *Piper marginatum* e *Piper purusanum* em larvas de *Anastrepha* sp. (Diptera: Tephritidae). Estas aplicações foram feitas utilizando um borrifador (capacidade de 100 mL) de 24 em 24 horas durante quatro dias.

Para a realização dos testes do presente estudo foram utilizadas quatro repetições de cada grupo (dois grupos controles e sete grupos com diferentes concentrações de cada um dos óleos essenciais) contendo 35 larvas cada. Cabral et al. (2007) utilizaram três repetições de cada grupo (dois grupos controles e um grupo contendo yangambina) com 30 larvas cada. Gomes et al. (2009) utilizaram uma repetição por grupo, sendo dois grupos controle (*P. marginatum* se solubilizou em Tween 20 e o extrato aquoso de *P. purusanum* se solubilizou em água) e quatro grupos com diferentes concentrações. Cada tratamento conteve 10 larvas pertencentes aos últimos instares larvais.

Mello et al. (2010) utilizaram quatro repetições de cada grupo (três grupos com diferentes concentrações do látex e um grupo controle) com 50 larvas cada. Os testes realizados por Mendonça et al. (2011) contaram com três repetições por grupo (um grupo controle e cinco grupos com diferentes concentrações do látex) com 50 larvas cada. Lopes et al. (2014) utilizaram também três repetições de cada grupo (um grupo controle e três grupos contendo concentrações diferentes de *P. scandens*) contendo 50 larvas cada.

Carriço et al. (2014) fizeram uso de quatro repetições de cada grupo (um grupo controle e três grupos com diferentes concentrações de *P. sapota*) contendo 50 larvas cada. Pinto et al. (2015a) também utilizaram 50 larvas em cada uma das quatro repetições de cada grupo (dois grupos controles e seis grupos com diferentes concentrações de *C. citratus* proveniente do Brasil e dois grupos controles e seis grupos com diferentes concentrações de *C. citratus* proveniente de Cuba). Posteriormente, esses mesmos autores repetiram as

condições deste teste em *C. megacephala*, *C. putoria* e *L. cuprina* utilizando a mesma metodologia (Pinto et al. 2015b).

Dos artigos levantados que utilizam esta metodologia, Gomes et al. (2009) foram os que trabalharam com um menor número amostral de neolarvas. Estes autores utilizaram 10 larvas por grupo, totalizando 50 larvas por óleo essencial testado. Como realizaram seus testes com dois extratos de óleo, os mesmos utilizaram um total de 100 larvas.

Cabral et al. (2007) foram o segundo grupo de pesquisa que utilizaram a menor quantidade de larvas por grupo, uma vez que fizeram uso de 90 neolarvas por grupo, totalizando 270 neolarvas. Carriço et al. (2014), Pinto et al. (2015^a; 2015b) e Mello et al. (2010) constituem os trabalhos que fizeram uso dos maiores números amostrais de larvas (200 neolarvas por grupo).

No presente trabalho foram separadas 140 neolarvas por grupo, valor próximo às 150 larvas utilizadas por Mendonça et al. (2011) e Lopes et al. (2014). Estes autores fizeram uso de 900 e 600 neolarvas no total do experimento, respectivamente, se assemelhando a quantidade trabalhada por Carriço et al. (2014) e Mello et al. (2010), que utilizaram 800 neolarvas no total.

Para os experimentos com *P. aduncum* e *Piper* sp. (PI-02) foram utilizadas no total 2240 neolarvas, se assemelhando as 1600 neolarvas totais usadas por Pinto et al. (2015a) e Pinto et al. (2015b) em seus experimentos com *C. citratus* provenientes do Brasil e 1600 neolarvas totais em seus experimentos com *C. citratus* provenientes de Cuba (para cada espécie de mosca). Comparado aos trabalhos citados, o presente estudo conteve a maior quantidade de concentrações dos óleos testada. Por conta disso, se estabeleceu a menor quantidade de larvas possíveis, sem que se alterasse a significância estatística, para que os experimentos fossem realizados em conjunto.

O presente estudo utilizou a proporção de 0,5 µL das diferentes concentrações dos óleos por larva, assim como de DMSO. Com exceção do trabalho realizado pelo grupo de Gomes et al. (2009), o restante dos artigos mencionados utilizou a proporção de 1 µL/larva. Fazer uso de inseticidas naturais para controlar populações de insetos não torna essa medida de controle mais segura ou menos tóxica ao homem e aos animais. Inclusive, alguns inseticidas botânicos são tóxicos a peixes, mamíferos, insetos e outros organismos, apesar de o serem em menor escala do que os sintéticos (Picanço e Martins 2007).

Por conta disso, apesar dos inseticidas botânicos apresentarem uma rápida degradação, uma relativa baixa toxicidade e uma rápida ação, eles ainda precisam ser manuseados e utilizados com cautela (Picanço e Martins 2007). Em teoria, quanto maior for concentração aplicada sobre a larva, maior a probabilidade de esta causar alterações no ambiente. Assim, foi convencionada a metade da concentração habitual utilizada na literatura com o intuito de verificar se esta relativa baixa concentração poderia ter efeitos positivos da mesma forma que a concentração 1 μL /larva.

Amatuzzi et al. (2006) ao reunirem siglas, palavras e títulos de extrema importância que sejam compreendidos para o estabelecimento de critérios metodológicos de qualidade, ressaltam a importância de se realizar um controle negativo e um controle positivo. Segundo estes autores, o controle positivo seria “o grupo usado para comparação que usa o tratamento convencional - padrão ouro”, enquanto que o controle negativo seria “o grupo usado para comparação que recebe apenas placebo”.

O dimetilsulfóxido (DMSO) foi sintetizado pelo químico Alexander Saytzeff e descrito como um potente solvente. Esse composto foi utilizado comercialmente apenas com este fim a partir da década de 1940 até o final de 1959. No início dos anos 1960, este composto passou a ser introduzida no mercado como uma droga medicinal, apresentando diferentes utilidades até os dias atuais (Brayton 1986). Esse composto químico apresenta a fórmula $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$ (Rosenbaum 1965), peso molecular 78,13 g/mol (Carpenter 1994) e 18,5 °C de temperatura de congelamento (Brayton 1986).

Diferentes estudos mostraram que o DMSO apresenta mais de 30 propriedades farmacológicas e terapêuticas, por conta de sua elevada capacidade de interagir com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos e outros compostos sem alterar suas configurações moleculares (Sojka et al. 1990). Além disso, esse composto químico possui grande habilidade de atravessar tecidos, difundindo-se através do organismo. Muitas substâncias quando associadas ao DMSO são capazes de ser carregadas através das membranas (Brayton 1986; Blythe et al. 1986; Rose e Hodgson 1993; RAND-Luby et al. 1996).

Assim, utilizar o dimetilsulfóxido como solvente para os óleos extraídos de *P. aduncum* e *Piper* sp. (PI-02) poderia auxiliar a penetração dos mesmos sobre o tecido da larva, garantindo sua absorção. Além disso, este composto apresenta resultados satisfatórios para diluir substâncias apolares, como os óleos essenciais, por apresentar esta mesma característica.

Martins et al. (2013) elaboraram um artigo sobre a solubilidade das substâncias orgânicas, e ressaltaram a veracidade da regra geral “semelhante dissolve semelhante”. Estes autores relatam que “geralmente, os compostos apolares ou fracamente polares são solúveis em solventes apolares ou de baixa polaridade, enquanto que compostos de alta polaridade são solúveis em solventes também polares (...)”. Como o presente estudo objetivou conhecer as reações que diferentes concentrações dos óleos poderiam causar no desenvolvimento de *C. megacephala*, foi adotado apenas o grupo controle negativo (DMSO), além do controle puro.

Ao longo do presente estudo, se utilizou apenas carne bovina moída em estado de putrefação por constituir o substrato de alimentação que mais se assemelha ao encontrado por estes organismos na natureza. Cabral et al. (2007), Lopes et al. (2014), Carriço et al. (2014) e Pinto et al. (2015a; 2015b) utilizaram também carne bovina putrefata, enquanto que Mello et al. (2010) e Mendonça et al. (2011) utilizaram carne equína para a realização de seus experimentos.

No ambiente, as larvas destes dipteros se desenvolvem sobre materiais ricos em proteína animal, como carcaças de vertebrados (d’Almeida 2000). Apesar do uso de carne bovina como dieta para a criação de moscas necrófagas ainda ser a metodologia mais utilizada (Ulliyett 1950), estudos voltados para a busca por dietas artificiais ou alternativas à carne bovina são de extrema importância.

Barbosa et al. 2004 relataram que o uso de carne bovina na criação de dipteros muscoides poderia comprometer a assepsia do ambiente em que as colônias se encontram, uma vez que durante o processo de putrefação há a liberação de gases contendo caimônios. Ferraz et al. (2011) ressaltam ainda que determinadas dietas alternativas à carne teriam a vantagem de não precisar de refrigeração para serem mantidas, otimizando o espaço laboratorial (Chaudhry et al. 2000) e facilitando sua estocagem (Parra 2011).

A capacidade de gerar “dipteros muscoides de qualidade”, como menciona Ferraz et al. (2011), está diretamente relacionada às características da dieta e sua capacidade de formar um micro hábitat propício para o desenvolvimento larval. Parra (1990) também resalta a importância de se considerar aspectos como a dureza, textura, homogeneização e conteúdo de água dos materiais ao se escolher a melhor dieta para criação de insetos.

Todos os trabalhos citados utilizaram algodões hidrofóbicos para tampar os tubos de ensaio que continham as larvas L3. No presente trabalho se optou pelo uso de tecido do tipo

escaline, pois em testes anteriores foi verificado que utilizar este material para selar os tubos facilita a saída das larvas do mesmo. Além disso, algumas não conseguem retornar para o tubo, ficando presas entre o algodão, adquirindo, assim, atrofias não-naturais.

Em seu trabalho sobre fatores que influenciariam o desenvolvimento dos insetos, Rodrigues (2004) ressalta que a temperatura é um dos principais fatores ambientais que podem interferir no ciclo de vida desses artrópodes. Por se tratarem de organismos pecilotérmicos, ou seja, que não possuiriam um sistema de termo regulação, a temperatura do ambiente regularia diretamente o metabolismo do inseto.

Segundo Rodrigues (2004), a faixa de temperatura ótima dos insetos pode variar de 15 a 38 °C. Contudo, aproximadamente 25 °C seria a temperatura considerada a melhor para o desenvolvimento do inseto. Esta corresponderia à temperatura em que os artrópodes se desenvolveriam com mais rapidez e gerariam uma maior quantidade de descendentes.

De 38 a 48 °C os insetos entram em um estado de torpor, podendo retornar as suas atividades caso a temperatura baixe novamente para a “faixa ótima”. De 48 a 52 °C esses organismos adquirem um estado de “estivação permanente”, de maneira que não conseguem readquirir suas atividades quando a temperatura retorna ao normal. Acima dos 52 °C o inseto é levado à morte (Rodrigues 2004).

Caso a temperatura seja reduzida para abaixo dos 15 °C, a maioria desses artrópodes iniciam um processo de hibernação temporária. Quando esta se aproxima de 0 °C ou um pouco abaixo disto ocorre o super resfriamento e congelamento dos fluídos, respectivamente. Os insetos atingem a morte em temperaturas abaixo de -20 °C. A variação de temperatura está diretamente relacionada com a variação de umidade, de maneira que estes fatores não possam ser avaliados separadamente (Rodrigues 2004).

Rodrigues (2004) ainda relata que a quantidade de água presente no corpo dos insetos está diretamente ligada ao tipo de alimento e ao ambiente em que o mesmo vive. Substratos com uma umidade desfavorável podem causar a morte de imaturos, por conta da carência de umidade, ou a geração de fungos sobre o mesmo, pelo excesso de umidade. A faixa considerada favorável de umidade para o desenvolvimento, longevidade e fecundidade os insetos seria entre 40 e 80 %.

De acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia, de 1961 até o presente momento, a média anual de temperatura máxima média para o Rio de Janeiro foi de 27,3 °C, enquanto que a temperatura mínima média foi de 21 °C. A umidade relativa durante este

período foi de 79,1 %. Cada vez mais há o aumento das temperaturas mínimas globais (Câmara et al. 2009), por conta disso, para a realização dos experimentos, se convencionou a temperatura de 27 ± 1 °C e a umidade relativa de 70 ± 10 %.

As discussões a cerca dos trabalhos de Gomes et al. (2009), Mello et al. (2010), Lopes et al. (2014), Carriço et al. (2014) e Pinto et al. (2015b) realizadas neste trabalho são generalistas, uma vez os autores não utilizaram a mesma espécie do presente estudo.

5.2 Efeitos sobre o estágio larval

5.2.1 Massa larval

Assim como é importante aferir a mortalidade larval, a massa larval indicaria claramente se a larva não conseguiu se adequar ao substrato alimentar, após receber o óleo a ser testado. Se for este o caso, esta forma imatura não conseguirá se alimentar direito e consequentemente se desenvolver (Silveira et al. 1997; Lomônaco e Germanos 2001).

Cabral et al. (2007) encontraram $67,6 \pm 9,9$ mg na média de massa larval de suas larvas no grupo controle, $69,8 \pm 8,0$ mg no grupo controle com acetona e $67,9 \pm 11,2$ mg na concentração 25 mg de yangambina. Apesar das larvas de *C. megacephala* terem se mostrado sensível a este óleo, por terem tido alterações em seu tempo de desenvolvimento, o peso das mesmas não foi afetado pela aplicação do mesmo Cabral et al. (2007).

No presente estudo, o grupo controle obteve $73,2 \pm 11,5$ mg de peso larval, enquanto que o grupo testado com DMSO obteve $61,2 \pm 11,7$ mg. A diferença estatística entre o grupo controle e o grupo controle com DMSO foi confirmada através do Teste de Tukey ($p < 0,01\%$), de maneira que é notável a capacidade do diluente de alterar a massa das larvas. Assim, estudos voltados para o uso de diluentes alternativos, ou estudos que visem investigar o motivo pelo qual as larvas são afetadas por estes compostos, são necessários.

Na concentração 25 mg de *P. aduncum* se obteve $60,8 \pm 13,7$ mg de peso larval, enquanto que nesta mesma concentração de *Piper* sp. se obteve $63,3 \pm 10,3$ mg. O extrato obtido de *P. aduncum*, diluído nesta concentração, consegue afetar mais as larvas de *C. megacephala*. Apesar da discussão a respeito dos compostos presentes em ambos os óleos precisar ser mais aprofundada, *P. aduncum* apresentou mais sesquiterpenos em sua composição química do que PI-02. Por estas substâncias estarem incluídas em amostras que plantas que mostraram anteriormente alguma atividade inseticida (Kapadia et al. 1933; Santos

et al. 2013; Oliveira et al. 2016), o fato de *P. aduncum* ter causado mais toxicidade às larvas desta varejeira poderia ser justificado.

O valor obtido na concentração 25 mg do extrato proveniente de *O. duckei* se aproxima mais daquele encontrado nos testes com *Piper* sp., contudo, yangambina claramente apresentou uma atividade larvicida maior do que os óleos testados no presente estudo. Este óleo já vem mostrando grandes potenciais larvicidas em larvas de *D. melanogaster* (Miyazawa et al.1994; Miyazawa et al. 1998), *S. litura* (Gonzales-Coloma et al. 1994), diferente de *P. aduncum* e PI-02 que estão sendo testados pela primeira vez em larvas de algum inseto.

Ao trabalhar com esta mesma espécie, Mendonça et al. (2011) obtiveram 61 mg no grupo controle, se aproximando do obtido no presente estudo. Apesar dos testes com *P. aduncum* e PI-02 terem encontrado 73,2 mg de peso larval, houve um desvio padrão grande (11,5 mg). Mendonça et al. (2011) obtiveram aproximadamente 65,0 mg no grupo tratado com 50 mg do látex, 60,2 mg de peso larval no grupo tratado com 100 e 150 mg, 76 mg no grupo tratado com 200 mg do látex e 70 mg no grupo tratado com 300 mg.

Na concentração 50 mg de *P. aduncum* as larvas adquiriram uma média de $64,5 \pm 9,8$ mg de peso, enquanto que nos testes com PI-02 obtiveram $55,2 \pm 9,7$ mg. Os resultados obtidos nos testes com *P. aduncum* se aproximam mais daqueles encontrados por Mendonça et al. (2011). Assim como foi encontrado por estes autores, a concentração 100 mg e 150 mg de PI-02 obtiveram valores similares (respectivamente, $63,5 \pm 9,2$ e $63,3 \pm 6,59$ mg). Os resultados encontrados para estes grupos nos testes com *P. aduncum*, por outro lado, variaram. Estas concentrações obtiveram, respectivamente, $62,7 \pm 10,4$ e $65,6 \pm 10,94$ mg.

A concentração 200 mg de *P. aduncum* obteve $46,6 \pm 18,0$ mg de peso larval, enquanto que esta mesma concentração nos testes com *Piper* sp. obteve $57,4 \pm 20,0$ mg. Os resultados obtidos por Mendonça et al. (2011) foram menos significativos para estas concentrações, mostrando que os óleos testados no presente estudos possuem uma capacidade maior de afetar as formas imaturas de *C. megacephala* sob estas concentrações.

Na concentração 300 mg de *P. aduncum* o peso aumenta, em comparação com a concentração 200 mg ($55,2 \pm 14,5$ mg). Diferente do que foi encontrado para estas concentrações em PI-02 ($58,1 \pm 17,7$ mg na concentração 300 mg). Resultados com mais potencial larvicida do que aqueles obtidos por Mendonça et al. (2011).

O fato dos desvios padrões encontrados para o peso larval deste díptero no presente estudo terem sido altos dificultou a comparação exata com os trabalhos mencionados nesta monografia. Enquanto que algumas larvas tiveram seu peso afetado diretamente pelos óleos, outras não, reforçando assim a necessidade de investigar de maneira mais aprofundada quais características estariam envolvidas na resistência larval aos óleos.

Pinto et al. (2015b) em seus testes com *C. megacephala*, encontraram $74,5 \pm 4,1$ mg no grupo controle e $74,3 \pm 4,1$ mg no grupo controle com DMSO de peso larval. Constituindo o trabalho cujo peso larval das larvas de *C. megacephala* mais se aproximou dos resultados encontrados no presente estudo. Em seus testes com *C. putoria* e *L. cuprina*, estes autores obtiveram, respectivamente, $40,1 \pm 6,7$ mg no grupo controle e $45,3 \pm 4,4$ mg no grupo DMSO e $33,2 \pm 3,4$ mg no grupo controle e $32,5 \pm 2,5$ mg no grupo controle com DMSO.

Em outro trabalho, estes mesmos autores encontraram $21,2 \pm 1,6$ mg de peso larval para *M. domestica*, $22,2 \pm 1,3$ mg no grupo DMSO e $25,7 \pm 5,4$ mg no grupo testado com citral (Pinto et al. 2015a). Esses resultados mostram que a família Muscidae apresenta um peso larval menor do que a família Calliphoridae. A comparação dos dados obtidos no presente estudo com aqueles encontrados em trabalhos que tenham estudado a mesma família de mosca precisa ser feita com cautela.

Como Muscidae apresenta um peso larval menor do que a família Calliphoridae, avaliar se o óleo ministrado sobre *M. domestica* causou um efeito larvicida ou não, deve ser feito levando sempre em consideração os dados encontrados para os grupos controle. Esse cuidado deve ser tido até mesmo em resultados encontrados entre as espécies de Calliphoridae, uma vez que o gênero *Lucilia* apresentou, naturalmente, peso larval inferior ao gênero *Chrysomya*.

Em nenhum dos testes com os óleos de *Piper* houve peso larval tão baixo quanto nos testes com *L. cuprina* e *M. domestica* feitos pelos autores. Por conta disso, os resultados obtidos para estas espécies nas concentrações dos óleos testados foram apenas citados, mas não puderam ser comparados.

Nos testes com *C. megacephala*, estes autores encontraram para a concentração 5 mg, $57,6 \pm 2,6$ mg nos testes com o óleo proveniente do Brasil e $57,4 \pm 2,8$ mg nos testes com o óleo proveniente de Cuba. Os experimentos com *C. putoria* mostraram para essa concentração, $47,4 \pm 3,6$ e $48,3 \pm 2,3$ mg, respectivamente. Os experimentos com *L. cuprina* mostraram para essa concentração, $35,3 \pm 3,7$ e $34,8 \pm 3,9$ mg, respectivamente. Para

M. domestica, estes autores encontraram $19,6 \pm 1,4$ mg nos testes com o óleo proveniente do Brasil e $19,5 \pm 1,3$ mg nos testes com o óleo proveniente de Cuba.

O presente estudo, como foi mencionado anteriormente, não trabalhou com a concentração 5 mg. A concentração 200 mg de *Piper* sp. foi a que mais se aproximou dos resultados obtidos nos testes com *C. megacephala*, nesta concentração, feita por Pinto et al. (2007b), uma vez que obteve $57,4 \pm 20,0$ mg.

A concentração 200 mg de *P. aduncum* foi a que obteve peso larval mais similar aos resultados obtidos nos testes destes autores com *C. putoria* ($46,6 \pm 18,0$ mg). Nesse caso, é difícil opinar qual seria o melhor óleo a se utilizar, pois não se trata da mesma espécie de mosca. Apesar dos resultados obtidos serem similares e apontarem assim que o melhor seria escolher o *C. citratus* pela sua baixa concentração, esta espécie apresentou naturalmente um peso larval menor do que *C. megacephala*. Isso indica que *P. aduncum* foi capaz de impactar mais as larvas do que *C. citratus*.

Nos testes com *C. megacephala*, estes autores encontraram para a concentração 10 mg, $60,1 \pm 5,9$ mg nos testes com o óleo proveniente do Brasil e $59,8 \pm 5,9$ mg nos testes com o óleo proveniente de Cuba. Os experimentos com *C. putoria* mostraram para essa concentração, $53,0 \pm 5,1$ e $52,3 \pm 54$ mg, respectivamente. Os experimentos com *L. cuprina* mostraram para essa concentração, $26,9 \pm 2,9$ e $7,5 \pm 3,0$ mg, respectivamente. Para *M. domestica*, estes autores encontraram $17,5 \pm 1,2$ mg nos testes com o óleo proveniente do Brasil e $17,5 \pm 1,3$ mg nos testes com o óleo proveniente de Cuba.

A concentração 25 mg de *P. aduncum* foi a que obteve um peso larval mais parecido com os resultados obtidos por estes autores em seus testes também com *C. megacephala* com o óleo proveniente do Brasil ($60,8 \pm 13,7$ mg). Em relação aos resultados encontrados para esta mesma espécie nos testes com o óleo proveniente de Cuba, a concentração 300 mg de *Piper* sp. foi a que mais se assemelhou aos valores obtidos por Pinto et al. (2007b) ($58,1 \pm 17,7$ mg).

Com relação aos dados obtidos em seus testes com *C. putoria* para os dois óleos testados, a concentração 300 mg de *P. aduncum* e 50 mg de *Piper* sp. foram a que obtiveram peso larval mais parecido com os resultados obtidos por estes autores ($55,2 \pm 14,5$ e $55,2 \pm 9,7$ mg, respectivamente).

Nos testes com *C. megacephala*, estes autores encontraram para a concentração 25 mg, $50,3 \pm 5,3$ mg nos testes com o óleo proveniente do Brasil e $55,9 \pm 5,8$ mg nos testes

com o óleo proveniente de Cuba. Os experimentos com *C. putoria* mostraram para essa concentração, $46,1 \pm 6,9$ e $45,5 \pm 6,3$ mg, respectivamente. Os experimentos com *L. cuprina* mostraram para essa concentração, $31,9 \pm 4,6$ mg e $2,2 \pm 4,8$ mg, respectivamente. Para *M. domestica*, estes autores encontraram $20,4 \pm 1,0$ mg nos testes com o óleo proveniente do Brasil e $20,4 \pm 0,9$ mg nos testes com o óleo proveniente de Cuba.

A concentração 25 mg de *P. aduncum* e de PI-02 apresentaram um peso larval maior ao encontrado por Pinto et al. (2015b). Novamente, a concentração 300 mg de *P. aduncum* e 50 mg de *Piper* sp. foram a que obtiveram peso larval mais parecido com os resultados obtidos por estes autores em seus testes também com *C. megacephala* com o óleo proveniente do Brasil e de Cuba. A concentração 200 mg de *P. aduncum* obteve $46,6 \pm 18,0$ mg de peso larval, se tornando aquela que gerou resultados mais parecidos com os testes feitos em *C. putoria* na concentração 25 mg (dos dois óleos essenciais).

Nos testes com *C. megacephala*, estes autores encontraram para a concentração 50 mg, $59,9 \pm 3,5$ mg nos testes com o óleo proveniente do Brasil e $59,5 \pm ,35$ mg nos testes com o óleo proveniente de Cuba. Os experimentos com *C. putoria* mostraram para essa concentração, $46,1 \pm 2,1$ e $45,6 \pm 2,1$ mg, respectivamente. Os experimentos com *L. cuprina* mostraram para essa concentração, $27,3 \pm 2,8$ e $6,7 \pm 2,7$ mg, respectivamente. Para *M. domestica*, estes autores encontraram $27,0 \pm 2,2$ mg nos testes com o óleo proveniente do Brasil e $27,0 \pm 2,4$ mg nos testes com o óleo proveniente de Cuba.

A concentração 50 mg de *P. aduncum* obteve um peso larval maior do que o previsto por estes autores ($64,5 \pm 9,8$ mg). Contudo, a concentração 50 mg de PI-02 obteve um peso larval semelhante ($55,2 \pm 9,7$ mg). A concentração 300 mg de *Piper* sp. foi a que obteve um peso larval mais parecido com os resultados obtidos por estes autores em seus testes também com *C. megacephala* com o óleo proveniente do Brasil e de Cuba. Com relação aos dados obtidos em seus testes com *C. putoria* para os dois óleos testados, a concentração 200 mg de *P. aduncum* foi a que obteve peso larval mais parecido com os resultados obtidos por estes autores.

Nos testes com *C. megacephala*, estes autores encontraram para a concentração 75 mg, $61,7 \pm 8,9$ mg nos testes com o óleo proveniente do Brasil e $52,5 \pm 9,6$ mg nos testes com o óleo proveniente de Cuba. Os experimentos com *C. putoria* mostraram para essa concentração, $47,6 \pm 5,0$ e $48,7 \pm 4,9$ mg, respectivamente. Os experimentos com *L. cuprina* mostraram para essa concentração, $27,3 \pm 2,8$ e $26,7 \pm 2,7$ mg, respectivamente. Para

M. domestica, estes autores encontraram $21,5 \pm 2,7$ mg nos testes com o óleo proveniente do Brasil e $21,4 \pm 2,7$ mg nos testes com o óleo proveniente de Cuba.

O grupo DMSO dos dois óleos de *Piper* foi a que obteve um peso larval mais parecido com os resultados obtidos por estes autores em seus testes também com *C. megacephala* com o óleo proveniente do Brasil ($61,2 \pm 11,7$ mg). Com relação aos resultados obtidos para esta mesma espécie no óleo proveniente de Cuba, a concentração 300 mg de *P. aduncum* e 50 mg de *Piper* sp. foram as que mais se pareceram. Com relação aos dados obtidos em seus testes com *C. putoria* para os dois óleos testados, a concentração 200 mg de *P. aduncum* foi novamente a que obteve peso larval mais parecido com os resultados obtidos por estes autores.

Nos testes com *C. megacephala*, estes autores encontraram para a concentração 100 mg, $56,6 \pm 9,1$ mg nos testes com o óleo proveniente do Brasil e $56,9 \pm 9,2$ mg nos testes com o óleo proveniente de Cuba. Os experimentos com *C. putoria* mostraram para essa concentração, $50,4 \pm 5,7$ mg e $51,2 \pm 5,4$ mg, respectivamente. Os experimentos com *L. cuprina* mostraram para essa concentração, $31,0 \pm 3,1$ mg e $31,9 \pm 3,5$ mg, respectivamente. Para *M. domestica*, estes autores encontraram $22,0 \pm 1,7$ mg nos testes com o óleo proveniente do Brasil e $22,4 \pm 2,2$ mg nos testes com o óleo proveniente de Cuba.

A concentração 100 mg de *P. aduncum* e de PI-02 obtiveram um peso larval maior do que o previsto por estes autores ($62,7 \pm 10,4$ e $63,5 \pm 9,2$ mg, respectivamente). A concentração 300 mg de *P. aduncum* e 50 mg de PI-02 foram as que obtiveram um peso larval mais parecido com os resultados obtidos por estes autores em seus testes também com *C. megacephala* e com *C. putoria* com o óleo proveniente do Brasil e de Cuba.

Os dados referentes ao peso larval das espécies encontrados no presente estudo foram similares àqueles encontrados pelas espécies de *Chrysomya* trabalhadas por Pinto et al. (2015b). Apesar de algumas concentrações terem encontrado resultados semelhantes, de uma forma geral, os óleos de *Piper* testados precisam ser usados em altas concentrações para desencadear o mesmo efeito do óleo de *C. citratus*. De maneira que seria mais indicado utilizar o *C. citratus*, uma vez que fornece o mesmo efeito, mas em uma concentração menor.

Lopes et al. (2014) em seus estudos com *C. putoria* encontraram $55,0 \pm 6,4$ mg de peso larval no grupo controle, $55,0 \pm 6,2$ mg na concentração 25 mg, $52,0 \pm 5,1$ mg na concentração 50 mg e na concentração 75 mg. No presente estudo também foram encontradas concentrações diferentes que proporcionaram o mesmo peso larval. A concentração 50 mg de *P. aduncum* obteve $64,5 \pm 9,8$ mg, enquanto que a concentração 250 mg obteve

64,5 ± 8,85 mg. A concentração 25 mg de *Piper* sp. obteve 63,3 ± 10,3 mg, enquanto que a concentração 150 mg obteve 63,3 ± 6,59 mg.

Todos os resultados encontrados por estes autores se assemelham mais àqueles encontrados na concentração 50 mg de PI-02 do presente estudo (55,2 ± 14,5 mg). De uma forma geral, os valores encontrados por estes autores foram menores do que aqueles encontrados no presente estudo, porém o fato de se tratarem de espécies de moscas diferentes poderia justificar esta discrepância nos resultados. Diferente do que Lopes et al. (2014) constataram, os óleos essenciais de *Piper* testados apresentaram toxicidade significativa nas larvas de *C. megacephala*.

Carriço et al. (2014) ao estudarem também *C. putoria*, encontraram aproximadamente 45 mg de peso larval no grupo controle e na concentração 5 e 25 mg de *P. sapote* e 55 mg na concentração 10 mg desse mesmo óleo. Assim como ocorreu ao comparar os resultados de Lopes et al. (2014), todos os resultados encontrados por estes autores se assemelham mais àqueles encontrados na concentração 50 mg de PI-02 do presente estudo, possivelmente por se tratar de espécies de *Chrysomya* diferente.

Mello et al. (2010) ao estudarem *E. splendens* var. *hislopii* (Euphorbiaceae) contra *M. scalaris* não avaliaram o peso larval obtido por esta espécie nas diferentes concentrações do óleo, impossibilitando a comparação entre os trabalhos.

Concluiu-se então que a concentração 200mg de *P. aduncum* foi a que mais diferiu do grupo controle puro, possuindo a capacidade de diminuir a massa média das larvas, seguida da concentração 300mg. No que diz respeito aos testes com PI-02, todas as concentrações diferiram do grupo controle puro, com exceção da concentração 250mg. Essas constatações foram estatisticamente confirmadas através do Teste de Tukey ($p < 0,01\%$),

5.2.2 Duração do estágio larval dos grupos controle

Aferir a duração do estágio larval destes dípteros quando submetidos a extratos de plantas, é de fundamental importância para estudos de controle. Segundo alguns autores, o prolongamento da fase larval do inseto, sob estas circunstâncias, poderia indicar uma baixa adequação ao substrato alimentar (Silveira et al. 1997; Lomônaco e Germanos 2001), uma vez que a larva permaneceria buscando alimento o suficiente para adquirir peso para sua empupação (Roper et al. 1996).

Alguns autores sugerem ainda que compostos extraídos de plantas são capazes de modificar fisiologicamente os sistemas neuroendócrinos do inseto, dificultando seu crescimento (Cabral et al. 2007; Carriço et al. 2014). Por conta disso, substâncias que retardam a duração do estágio larval poderiam ser diretamente responsáveis por desencadear alterações nos processos endócrinos destes organismos (Cabral et al. 2007). Dessa forma, a mensuração da duração deste estágio permitiria, assim, uma melhor verificação do tipo de substância, e sua concentração, que causaria resistência larval (Silveira et al. 1997) e desregulação hormonal (Cabral et al. 2007).

A duração média obtida no período larval dos testes com *P. aduncum* e PI-02 a 27 ± 1 °C e 70 ± 10 % de umidade foi de $4,2 \pm 0,5$ dias no grupo controle. Cabral et al. (2007), Mendonça et al. (2011) e Pinto et al. (2015b) ao realizarem seus experimentos com *C. megacephala* também fizeram uso desta mesma temperatura e umidade.

Cabral et al. (2007) obtiveram $5,51 \pm 0,86$ dias no grupo controle, enquanto Mendonça et al. (2011) obtiveram 4,3 dias de duração. Pinto et al. (2015b) encontraram $4,4 \pm 0,5$ dias de duração deste estágio no grupo controle. Estes valores representam a maior duração para este período encontrada em todos os artigos levantados que trabalharam com o controle biológico de *C. megacephala* utilizando extratos de plantas.

Os valores encontrados para o grupo controle do presente estudo se aproximam mais daqueles obtidos por Mendonça et al. (2011) e Pinto et al. (2015b). Contudo, a faixa de valores possíveis para essa etapa (de acordo com o desvio padrão encontrado pelos autores em seus experimentos) ainda prevê os resultados obtidos por Cabral et al. (2007), mostrando uma margem relativamente padrão de duração deste estágio a 27 °C.

Na literatura existem diversos trabalhos que procuram conhecer a duração das etapas do desenvolvimento pós-embrionário dos dipteros muscoides sobre diferentes temperaturas. Além da possibilidade de determinar os padrões de ocorrência das espécies sobre diferentes fatores, compreender a biologia dos insetos é essencial para complementar os estudos de entomologia forense (Pujol-Luz et al. 2008; Yang e Shiao 2012). Este tipo de dado, juntamente com estudos de levantamento de fauna cadavérica, biologia e ecologia forneceriam subsídios para auxiliar a estimativa de IPM (Pujol-Luz et al. 2008).

Estudos indicam que a taxa de desenvolvimento dos dipteros muscoides, conseqüentemente a duração de suas etapas de vida, se aceleram com o aumento de temperatura, assim como a qualidade da dieta utilizada é alterada (Kamal 1958; Minkenber e

Helderman 1990; Milward-De-Azevedo et al. 1996; Sukontason et al. 2008, Thevan et al. 2010). Milward-de-Azevedo et al. (1996) ao realizarem este tipo de estudo com *C. megacephala*, obtiveram 5,05 dias de duração de seu estágio larval à 24 graus e 4,0 dias de duração a 30 °C.

Gabre et al. (2005) obtiveram 5,4 dias de duração deste estágio para *C. megacephala* à 26 °C, enquanto Barros-Cordeiro e Pujol-Luz (2010) obtiveram 4,08 dias. Barcellos (2014) obteve 5,58 dias de duração deste estágio, quando trabalhou com *C. megacephala* à 25 °C, corroborando esta teoria.

Bourel et al. (2003) ressaltam que os protocolos experimentais estão diretamente relacionados com possíveis alterações no ciclo de desenvolvimento dos insetos. Questões como o tipo de substrato a ser utilizado podem influenciar a duração do período de vida dos imaturos (Kamal 1958). O fato de Cabral et al. (2007) e Pinto et al. (2015b) terem utilizado também vermiculita como substrato para pupação pode ter favorecido o encontro de valores semelhantes para a duração do estágio larval à 27 °C.

Lopes et al. (2014) ao avaliarem os efeitos dos extratos provenientes de *P. scandens* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *C. putoria* a 27 ± 1 °C e umidade de 70 ± 10 %, observaram uma duração de $3,4 \pm 0,5$ dias deste estágio no grupo controle. Ao trabalharem com esta mesma espécie e condições de temperatura e umidade, Carriço et al. (2014) obtiveram uma média de $4,8 \pm 0,5$ dias no grupo controle, enquanto Pinto et al. (2015b) obtiveram uma média de $3,3 \pm 0,5$ dias.

Trabalhos realizados por outros autores, que não visaram o controle biológico, constataram durações equivalentes às encontradas por Lopes et al. (2014), Carriço et al. (2014) e Pinto et al. (2015b). Oliveira et al. (2007), por exemplo, ao realizarem estudos a cerca da morfologia e duração dos ínstares larvais de *C. putoria* à 27 ± 1 °C, 60 ± 10 % U.R. e fotofase de 14 horas, encontraram uma duração de 3,8 dias.

Como mencionado anteriormente, o ciclo de desenvolvimento de uma mesma espécie pode sofrer uma margem de variação natural. Os valores encontrados nos trabalhos mencionados demonstram isto. Assim sendo, é plausível supor que as espécies pertencentes à família Calliphoridae terão diferentes durações de suas etapas do desenvolvimento pós-embrionário, apesar de apresentar certa proximidade.

O trabalho realizado por Estrada et al. (2009) comprova este fato. Ao estudar o desenvolvimento de *C. albiceps* em dieta artificial acrescida de tecido animal, estes autores

obtiveram 5,5 dias de duração do período larval. Ao comparar os resultados encontrados por estes autores, com aqueles obtidos pelos demais citados neste trabalho, vemos que *C. putoria* apresenta o menor tempo de duração do estágio larval, seguida de *C. megacephala* e por fim, *C. albiceps*. Isso mostra que existe variação na duração desta etapa do ciclo de vida até mesmo dentro gênero *Chrysomya*.

PINTO et al. (2015b) obtiveram uma média de $3,2 \pm 0,4$ dias no grupo controle, ao trabalharem também com *L. cuprina*. Cordeiro (2014), ao estudar o tempo de desenvolvimento desta espécie em câmara climatizada (B.O.D.) regulada para $23,0 \pm 1,0$ °C, 60 ± 10 % UR e fotoperíodo de 12 horas, obteve 5,4 dias para seu período larval. Greenberg e Szyska (1984) ao realizarem este mesmo tipo de estudo em uma floresta chuvosa no Peru e sob condições não controladas (temperatura variando entre $26 \pm 3,1$ e $21,7 \pm 1,9$ °C), obtiveram 5,54 - 6,96 dias de duração do período larval.

Em experimentos realizados com temperatura controlada, O'Flynn (1983), encontrou a 20 e 28°C, 3,8 dias de duração do desenvolvimento larval desta espécie, enquanto que Paes et al. (2001) obtiveram 5,9 dias à 25 °C e 7,8 dias à 27 °C. Os resultados obtidos no trabalho de Pinto et al. (2015b) se assemelham daqueles encontrados por Greenberg e Szyska (1984) e O'Flynn (1983) à 25 °C.

Como mencionado, a duração do desenvolvimento pós-embrionário de dípteros muscoides pode variar não apenas entre os gêneros, mas entre a mesma espécie. Os fatores bióticos e abióticos envolvidos no momento do teste, assim como as condições experimentais em que o mesmo foi realizado, são os responsáveis pela variação encontrada entre as informações (Bourel et al. 2003).

Pinto et al. (2015b) ao testarem a bioatividade de *C. citratus* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *M. domestica*, obtiveram $6,7 \pm 0,5$ dias de duração no grupo controle. Mello et al. (2010) encontraram $4,5 \pm 0,5$ dias de duração do período larval de *Megaselia scalaris*. Até o presente momento, não existem trabalhos que tenham tido como objetivo estudar a duração das etapas do desenvolvimento pós-embrionário desta espécie de díptera, impossibilitando a comparação dos resultados obtidos por Mello et al. (2010) com a literatura.

Mello et al. (2010), Lopes et al. (2014) e Carriço et al. (2014) atribuíram apenas um grupo controle ao experimento, que seria o controle puro, enquanto que Mendonça et al. (2011) utilizou um grupo controle com água destilada. Assim, a comparação dos resultados

encontrados no grupo controle negativo, ou controle com diluente químico, foi realizada apenas com o trabalho de Cabral et al. (2007), Gomes et al. (2009) e Pinto et al. (2015a; 2015b).

O intuito de se utilizar um grupo tratado com DMSO seria de verificar se as possíveis alterações que iriam surgir nos espécimes estariam relacionadas com o diluente ou com os óleos ministrados. O grupo controle puro é imprescindível para comparar os resultados obtidos nos grupos tratados com o que seria a duração “natural” do ciclo desta espécie.

A duração média obtida no período larval dos testes com *P. aduncum* e PI-02 a 27 ± 1 °C e 70 ± 10 % de umidade foi de $4,2 \pm 0,5$ dias no grupo controle e de $3,5 \pm 0,7$ dias no grupo controle com DMSO. A variação de 0,7 dias entre os dois grupos mostra que este diluente supostamente aceleraria o desenvolvimento das larvas de *C. megacephala*.

Os trabalhos realizados por Pinto et al. (2015a, 2015b) também apontam essa possível reação. Em seus testes com *C. megacephala*, estes autores encontraram $4,4 \pm 0,5$ dias de duração do estágio larval no grupo controle e $4,3 \pm 0,4$ dias no grupo controle com DMSO. Os experimentos com *C. putoria* mostraram uma média de $3,3 \pm 0,5$ dias no grupo controle e $3,3 \pm 0,4$ dias no grupo controle com DMSO.

Os experimentos com *L. cuprina* apresentaram uma média de $3,2 \pm 0,4$ dias no grupo controle e $3,2 \pm 0,4$ dias no grupo controle com DMSO. Em outro trabalho, feito com *M. domestica*, este grupo encontrou $6,7 \pm 0,5$ dias de duração no grupo controle, $5,3 \pm 0,6$ dias no grupo controle com DMSO e $3,2 \pm 0,4$ no grupo controle com citral.

Os resultados encontrados no presente trabalho e nos trabalhos citados acima diferem daqueles obtidos por Cabral et al. (2007). Apesar de se tratar de outro composto químico, estes autores encontraram $3,4 \pm 0,6$ dias no grupo controle e $4,1 \pm 0,5$ dias no grupo controle com acetona. A diferença também de 0,7 dias entre ambos os grupos mostra um desenvolvimento larval mais lento naquelas incluídas no grupo com o diluente.

Nestes artigos, os autores não justificam os possíveis motivos para ocorrerem estas alterações no ciclo do inseto. Contudo, por se tratarem de compostos químicos que não são naturais ao organismo, é plausível supor que o simples contato do inseto com estes diluentes poderia causar grandes alterações em seus sistemas.

Outra explicação para as alterações que estes compostos causaram no ciclo dos insetos testados poderia ser a forma como os mesmos são manuseados. O DMSO, por exemplo, apresenta grande capacidade higroscópica, por conta de sua intensa relação com o hidrogênio.

Dessa forma, essa substância pura é capaz de passar rapidamente para a concentração entre 66 – 67 % caso seja deixada exposta ao ambiente (Brayton 1986).

Essa mudança de concentração pode influenciar diretamente a resposta do inseto ao composto ministrado. Substâncias como o DMSO que apresentam uma incrível capacidade carreadora e de penetração e difusão, devem ser manipuladas com cautela (Brayton 1986).

O DMSO utilizado no presente estudo foi mantido em frasco hermeticamente fechado e próprio para o mesmo, como é o recomendado (Alsup e Debowes 1984), excluindo a possibilidade de ter sofrido variações em sua concentração. Além disso, este diluente apresenta uma toxicidade reconhecidamente baixa (Brayton, 1986; Soyka 1990; ROSE e Hodgson 1993; Stone 1993), o que torna difícil acreditar que tenha causado danos ao metabolismo de *C. megacephala*.

Gomes et al. (2009) avaliaram somente a mortalidade larval encontrada nos testes, inviabilizando a discussão e comparação sobre a duração deste estágio no grupo controle e nos grupos tratados.

5.2.3 Duração do estágio larval dos grupos tratados com diferentes concentrações dos óleos

Para a realização de seus testes, Cabral et al. (2007) dissolveram a lignina yangambin em 100 mg/mL de acetona e depois diluíram esta amostra em 0,8 % de NaCl, criando a proporção de 1:4 do composto. Para facilitar a discussão dos resultados obtidos, as porcentagens dos extratos de plantas adotados nos artigos levantados foram convertidas para a linguagem utilizada no presente trabalho. Assim, a proporção utilizada por Cabral et al. (2007) corresponderia a 25 mg de yangambina.

Estes autores obtiveram $5,5 \pm 0,9$ dias no grupo controle e $6,7 \pm 1,11$ dias no grupo tratado com 25 mg do composto extraído de *O. duckei*. Essa informação mostra que o grupo experimental que recebeu esta concentração do extrato teve seu período larval mais longo, quando comparado ao grupo controle. Esse tipo de reação não foi observado na concentração 25 mg das duas espécies de *Piper* testadas no presente estudo.

Enquanto que grupo controle puro teve $4,2 \pm 0,5$ dias de duração, a concentração 25 mg do grupo tratado com *P. aduncum* teve $3,6 \pm 0,7$ dias e a concentração 25 mg do grupo tratado com PI-02 teve $3,5 \pm 0,5$ dias. Quando comparamos os dados obtidos no grupo controle com DMSO ($3,5 \pm 0,7$), notamos uma maior semelhança entre os valores obtidos para as concentrações 25 mg.

A yangambina já havia mostrado ser tóxico para larvas de outros insetos (Miyazawa et al. 1998; Gonzales-Coloma et al. 1994), assim, se esperava que o mesmo causasse alterações no desenvolvimento de *C. megacephala*. Cabral et al. (2007) sugeriram que a yangambina interfere indiretamente no sistema endócrino dessa mosca varejeira, não permitindo que a mesma tenha controle sobre seu crescimento, ou diretamente, bloqueando sua produção de hormônios (Cabral et al. 1999).

Apesar da planta utilizada por Cabral et al. (2007) pertencer à família Lauraceae e aquelas utilizadas no presente estudo pertencerem à família Piperaceae, estas se incluem na Super-Ordem Magnoliana. Esse grupo é caracterizado por apresentar flores trimíferas, pólen com um poro e, geralmente, folhas ramificadas (Raven 2007).

Podemos imaginar, assim, que por pertencerem a mesma Super-Ordem, as espécies *P. aduncum* e *Piper* sp. (PI-02) também provocariam alterações no crescimento de *C. megacephala* e bloqueariam sua produção do hormônio protoracicotrópico, ecdisona (Cabral et al. 1999) ou diurético (Cabral et al. 2000b).

O fato destes autores terem testado apenas uma concentração da amostra de planta não permitiu determinar quais seriam as concentrações em que houve o maior e menor período do estágio larval. Os resultados encontrados por Cabral et al. (2007) na concentração 25 mg foram quase idênticos àqueles obtidos no grupo controle puro de ambos os óleos utilizados no presente estudo e na concentração 150 mg de PI-02 ($4,2 \pm 0,5$ dias). As concentrações 250 mg de *P. aduncum* e de PI-02 também geraram resultados semelhantes aos obtidos por estes autores. Enquanto aquela proporcionou $4,3 \pm 0,5$ de duração deste estágio, esta proporcionou $4,5 \pm 0,5$ dias (**Tabela 3** e **Tabela 10**).

As informações levantadas nos experimentos com os óleos mostraram que os mesmos não possuem dose-dependência sobre inseto, ou seja, as aplicações tópicas das maiores concentrações dos óleos essenciais sobre as larvas não provocaram maior índice de mortalidade das mesmas. Assim, o fato da concentração 150 mg de PI-02 não ter provocado nenhum efeito deletério sobre a duração do estágio larval de *C. megacephala*, quando comparado ao grupo controle, precisa ser melhor investigado.

Em estudos de controle biológico não é esperado que as concentrações dos óleos aplicados topicamente (especialmente as altas) tenham resultados semelhantes aos do grupo controle. É necessário investigar também se as durações do estágio larval encontradas nas concentrações são aleatórias ou se podem ser justificadas de alguma forma.

Além disso, quando incluímos o grupo controle DMSO na análise dos resultados, observamos que há a possibilidade desse diluente ser o causador da diminuição do período larval, uma vez que os resultados encontrados nas concentrações 25 mg dos óleos se igualam aos obtidos por este grupo. Para explicar melhor todos esses tipos de reações são necessários estudos voltados para a investigação morfológica das formas imaturas por meio de microscopia (eletrônica de varredura /ou transmissão /ou de luz=óptica).

Caso fosse do interesse de algum grupo de pesquisa que o estágio larval de *C. megacephala* tivesse 4,2 dias de duração, o mais recomendado seria utilizar a yangambina. A concentração 25 mg deste óleo foi capaz de gerar a mesma duração do estágio larval que as concentrações de *P. aduncum* e PI-02 mencionadas. Quanto maior for a concentração do óleo, mesmo que tenha origem natural, maior será a chance de causar danos à saúde e ao ambiente.

Contudo, se tratando apenas do interesse de encontrar um inseticida natural que cause alterações endócrinas nas formas imaturas destes dípteros, de maneira a reduzir seu estágio larval, ambos os óleos poderiam ser utilizados. Nesse caso, os resultados encontrados no grupo controle de todos os testes precisam ser levados em consideração. Cabral et al. (2007) obtiveram uma duração do estágio larval no grupo controle maior do que aquela obtida no presente estudo, mas isto não indica que tenham obtido melhores resultados para este grupo do que aqueles encontrados aqui.

Como mencionado anteriormente, a duração do desenvolvimento pós-embrionário das espécies varia constantemente, mesmo sobre condições de temperatura e umidade semelhantes. Nos testes com as espécies de *Piper*, as concentrações com 25 mg das amostras das plantas tiveram um menor tempo de duração do período larval, exatamente como Cabral et al. (2007) encontraram.

Mendonça et al. (2011) diluíram o látex de *P. amapa* em água destilada para obter as concentrações 0,5 % (50 mg), 1,0 % (100 mg), 1,5 % (150 mg), 2,0 % (200 mg) e 3,0 % (300 mg). Estes autores encontraram a duração de 4,0 dias na concentração 50 mg, 3,9 dias na concentração 100 mg, 4,1 dias na concentração 150 mg, 4,2 dias na concentração 200 mg, 4,3 dias na concentração 300 mg. Como os mesmos obtiveram 4,8 dias de duração no grupo controle, consideraram que a concentração 100 mg apresentou o menor período de duração e a concentração 300 mg apresentou o maior período de duração.

Nos testes realizados com *P. aduncum* foram obtidos $3,1 \pm 0,6$ dias de duração na concentração 50 mg, $3,1 \pm 0,4$ dias na concentração 150 mg, $3,2 \pm 0,5$ dias na duração

150 mg, $3,9 \pm 0,4$ dias na duração 200 mg e $3,9 \pm 0,5$ dias na duração 300 mg. A concentração 50 mg de *Piper* sp. obteve $3,2 \pm 0,5$ dias de duração deste estágio, a 100 mg obteve $3,1 \pm 0,3$ dias, a 150 mg obteve $4,2 \pm 0,5$ e a 200 mg obteve $3,5 \pm 0,6$ dias (tabela 3 e tabela 10).

Como o grupo controle puro do presente estudo teve $4,2 \pm 0,5$ dias de duração para o estágio larval e o grupo controle com DMSO teve $3,5 \pm 0,7$ dias, as concentrações que geraram os menores valores de duração deste estágio foram: 50 e 100 mg (*P. aduncum*) e 100 e 50 mg (*Piper* sp.). As concentrações que geraram os maiores valores de duração deste estágio foram: 200 e 300 mg (*P. aduncum*) e 150 e 200 mg (*Piper* sp.).

A concentração 50 e 100 mg de *P. aduncum* e PI-02 geraram o menor valor de duração do estágio larval de todo o experimento (tabela 3 e tabela 10). Resultado encontrado também por Mendonça et al. (2011) em seus testes com *P. amapa*. Levando em consideração todas as concentrações testadas, a concentração 250 mg de *P. aduncum* apresentou o maior tempo de duração deste estágio ($4,3 \pm 0,5$ dias), seguido das concentrações de 200 e 300 mg ($3,9$ e $0,4$ e $0,5$ de desvio padrão, respectivamente). Mendonça et al. (2011) também obtiveram resultados semelhantes, pois encontraram os maiores valores de duração para este estágio na concentração 300 e 200 mg, em ordem decrescente.

Mendonça et al. (2011) não discutem o motivo para as concentrações do extrato de *P. amapa* aplicada topicamente terem provocado estas reações. Contudo, assim como látex utilizado por estes autores, as menores concentrações dos óleos de *P. aduncum* e *Piper* sp. possivelmente causaram alguma alteração no organismo das larvas, por influenciarem diretamente o crescimento das mesmas, de maneira que obtiveram uma menor duração deste estágio (Cabral et al. 2007a). O fato das maiores concentrações desencaderarem períodos larvais longos, quando comparados ao controle, pode estar relacionado a uma baixa adequação ao substrato alimentar (Silveira et al. 1997; Lomônaco e Germanos 2001).

Ao decorrer do estudo se observou um ressecamento da dieta, porém os níveis de ressecamento das mesmas não foram aferidos e/ou relacionados com a duração do experimento e a qual grupo (concentração) dos óleos pertencia. Esse tipo de informação poderia auxiliar na interpretação dos resultados obtidos, pois caso fosse comprovado, por exemplo, que as baixas concentrações dos óleos provocam um ressecamento na dieta, o rápido abandono das larvas do substrato poderia ser justificado. Assim, surge necessidade de se levar

em consideração estes tipos de informações para interpretar de maneira mais aprofundada os resultados obtidos nos próximos estudos de controle biológico.

Apesar desse dado não ter sido coletado, se constatou nos experimentos que algumas larvas empupavam na carne, mostrando de certa forma uma baixa adequação ao substrato alimentar. Mendonça et al. (2011) também observaram estas reações em seus testes. Estes autores sugerem que este efeito seja uma característica positiva de um inseticida botânico, pois aquelas larvas dispersas no ambiente natural que não deixam as carcaças de vertebrados que se encontram, estão mais susceptíveis a predadores e parasitoides (Vinson e Iwantsch 1980). Faz-se necessário, assim, em próximos estudos, relacionar a porcentagem de larvas que foram incapazes de deixar a dieta com o tipo de concentração que lhes foi aplicada topicamente.

Em comparação com o grupo controle, o grupo que recebeu topicamente o DMSO teve seu período larval mais próximo daquele obtido nestes grupos tratados. Esse resultado ressalta a possibilidade de que este diluente tenha capacidade, mesmo que mínima, de causar alterações no ciclo desta mosca varejeira.

El-Shazly et al. 1996 já haviam testado outra espécie de Apocynaceae contra dípteros muscoides obtendo resultados satisfatórios. O extrato testado pelos mesmos mostrou ser capaz de reduzir a duração do período larval e pupal, suprimir a oviposição e impactar negativamente a longevidade dos adultos sobreviventes.

Piperaceae e Apocynaceae pertencem à classe Magnoliopsidas. As plantas pertencentes a essa divisão apresentam flor, cujo embrião contém dois ou mais cotilédones (Raven 2007). Por pertencerem a este mesmo grupo, estas duas famílias podem apresentar reações similares nos insetos. Ambas podem causar uma diminuição nos nutrientes disponíveis na dieta, fazendo com que as larvas migrem da mesma para buscar alimento, ocasionando em um período larval mais curto, ou permaneçam mais tempo na mesma para compensar os baixos valores nutricionais disponíveis. Somado a estas questões, o comportamento destas formas imaturas também deve ser mais bem investigado. Estudar de maneira aprofundada o grau de competição entre as larvas, por exemplo, poderia explicar a saída mais rápida das mesmas da dieta (Santos e Borja 1997).

Pinto et al. (2015b) diluíram os óleos essenciais de *C. citratus* em DMSO para obterem as concentrações: 5 % (5 mg), 10 % (10 mg), 25 % (25 mg), 50 % (50 mg), 75 % (75 mg) e 100 % (100 mg, referente ao óleo puro). Seus testes foram realizados em

C. megacephala, *C. putoria* e *L. cuprina*. Estes autores obtiveram para as respectivas concentrações citadas de *C. citratus* provenientes do Brasil: $4,8 \pm 0,4$, $4,7 \pm 0,8$, $4,8 \pm 0,6$, $5,6 \pm 0,5$, $4,7 \pm 0,3$ e $4,7 \pm 0,8$ dias de duração no período larval para *C. megacephala*, $2,4 \pm 0,5$, $2,6 \pm 0,5$, $3,1 \pm 0,2$, $2,9 \pm 0,7$, $2,5 \pm 0,5$ e $3,0 \pm 0,5$ dias de duração no período larval para *C. putoria* e $4,2 \pm 0,4$, $4,1 \pm 0,2$, $4,1 \pm 0,3$, $4,1 \pm 0,4$, $4,1 \pm 0,6$ e $4,2 \pm 0,5$ dias de duração no período larval para *L. cuprina*.

Enquanto que para as respectivas concentrações citadas de *C. citratus* provenientes de Cuba, obteve-se: $4,8 \pm 0,4$, $4,7 \pm 0,8$, $4,8 \pm 0,6$, $4,6 \pm 0,5$, $4,8 \pm 0,3$ e $4,7 \pm 0,8$ dias de duração no período larval para *C. megacephala*, $2,5 \pm 0,5$, $2,6 \pm 0,5$, $3,1 \pm 0,2$, $2,9 \pm 0,4$, $2,5 \pm 0,5$ e $3,0 \pm 0,6$ dias de duração no período larval para *C. putoria* e $4,3 \pm 0,4$, $4,1 \pm 0,3$, $4,1 \pm 0,4$, $4,1 \pm 0,5$, $4,2 \pm 0,6$ e $4,2 \pm 0,6$ dias de duração no período larval para *L. cuprina*.

Comparado com seus grupos controle puro ($4,4 \pm 0,5$ dias no período larval para *C. megacephala*, $3,3 \pm 0,5$ dias no período larval para *C. putoria* e $3,2 \pm 0,4$ dias no período larval para *L. cuprina*), os grupos que receberam DMSO tiveram seu período larval reduzido ($4,3 \pm 0,5$, $3,2 \pm 0,4$ e $3,1 \pm 0,4$ dias de duração, respectivamente), assim como ocorreu no presente estudo.

Nos experimentos com *P. aduncum* e *Piper* sp., não foram realizados testes com a concentração 5, 10 e 75mg. Apesar de ter sido utilizada a concentração 100 mg, esta não se referia ao óleo bruto da planta, como Pinto et al. (2015b) fizeram uso. As concentrações 25 mg e 50 mg de *P. aduncum* tiveram, respectivamente, 3,6 e 3,1 dias de estágio larval. Nas concentrações 25 e 50 mg de *Piper* sp. encontrou-se 3,5 e 3,2 dias para este mesmo estágio (tabela 3 e tabela 10).

Diferente do que foi constatado nos testes com *P. aduncum* e *Piper* sp., os experimentos com *C. citratus* contra *C. megacephala* e *L. cuprina* provocaram um aumento em seu período larval, tanto nos grupos tratados com a espécie proveniente do Brasil quanto aqueles tratados com a espécie proveniente de Cuba.

Nos experimentos realizados com o *C. citratus* proveniente do Brasil contra *C. megacephala*, a concentração 10mg correspondeu ao menor valor (4,7 dias) e a concentração 50mg correspondeu aquela com maior valor (5,6 dias). Nos experimentos realizados com o *C. citratus* proveniente de Cuba contra *C. megacephala*, a concentração 50mg correspondeu ao menor valor (4,6 dias) e a concentração 5 mg correspondeu aquela com maior valor (5,6 dias). Apenas os resultados com o *C. citratus* proveniente do Brasil

diferem daqueles encontrados no presente estudo com *P. aduncum* e *Piper* sp., uma vez que entre a concentração 25 e a 50 mg, aquela em que houve um maior valor de dias foi a 25 mg (tabela 3 e tabela 10).

Nos experimentos realizados com o *C. citratus*, proveniente tanto do Brasil quanto de Cuba, contra *L. cuprina*, as concentrações que corresponderam ao menor valor foram a de 10 mg (4,1 dias em ambas as espécies) e a concentração 5 mg correspondeu aquela com maior valor (4,6 e 4,3 dias, respectivamente). A comparação dos resultados encontrados no presente estudo com estes obtidos por Pinto et al. (2015b) não pode ser realizada de forma mais aprofundada, por se tratarem de concentrações diferentes. Contudo, assim como nos testes com *P. aduncum* e *Piper* sp., a menor concentração do óleo foi aquela que gerou uma maior duração de dias no estágio larval (tabela 3 e tabela 10).

Semelhante ao que foi observado nos testes com *P. aduncum* e *Piper* sp., os experimentos com *C. citratus* contra *C. putoria* provocaram uma diminuição no período larval desta espécie, tanto nos grupos tratados com a espécie proveniente do Brasil quanto aqueles tratados com a espécie proveniente de Cuba. Nestes experimentos, a concentração de *C. citratus*, proveniente tanto do Brasil quanto de Cuba, que correspondeu ao menor valor foi a de 5mg (2,4 e 2,5 dias, respectivamente) e a concentração de 25 mg correspondeu aquela com maior valor (3,0 e 3,1 dias, respectivamente). Assim como nos testes com *P. aduncum* e *Piper* sp., a concentração 25 mg foi aquela que proporcionou um tempo maior do estágio larval (tabela 3 e tabela 10).

Pinto et al. (2015b) não constataram diferenças significativas entre os óleos. Apesar dos óleos utilizados no presente estudos pertencerem a espécies diferentes, pode-se observar diferenças significativas entre os dados levantados. Nos testes realizados neste trabalho concluiu-se que a espécie *P. aduncum* foi capaz de provocar uma diminuição maior no estágio larval, quando comparada à PI-02 (tabela 3 e tabela 10).

Ao fazer uso destas mesmas condições experimentais, Pinto et al. (2015a), ao realizarem testes com *M. domestica*, obtiveram para as respectivas concentrações citadas de *C. citratus* provenientes do Brasil: $7,2 \pm 0,4$, $7,2 \pm 0,4$, $7,2 \pm 0,4$, $5,2 \pm 0,4$, $5,2 \pm 0,4$ e $12,2 \pm 0,4$ dias de duração no período larval. Para estas mesmas concentrações citadas de *C. citratus* provenientes do Cuba, foram encontrados: $7,1 \pm 0,4$, $7,2 \pm 0,4$, $7,2 \pm 0,4$, $5,2 \pm 0,4$, $5,2 \pm 0,4$ e $12,2 \pm 0,4$ dias de duração.

Em ambas as plantas, a concentração que gerou o menor valor foi a de 50mg e a concentração que gerou o maior valor foi a de 100 mg. Esses resultados diferem daqueles obtidos no presente estudo, uma vez que a menor concentração dos óleos de *P. aduncum* e *Piper* sp. (25 mg), geraram uma maior duração de dias no estágio larval (tabela 3 e tabela 10).

A maior parte dos resultados obtidos no trabalho de Pinto et al. (2015a; 2015b) diferem daqueles encontrados no presente estudo. Estes autores não justificaram o porquê do óleo essencial testado ter provocado às reações mencionadas. Contudo, a utilização deste óleo, juntamente com o citral, já vem sendo utilizada na literatura para combater outras espécies de dipteros (Yang et al. 2005). Pertencentes à família Poaceae, o *C. citratus* é uma monocotiledônea, e é conhecido como capim, grama ou relva (Raven 2007).

O fato da planta utilizada por estes autores não pertencer à família Piperaceae pode justificar as discrepâncias encontradas entre os resultados de Pinto et al. (2015a; 2015b) e aqueles encontrados no presente estudo. Contudo, esta espécie apresenta o composto cadineno em sua composição, assim como *P. adundum* e PI-02 (tabela 1 e tabela 2). Cadineno se refere a uma série de hidrocarbonetos que ocorrem nas plantas produtoras de óleo essencial. A presença desse composto poderia justificar os resultados semelhantes encontrados.

Este nome é derivado da espécie *Juniperus oxycedrus* L., cuja madeira é capaz de produzir um óleo a partir do qual os isômeros de cadineno foram isolados pela primeira vez. Não existe na literatura associação direta deste composto com a atividade inseticida do óleo. Apesar disso, diferentes trabalhos cujos óleos mostraram atividades inseticidas potenciais apresentaram este componente em sua composição, apesar de pertencer a isômeros diferentes (Lima et al. 2010; Santos et al. 2013).

Lopes et al. (2014) em seus testes com *C. putoria*, dissolveram o extrato de *P. scandens* em água quente até obterem as concentrações 0,25, 0,5 e 0,75 mg do extrato seco por mL. As soluções foram referidas como 25 % (25 mg), 50 % (50 mg) e 75 % (75 mg), obtendo, respectivamente $3,5 \pm 0,5$, $3,4 \pm 0,6$ e $3,3 \pm 0,6$ dias de duração do estágio larval. Comparado com o grupo controle ($3,4 \pm 0,5$ dias), a concentração 25 mg foi a que apresentou o maior valor de dias, enquanto que a concentração 75 mg apresentou o menor valor de dias. Apesar do presente estudo não ter incluído a concentração 75 mg, foi encontrado esse mesmo tipo de reação (menor concentração do óleo ocasionando na maior duração do estágio larval).

A espécie *P. scandens* pertence à família Plumbaginaceae pertencente à ordem Caryophyllales, tratando-se de eudicotiledôneas. Estas apresentam, contudo, a mesma

divisão (Magnoliophyta), de maneira que a semelhança entre os resultados encontrados poderia estar relacionada ao fato de ambas as espécies apresentarem, até certo ponto, aspectos parecidos quimicamente. Lopes et al. (2014) ressaltaram apenas que esta espécie já havia sido reportada na literatura como potencial atividade inseticida (Gala et al. 2012), contudo não justificam os resultados encontrados em suas concentrações.

Carriço et al. (2014) ao testarem *P. sapota* também contra *C. putoria*, pesaram 25 g desta espécie de planta e adicionaram 100 mL de água destilada sobre a mesma. Foram utilizadas as concentrações 5 % (5 mg), 10% (10 mg) e 25 % (mg) para a realização dos testes. Estes autores encontraram para estas concentrações $4,0 \pm 0,2$, $4,1 \pm 0,4$ e $4,1 \pm 0,4$ dias de duração do estágio larval, respectivamente. Comparado com seu grupo controle ($4,8 \pm 0,5$ dias), todas as concentrações testadas reduziram o período desta etapa do desenvolvimento pós-embrionário de *C. putoria*, como se constatou no presente estudo.

A concentração 5 mg foi a que apresentou o menor valor de dias deste período, de maneira que as outras concentrações representaram os maiores valores. Diferente do observado no presente estudo, estas concentrações de *P. sapota* apresentaram uma relação de dose-dependência para este estágio, visto que quanto maior a concentração do óleo essencial aplicado topicamente, maior é a duração de dias do mesmo.

Esta espécie pertence à família Sapotaceae, tratando-se de uma eudicotiledônea. Por fazerem partes de grupos diferentes da família Piperaceae, a discussão a respeito dos motivos pelos quais as espécies de *Piper* geraram os resultados encontrados não pode ser aprofundada. Carriço et al. (2014) atribuem a presença de metabólitos, tais como os flavonoides (Salunke et al. 2005), na composição química do óleo testado a fonte da atividade inseticida, como é discutido também por outros autores (Dayan et al. 2009; Bilal e Hassan 2012). Apesar de não possuírem flavonoides em sua composição (tabela 1 e tabela 2), os óleos testados no presente estudo mostraram potenciais atividades inseticidas.

Mello et al. (2010) dissolveram em água destilada o latex extraído de *E. splendens* var. *hislopii* para testar as concentrações 5, 10, 20 mg/mL contra *M. scalaris*. Estes obtiveram, respectivamente, $4,3 \pm 0,5$, $4,3 \pm 0,5$ e $4,2 \pm 0,4$ dias de duração do estágio larval. Quando comparado ao grupo controle ($4,5 \pm 0,5$ dias), nota-se uma redução na duração deste estágio, assim como foi observado no presente estudo.

Os autores atribuem a essa reação a capacidade de certas plantas de modular o sistema endócrino do inseto, causando alterações (Cabral et al. 2007). Como os testes com

P. aduncum e *Piper* sp. não envolvem nenhuma das concentrações utilizadas por estes autores, a discussão feita em cima dos resultados encontrados pelos mesmos foi apenas generalista.

Gomes et al. (2003) testaram os efeitos deste latex sobre o desenvolvimento de *Peckia (Peckia) chrysostoma* (Diptera: Sarcophagidae), em concentrações diferentes das utilizadas no presente estudo, e observaram uma aceleração do período larval destes dipteros. Por pertencerem a famílias de dipteros muscoides diferentes, assim como o fato de que Gomes et al. (2003) aplicaram sobre a dieta as diferentes concentrações do látex, o inverso do que foi constatado por Mello et al. (2010) e nos resultados obtidos no presente estudo pode ser justificado.

Euphorbiaceae, a família de *E. splendens* var. *hislopii*, também pertence a classe Magnoliopsida. O fato dos resultados obtidos terem sido semelhantes àqueles obtidos para a família Piperaceae precisa ser avaliado. Por estas famílias pertencerem à mesma divisão, sugere-se que haja alguma semelhança na forma como seus compostos químicos reagem sobre os insetos, mesmo que de outra espécie.

Concluiu-se que não houve uma diferença significativa entre o grupo controle puro e a concentração 250mg de *P. aduncum*. O grupo que mais discrepou destes resultados foi o grupo tratado com 50mg deste óleo, obtendo um menor tempo de duração para o estágio larval. Nos testes com PI-02, a concentração 250mg foi a que obteve um maior tempo de desenvolvimento larval, enquanto que a concentração 100 e 50mg obtiveram um menor tempo. Essas interpretações puderam ser feitas através da confirmação da diferença estatística encontrada entre tais valores no Teste de Tukey ($p < 0,01\%$).

5.2.4 Mortalidade do estágio larval

Conhecer a porcentagem de mortalidade que o óleo testado é capaz de provocar na larva destes insetos é fundamental para determinar se o mesmo é um bom biopesticida ou não. Incluir este tipo de informação auxilia a detectar qual seria a reação que o extrato proveniente de determinada planta desencadeia no inseto. Em muitos casos, o óleo testado não mata diretamente a larva, contudo por atuar diretamente sobre seu sistema endócrino, pode impedir a alimentação da mesma, adquirindo assim baixa adequação ao substrato alimentar (Silveira et al. 1997; Lomônaco e Germanos 2001).

Cabral et al. (2007) obtiveram 13 % de mortalidade no grupo controle, 16% no grupo controle com acetona e 21 % no grupo testado com yangambin. Além dessa lignina, outros lignóides foram isolados. Os lignóides são macromoléculas formadas por grupos fenil-propânico que se depositam nas paredes das células vegetais, lhes fornecendo rigidez. Estes se dividem em lignanas (dímeros ou trímeros de unidades C6 - C3 de acoplamento oxidativo de fenóis) e ligninas (polímeros de lignanas que formam uma estrutura rígida) (Dignani 2009).

No estudo realizado por Cabral et al. (2007) pode-se observar claramente a capacidade tóxica da yangambina sobre as larvas de *C. megacephala*. Gonzales-Coloma et al. (1994) já havia constatado que determinadas neolignanas eram capazes de causar uma inibição no crescimento larval de *Spodoptera litura* (Lepidoptera), assim como Miyazawa et al. (1994) também encontraram ao trabalhar com as larvas de *D. melanogaster*. Esses mesmos autores, posteriormente observaram que as lignanas também eram capazes de causar certa toxicidade nas larvas de *D. melanogaster* (Miyazawa et al. 1998).

Cabral et al. (2007) analisaram seus dados com os testes de qui-quadrado e Tukey, com 5 % de significância. No presente estudo, a mortalidade dos testes foi corrigida utilizando a fórmula de Abbot (1925) e analisada também com Tukey ($p < 0,01\%$). Nos testes com *P. aduncum* e PI-02, se obteve 2,9 % de mortalidade no grupo controle, 11,8 % no grupo controle com DMSO, 14,7 % na concentração 25 mg de *P. aduncum* e 7 % na concentração 25 mg de *Piper* sp. (tabela 5 e tabela 12).

Analisando os resultados obtidos no presente estudo, vemos que as concentrações 25 mg de *P. aduncum* e *Piper* sp., assim como ocorre nos testes com o extrato proveniente de *O. duckei*, desencadearam maior mortalidade do que os grupos controle puro e controle com o diluente. Esse resultado mostra que apesar de parte da mortalidade obtida nos grupos tratados estar relacionada com a mortalidade natural encontrada no grupo controle, ou com a mortalidade que o diluente causou, ainda assim, os óleos testados são capazes de provocar uma alteração no estágio larval de *C. megacephala*.

Diversas espécies de planta apresentam ligninas em sua composição, inclusive espécies de Piperaceae. Alguns exemplos de trabalhos em que foram encontradas lignanas em *Piper*, foram os de Baldoqui et al. (2009) que trabalharam com *P. umbellata* e Mullally et al. (2016) que trabalharam com *P. amalago*. A princípio, se suspeitou de que a capacidade larvicida dos óleos de *Piper* pudesse estar relacionada à presença desta substância química.

Entretanto, os testes a respeito da composição química dos óleos não mostraram essa substância na composição de *P. aduncum* e *Piper* sp. (tabela 1 e tabela 2), de maneira que uma possível explicação para a mortalidade encontrada nas concentrações 25 mg destes trabalhos permanece inconclusiva.

No presente estudo, observamos claramente que grande parte da mortalidade encontrada nos grupos com os óleos pode ser atribuída ao DMSO, uma vez que comparado ao grupo controle, este apresentou uma porcentagem bem maior (tabela 5 e tabela 12). Esse resultado também pode ser observado nos testes com yangambin realizados por Cabral et al. (2007). Estes autores encontraram uma porcentagem maior de mortalidade no estágio larval nos grupos tratados com o óleo para *C. megacephala*, daquela encontrada no presente estudo. Porém, encontraram maior mortalidade também no grupo controle puro e no grupo controle com o diluente. Dessa maneira, possivelmente parte da mortalidade larval encontrada por estes autores no grupo testado com yangambin se deve ou à porcentagem de mortalidade natural já encontrada para a colônia de *C. megacephala* utilizada ou à toxicidade da acetona.

Caso fossemos comparar aos resultados obtidos apenas nos grupos que receberam as concentrações 25 mg de *Piper* e de yangambina, vemos que a concentração 25 mg de yangambina pode ser considerada aquela com a melhor atividade larvicida, seguida da concentração 25 mg de *P. aduncum* e da concentração 25 mg de *Piper* sp. Apesar de pertencerem à mesma Super-Ordem (Magnoliales), apresentando, conseqüentemente, algumas características parecidas (que podem causar reações inseticidas parecidas também), *O. duckei* e estas espécies de *Piper* testadas, não pertencem a mesma família, o que dificulta a comparação dos dados obtidos. Se faz necessário, assim, recorrer a trabalhos com espécies pertencentes ao gênero *Piper* para melhor compreender as informações obtidas nos experimentos com *P. aduncum* e *Piper* sp.

Mendonça et al. (2011) também analisaram seus resultados utilizando o programa ANOVA ($P \leq 0,05$) e o teste de Tukey–Kramer com 0,5 % de significância. Esses autores obtiveram aproximadamente 20 % de mortalidade no grupo controle, 5% na concentração 50 mg, 20 % na concentração 100 mg, 30 % na concentração 150 mg, 35 % na concentração 200 mg e 40 % na concentração 300 mg do látex. No presente estudo, se encontrou nos testes de *P. aduncum* e *Piper* sp. para cada uma dessas concentrações, respectivamente, 10,3 % e 25,1 %, 37,5 % e 44,1 %, 30,9 % e 27,2 %, 61,0 % e 33,0 % e 33,0 % e 37,6 % (tabela 5 e tabela 12).

A concentração 25 mg de PI-02 foi a que gerou uma mortalidade larval mais parecida com a concentração 50 mg do látex de *P. amapa* (7,35 %), enquanto que a concentração 50 mg de PI-02 foi a que mais se assemelhou aos resultados encontrados para a concentração 100 mg do látex (25,1 %). A concentração 150mg de *P. aduncum* obteve 30,9 % de mortalidade larval, se assemelhando dos resultados obtidos pela concentração 150 mg também de *P. amapa*, mostrando que possivelmente em alguns óleos essa concentração poderia provocar um grau de mortalidade específico (tabela 5 e tabela 12).

A concentração 100 mg (37,5 %) e 300 mg (33,1 %) de *P. aduncum* e 200 mg (33,1 %) e 300 mg (37,6 %) de PI-02 foram as que se pareceram mais com a concentração 200 mg de *P. amapa* (35 %). A concentração 300 mg do látex gerou 40 % de mortalidade, valor aproximadamente encontrado na concentração 100 mg de *Piper* sp. (44,1 %) (tabela 5 e tabela 12).

Como no grupo controle do presente estudo se encontrou 2,9 % de mortalidade larval, e no grupo controle com DMSO se obteve 11,8 %, as concentrações que obtiveram maior mortalidade deste estágio foram 200 mg da *P. aduncum* e 100 mg na *Piper* sp. A concentração 200 mg de *P. aduncum*, representou, na realidade, a maior mortalidade das sete concentrações testadas, 61 %. Por outro lado, foi a concentração 250 mg de PI-02 que obteve a maior mortalidade para o estágio larval (58,8 %), dentro do seu grupo de concentrações testadas.

Diferente do que foi encontrado por Mendonça et al. (2011), os grupos tratados com as diferentes concentrações dos óleos desencadearam maior mortalidade do que o grupo controle. Das concentrações testadas por estes autores, a de 300 mg foi aquela em que se obteve maior mortalidade larval, diferindo dos resultados obtidos para as espécies de *Piper*.

No trabalho realizado por Mendonça et al. (2011), vemos que o látex extraído de *P. amapa* é capaz de gerar uma reação dose-dependente nos insetos, de maneira que quanto maior é a concentração aplicada topicamente, maior é o índice de mortalidade. Isso faz com que entre os estes óleos citados, seja mais vantajoso usar o extrato proveniente de *P. amapa*. Com ele é possível controlar suas concentrações até se obter uma resposta desejada.

Aqui, não se observou esse tipo de reação. Inclusive, algumas concentrações menores desencadearam uma mortalidade larval mais elevada do que as maiores concentrações. A concentração 100 e 150 mg de *P. aduncum* ilustram esse fato. Enquanto aquela obteve % de mortalidade, esta obteve 30,9 %. Nos testes com *Piper* sp. também se observou essa

discrepância entre as porcentagens, podendo ser exemplificada também com a concentração 100 e 150 mg. Enquanto aquela obteve 44,1 % de mortalidade larval, esta obteve 27,2 % (tabela 5 e tabela 12).

Para melhor compreender este tipo de resposta, precisam ser realizados estudos voltados para quais mecanismos químicos estão envolvidos na reação das larvas a diferentes tipos de concentração. Apesar de pertencerem à classe Magnoliopsidas, *P. aduncum* e *Piper* sp. pertencem a família Piperaceae, enquanto que *P. amapa* pertence a família Apocynaceae. O fato das concentrações testadas terem desencadeado níveis de mortalidade diferentes pode estar relacionado às características químicas específicas das famílias. Por Mendonça et al. (2011) não terem discriminado os compostos químicos presentes em *P. amapa*, se torna mais difícil comparar os testes realizados.

Pinto et al. (2015a; 2015b) utilizaram o teste de análise de variância denominado (ANOVA) ($P < 0,0001$), como no presente estudo, contudo, fizeram uso também do teste de Tukey–Kramer com o nível de significância a 5%. Pinto et al. (2015b) não encontraram diferença significativa entre os espécimes de *C. citratus* proveniente do Brasil e de Cuba.

A mortalidade larval obtida no grupo controle e no grupo com DMSO para as três espécies de moscas permaneceram abaixo dos 20 %. Assim, como nos testes realizados com *P. aduncum* e *Piper* sp. Esses mesmos autores, ao repetirem este experimento com *M. domestica*, utilizando apenas o *C. citratus* proveniente do Brasil, encontraram no grupo controle puro e controle com DMSO uma mortalidade abaixo de 20 %, assim como foi verificado no presente estudo (tabela 5 e tabela 12).

Nos testes feitos por Pinto et al. (2015b), a concentração 5 mg de *C. citratus* proveniente destes dois países, gerou uma mortalidade na faixa dos 30% para as larvas de *C. megacephala*, assim como foi observado para esta mesma concentração nos testes com *C. citratus* proveniente do Brasil para *C. putoria*. A concentração 150 mg de *P. aduncum* foi a que mais se aproximou destes resultados, por ter apresentado 30,9 % de mortalidade larval (tabela 5 e tabela 12).

Nos testes feitos por Pinto et al. (2015b) com *C. citratus* proveniente de Cuba contra *C. putoria*, a faixa de mortalidade larval da concentração 5mg aproximou da faixa dos 40 %. A concentração 100 mg de *Piper* sp. foi a que teve um índice de mortalidade mais parecido com esta concentração (44,2 %). Nos testes com *L. cuprina*, a taxa de mortalidade larval de ambas as plantas se aproximou da faixa dos 60 % na concentração 5 mg. A concentração

200 mg de *P. aduncum* e a concentração 250 mg de *Piper* sp. foram as que mais tiveram resultados semelhantes à concentração 5 mg dos testes com *L. cuprina*, apresentando, respectivamente 61,0 e 59 % (tabela 5 e tabela 12).

Pinto et al. (2015b) ao realizarem testes com *C. citratus* proveniente do Brasil e de Cuba contra *C. megacephala*, obtiveram para a concentração 10 mg uma mortalidade larval de aproximadamente 25 %, assim como foi constatado nos testes com *C. putoria*. As concentrações 50 mg e 150 mg de *Piper* sp. apresentaram 25,1 % e 27,2 %, respectivamente, sendo as que mais se aproximaram dos resultados obtidos por Pinto et al. (2015b). A mortalidade larval encontrada nos testes com *L. cuprina* para a concentração 100 mg atingiu mais de 40 % de mortalidade. Esses resultados se assemelham àqueles obtidos na concentração 250 mg de *P. aduncum* e de *Piper* sp., 56,5 % para ambas (tabela 5 e tabela 12).

Pinto et al. (2015b) encontraram para concentração 25 mg de *C. citratus*, proveniente do Brasil e de Cuba contra *C. megacephala*, uma mortalidade larval na faixa dos 20 %, fazendo com que as concentrações 50 e 150 mg de *Piper* sp. sejam aquelas cujos valores mais se aproximem. Nos testes com *C. putoria* e *L. cuprina*, a porcentagem referente à mortalidade larval permaneceu na faixa dos 30 %, de maneira que a concentração 150 mg de *P. aduncum* foi a que mais se aproximou dos resultados obtidos por estes autores. Esses mesmos autores em seus testes com a espécie *M. domestica*, obtiveram para as concentrações 5, 10 e 25 mg, uma mortalidade na faixa dos 60 %, de maneira que apenas a concentração 200 mg de *P. aduncum* tenha se aproximado deste valor (tabela 5 e tabela 12).

A concentração 50 mg de *C. citratus* proveniente do Brasil e de Cuba contra *C. megacephala* e contra *C. putoria* dos experimentos feitos por Pinto et al. (2015b) provocaram uma mortalidade na faixa dos 30 %, assim como foi visto para a concentração 5 mg. Assim, a concentração 150 mg de *P. aduncum* também foi a que mais se aproximou destes resultados, por ter apresentado 30,9 % de mortalidade larval.

A concentração 50 mg de ambos os óleos nos testes realizados com *L. cuprina* levaram a uma faixa acima dos 40 % de mortalidade larval, resultado semelhante ao encontrado nos testes com *L. cuprina* para a concentração 100 mg. Esses resultados se assemelham também àqueles obtidos na concentração 250 mg de *P. aduncum* e de *Piper* sp. (56,5 %) (tabela 5 e tabela 12).

Pinto et al. (2015b) ao realizarem testes com a concentração 75 mg de *C. citratus* proveniente do Brasil e de Cuba contra *C. megacephala* e contra *C. putoria* encontraram 40 %

de mortalidade larval, exatamente como nos testes com *C. citratus* proveniente de Cuba contra *C. putoria*. A concentração 100 mg de *Piper* sp. também foi a que teve um índice de mortalidade mais parecido com esta concentração (44,12 %). Já nos testes com a concentração 75 mg de *C. citratus* proveniente do Brasil e de Cuba contra *L. cuprina*, o valor se aproximou dos 60 % de mortalidade larval, assim como a sua concentração 5 mg. A concentração 200 mg de *P. aduncum* e a concentração 250 mg de *Piper* sp. novamente foram as que mais tiveram resultados semelhantes à esta concentração (58,82 %) (tabela 5 e tabela 12).

Pinto et al. (2015a) em seus testes com *M. domestica*, encontraram na concentração 50 e 75 mg um percentual de mortalidade larval superior a 60 %, de maneira que apenas a concentração 200 mg de *P. aduncum* conseguiu se aproximar deste valor. A concentração 100 mg de *C. citratus* proveniente do Brasil e de Cuba contra *C. megacephala* e contra *M. domestica* testada por estes autores, ultrapassou a faixa dos 60 % de mortalidade, de maneira que apenas a concentração 200 mg de *P. aduncum* se aproximou deste valor. Nos testes com as demais espécies de moscas, a concentração 100 mg dos dois óleos se manteve na faixa dos 50 %. Assim, a concentração 250 mg de *P. aduncum* por ter atingido 56,5 % de mortalidade larval, foi a que mais se aproximou (tabela 5 e tabela 12).

Pinto et al. (2015b) constataram que de uma forma geral, a espécie *M. domestica* foi aquela que foi mais susceptível aos óleos testados, seguida por *L. cuprina*. Por apresentarem alto grau de dispersão e adaptação era de se esperar que as espécies pertencentes ao gênero *Chrysomya* fossem menos atingidas pela toxicidade dos óleos (Batista-Da-Silva et al. 2010; Baltazar et al. 2011). Contudo, a concentração 100 mg dos testes com *C. citratus* em *C. megacephala* e *M. domestica* foi a que mais resultou em mortalidade larval, mostrando que possivelmente a solução para impactar drasticamente a população larval desta espécie seja fazer uso do extrato bruto.

Como o presente estudo não incluiu o extrato bruto nos testes, a comparação com os resultados obtidos por Pinto et al. (2015a; 2015b) para este grupo foi impossibilitada. De uma forma geral, os óleos obtidos do *C. citratus* mostraram ser mais tóxicos às larvas do que aqueles extraídos de *P. aduncum* e PI-02. Apesar de apresentarem cadineno em sua composição, *C. citratus* e as espécies de *Piper* não pertencem à mesma família, o que poderia justificar a discrepância encontrada entre os resultados.

Lopes et al. (2014) ao trabalharem com *C. putoria*, encontraram 8 % de mortalidade larval no grupo controle e na concentração 75 % de *Plumbago scandens*. A concentração

25 mg deste óleo causou uma mortalidade larval de 21 %, enquanto que a concentração 50 mg obteve 19 %. Segundo os autores, o extrato testado não apresenta atividades larvicidas satisfatórias, contudo não pode ser rejeitado como inseticida natural.

Um bom biopesticida seria aquele capaz de causar danos ao desenvolvimento apenas do inseto-alvo (Cabral et al. 2007; Mendonça et al. 2011; Lopes et al. 2014). Como este extrato já se mostrou eficaz contra as larvas de mosquitos das espécies *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti* (Kishore et al. 2011) o fato de não causar danos a *C. putoria* atribui a ele um bom agente inseticida contra mosquitos.

Apesar de no presente trabalho não ter sido realizados testes com a concentração 75 mg, nenhuma das concentrações testadas se assemelharam aos resultados obtidos no grupo controle, mostrando que os óleos apresentam certo grau de toxicidade a *C. megacephala*. A concentração 25 mg dos testes feitos por Lopes et al. (2014) não obtiveram resultados semelhantes aos do presente estudo.

Das concentrações 50 mg dos óleos de *Piper* testadas, apenas aquela dos experimentos com *Piper* sp. se assemelharam aos 19 % de mortalidade obtidos por estes autores (25,1 %). De uma forma geral, os óleos obtidos de *P. scandens* mostraram ser mais tóxicos às larvas do que aqueles extraídos de *P. aduncum* e PI-02 (tabela 5 e tabela 12).

Apesar de apresentarem a mesma divisão (Magnoliophyta), os óleos testados provêm de espécies de plantas diferentes. Além disso, a composição química descrita por Lopes et al. (2014) não mostra nenhum componente químico em comum às espécies de *Piper* testadas. Por conta disso, o fato dos estudos apresentarem algum grau de similaridade em determinados resultados, permanece inconclusivo.

Cariço et al. (2014) ao testarem de *P. sapota* também contra *C. putoria*, obtiveram 20,5 % de mortalidade no grupo controle e na concentração 25 mg do óleo. A concentração 50 mg de PI-02 foi a que apresentou uma mortalidade larval mais semelhante ao valor encontrado para esta concentração (25,1 %). Esses autores obtiveram também 52,5 % de mortalidade larval na concentração 5 mg e 35 % na concentração 10 mg.

A concentração 250 mg de *P. aduncum* é a que mais se aproxima dos resultados obtidos na concentração 5 mg de *P. sapota* (56,47 %). Em contrapartida, a concentração 200 mg de PI-02 foi a que mais se aproximou dos resultados encontrados na concentração 10 mg desta espécie de planta (33,1 %) (tabela 5 e tabela 12).

Assim como os resultados encontrados no presente estudo, aparentemente esta amostra não provocou dose-dependência no inseto-alvo. Estes autores constataram que *P. sapota* é capaz de causar alterações no desenvolvimento pós-embrionário de *C. putoria*, mas não causa significativa mortalidade larval. Em contrapartida a estes resultados, os testes realizados no presente estudo mostraram que os óleos utilizados são capazes de causar alto índice de mortalidade em *C. megacephala*. O fato do presente trabalho não ter testado esses tipos de concentrações, assim como os óleos testados pertencerem a famílias diferentes, poderia justificar uma discrepância nos resultados encontrados por estes autores.

Mello et al. (2010) ao testaram o latex extraído de *E. splendens* var. *hislopii* contra *M. scalaris*, encontraram 5 % de mortalidade no grupo controle. Este valor foi o que mais se aproximou do constatado no presente trabalho. Esses autores encontraram ainda, 21,5 % de mortalidade para a concentração 5 mg, 12 % para a concentração 10 mg e 7 % para a concentração 20 mg. A concentração 5 mg do látex obteve mortalidade larval similar à obtida na concentração 50 mg dos testes com *Piper* sp. (tabela 5 e tabela 12).

O controle com DMSO feito no presente trabalho obteve 11,8 % de mortalidade, se tornando o grupo que mais se aproximou dos resultados obtidos por Mello et al. (2010), seguido da concentração 25 mg de *P. aduncum* que obteve 14,7 % de mortalidade larval. A concentração 25 mg de PI-02 obteve 7,4 % de mortalidade larval, assim como a concentração 20 mg de *E. splendens* (tabela 5 e tabela 12). O fato dos óleos utilizados pertencerem a plantas da mesma classe (Magnoliopsida) poderia justificar a semelhança entre alguns resultados encontrados.

Gomes et al. (2009) até o presente momento foi o único grupo que trabalhou também com a aplicação direta de óleos obtidos do gênero *Piper* sobre dípteros. Ao trabalharem com *P. marginatum* e *P. purusanum*, estes autores prepararam uma solução padrão (com os respectivos diluentes) em uma concentração de 10 mg/mL e a partir desta as demais concentrações foram diluídas em água destilada. Estes autores usaram a proporção de 5:1, 10:1, 15:1 e 20:1 mg/mL, ou seja, 5, 10, 15 e 20mg, respectivamente. Cada tratamento conteve 10 larvas pertencentes aos últimos instares larvais. Os mesmos não relataram sobre qual temperatura e umidade seus experimentos foram realizados.

Apesar de a metodologia ter sido diferente (borrifaram as amostras sobre as larvas e não aplicaram topicamente), estes autores também observaram alguns resultados semelhantes daqueles obtidos no presente estudo. Gomes et al. (2009) também encontraram em seus testes

com *Piper purusatum* e *Piper marginatum* menor mortalidade nos grupos controle com água destilada e com água destilada mais Tween, respectivamente.

Os testes realizados com diferentes concentrações de *P. purusatum*, por exemplo, mostraram a concentração 50mg como o segundo grupo com menor mortalidade em geral. Estes resultados diferem daqueles encontrados no presente trabalho para *Piper* sp., uma vez que o segundo grupo com menor porcentagem de mortalidade foi 25 mg. Contudo, se assemelham àqueles encontrados nos testes de *P. aduncum*, que encontraram menor mortalidade também na concentração 50 mg.

No primeiro dia de observação nos testes com *P. purusatum*, Gomes et al. (2009) observaram que a mortalidade encontrada na concentração 50 mg permaneceu equivalente àquela encontrada na concentração 100 mg. Esses dados diferem daqueles encontrados no presente trabalho, uma vez que as mortalidades destas duas concentrações não assemelharam entre si em nenhum dos testes.

No segundo e terceiro dia, a concentração 50 mg obteve maior mortalidade do que a concentração 100 mg. Os resultados encontrados nestes dois últimos dias se diferem dos resultados obtidos no presente trabalho, pois tanto *P. aduncum* quanto *Piper* sp. obtiveram menor mortalidade na concentração 50 mg do que a concentração 100 mg. Nesse contexto, apenas os resultados encontrados no quarto dia de experimento de *P. purusatum* refletem os dados obtidos no presente trabalho (50 mg com maior menor mortalidade que 100 mg).

Nos testes com *P. marginatum*, Gomes et al. (2009) encontraram no primeiro e terceiro dia uma maior mortalidade larval para a concentração 50 mg do que para a concentração 100 mg, diferindo dos resultados encontrado no presente estudo, como exposto anteriormente. No segundo e quarto dia, a concentração 50 mg apresentou uma mortalidade larval menor do que a concentração 100 mg, corroborando os resultados obtidos nos testes com *P. aduncum* e *Piper* sp.

Para facilitar uma “discussão geral” deste trabalho, os resultados do último dia obtidos por Gomes et al. (2009) foram aqueles levados em consideração na comparação final. Esses autores obtiveram para cada uma das concentrações citadas, aproximadamente 35 % de mortalidade para a concentração 50 mg, 45 % para a concentração 100 mg e 150 mg e 65 % para a concentração 200 mg nos testes com *P. purusatum*. Os experimentos realizados com *P. marginatum* obtiveram também para estas respectivas concentrações, aproximadamente

50 % de mortalidade larval nas concentrações 50 e 100 mg, 55 % na concentração 150 mg e 65 % na concentração 200 mg.

A concentração 100 mg de *P. aduncum* e 200 mg de PI-02 são as que mais se aproximam dos valores obtidos na concentração 50 mg de *P. purusanum*. A concentração 100 mg de PI-02 apresentou a mortalidade larval mais semelhante a concentração 100 e 150 mg de *P. purusanum* (44,2 %). Pela concentração 200 mg de ter apresentado a mortalidade larval de 61,0 %, os testes feitos no presente estudo, esta foi a que mais se aproximou dos valores de mortalidade obtidos para a concentração 200 mg nos testes com *P. purusanu* (tabela 5 e tabela 12).

Como a concentração 250mg de *P. aduncum* e *Piper* sp. resultaram em 56,5 e 58,8 % de mortalidade larval, respectivamente, estas foram as concentrações cujos valores mais se aproximaram das concentrações 50, 100 e 150 mg. Apesar da concentração 200 mg dos testes com *P. aduncum* terem tido uma porcentagem de mortalidade mais semelhante ao valor encontrado na concentração 200 mg dos testes com *P. marginatum* (61,03 %) (tabela 5 e tabela 12).

O trabalho de Gomes et al. (2009) conteve um teste preliminar com os extratos de *P. purusanum* e *P. marginatum* para verificar quais seriam as concentrações com atividade larvicida. Por conta disso, estes autores descartaram as concentrações menores que 50 mg. Diferente deste trabalho, a proposta dos testes desenvolvidos aqui não foi obter êxito experimental, mas sim, conhecer as reações que os extratos provenientes de *P. aduncum* e de PI-02 provocariam na espécie *C. megacephala*. Essas considerações explicariam a diferença entre os resultados obtidos nos testes com *P. purusanum* (Gomes et al. 2009) e *Piper* sp.

Apesar dos autores não terem justificado os resultados obtidos, ao que tudo indica, este se tratou de um bioensaio de resposta binária, ou seja, os espécimes foram avaliados como “vivos” ou “mortos” (sim ou não). Este tipo de bioensaio tem como premissa a escolha de um produto com base no grau de letalidade deste sobre determinado alvo. Assim, a tendência seria aumentar o número de indivíduos mortos conforme a concentração do produto utilizado aumentasse também (Robertson e Preisler 1992). Por conta disso, os únicos dados do presente trabalho que puderam ser comparados com aqueles levantados por Gomes et al. (2009) envolviam a mortalidade das larvas testadas.

Oliveira et al. (2006) constataram que o óleo essencial extraído de *P. marginatum*, de ocorrência em Pernambuco apresentava monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides, em

sua composição. Este perfil químico é semelhante ao perfil encontrado em outras espécies congêneres de Gomes et al. (2009).

Os sesquiterpenos encontrados em *P. adundum* foram: cadineno, copaeno, cariofileno e germacrenos. O copaeno é um hidrocarboneto comum de se encontrar em plantas produtoras de óleos essenciais. Seu nome é originário da árvore copaíba, *Copaifera langsdorfii*, por ter sido isolada nela pela primeira vez (Kapadia et al. 1933). Diversos óleos essenciais que mostraram atividades inseticidas potenciais apresentaram esta substância em sua composição (Santos et al. 2013; Oliveira et al. 2016).

O cariofileno ocorre na natureza normalmente associado com isocariofileno e com α -humuleno. Essa substância se destaca por apresentar um anel de ciclobutano, constituindo uma composição rara entre os compostos naturais (Ormeño et al. 2008). Essa substância também já foi relatada na literatura como presente em compostos que geraram atividade inseticida contra os insetos (Lima et al. 2010). Os germacrenos constituem uma classe de hidrocarbonetos orgânicos voláteis que apresentam atividades inseticidas naturais (Deguerry et al. 2006; Santos et al. 2013).

O levantamento a respeito da composição química de *P. aduncum* permitiu detectar também o dilapiol. O dilapiol é um composto orgânico do grupo dos fenilpropanoides encontrado em diversas plantas. Esse composto constitui o componente majoritário desta espécie e apresenta, dentre várias características, capacidade antimicrobiana (Figueiredo et al. 2014; Ferreira et al. 2015).

Os sesquiterpenos encontrados em *Piper* sp. foram: cadineno e selinenos. Os selinenos são compostos químicos do tipo isométricos presentes em diversas plantas que apresentam atividades inseticidas em potencial (Attokaran et al. 2011; Santos et al. 2013). Em *Piper* sp. também se encontrou os monoterpenos: terpinenos, ocimenos, terpinoleno. Os terpinenos são um grupo de hidrocarbonetos que se incluem no grupo dos terpenos (Simões et al. 1999). Esses isômeros apresentam atividade inseticida comprovada, sendo amplamente estudados para substituir os compostos químicos utilizados em estudos de controle (Júnior et al. 2003).

Os ocimenos são hidrocarbonetos isométricos que pertencem ao grupo dos monoterpenos. Estes compostos podem ser encontrados numa grande variedade de plantas e frutos (Karl-Georg et al. 2002) e apresentam ricas atividades inseticidas (Santos et al. 2013; Golçanves et al. 2013). O terpinoleno é considerado uma substância altamente volátil. Alguns

trabalhos como o de Karin et al. (2014) e Lima et al. (2014) ressaltam sua importância como inseticida.

O terpineno-4-ol é um terpeno que apresenta grandes atividades antifúngicas e antibactericidas (Hammer et al. 2012). Na literatura existe uma gama de trabalhos com *Melaleuca alternifolia* que relatam a importância deste composto na atividade inseticida desta planta, como o de Hart et al. (2000).

Alguns compostos minoritários foram difíceis de encontrar estudos na literatura que o abrangiam, conseqüentemente, sua categorização química foi prejudicada. De qualquer forma, a grande capacidade biopesticida detectada nos óleos de *P. aduncum* e PI-02 podem estar diretamente relacionadas com essa gama de compostos. Estudos voltados para o isolamento e testes individuais dos mesmos são necessários para melhor compreender o tipo de reação que esses componentes causam nos insetos-alvo.

Todos os trabalhos citados envolviam plantas cujas características particulares variavam daqueles presentes em *P. aduncum* e *Piper* sp. (PI-02) (mesmo a *P. marginatum* e *P. purusanu* trabalhada por Gomes et al. 2009). Além disso, a maioria dos trabalhos não tinham *C. megacephala* como inseto-alvo. Assim, boa parte da discrepância encontrada entre os resultados poderia ser justificada por estas questões.

Até o presente momento, o único trabalho existente na literatura que se aplicou extratos de *P. aduncum* sobre as larvas de alguma espécie de díptero foi o de Leyva et al. (2009). Esses autores testaram diferentes concentrações (de 80 mg/L até 600 mg/L) de óleos essenciais extraídos de *P. racemosa*, *P. aduncum*, *P. auritum* e *Chenopodium ambrosioides* contra *A. aegypti*. Para a realização de seus testes foram separados um grupo controle (contendo 1 mL de etanol para 99 mL de água) e quatro réplicas para cada concentração, estas continham 25 larvas de terceiro instar, totalizando 125 larvas por concentração. O experimento foi realizado na temperatura de 28-30 °C.

Para *P. aduncum* se estabeleceu as concentrações 50, 60, 70 e 80 mg como as prováveis concentrações letais para *A. aegypti*. Foi obtido para cada uma destas concentrações, 25, 53, 91 e 98 % de mortalidade larval, respectivamente. No presente estudo, a concentração 25% também foi a que obteve a menor mortalidade larval, com 10,29%, porém nenhuma das concentrações testadas encontrou um percentual de mortalidade tão alto quanto a concentração 80 mg dos testes de Leyva et al. (2009). A concentração 250 mg foi a que mais

se aproximou dos 53 % obtidos por estes autores na concentração 60 %, uma vez que encontrou 56,47 %.

Apesar do presente estudo não ter trabalhado com a concentração 60, 70 e 80 mg, ainda foi possível observar que esta espécie de planta é capaz de causar maior mortalidade em larvas de *A. aegypti* do que em larvas de *C. megacephala*. O fato da metodologia utilizada por estes autores ter sido diferente daquela empregada neste trabalho, assim como o inseto-alvo, não permitiu uma discussão mais detalhada a cerca dos resultados obtidos. Contudo, da mesma maneira como foi visto no presente trabalho, os estudos de Leyva et al. (2009) apontaram atividades larvicidas promissoras oriundas dos extratos de *P. aduncum*. São necessários pesquisas mais aprofundadas sobre o uso de extratos de *P. aduncum* contra dípteros, uma vez que os organismos estudados apresentaram respostas biológicas distintas.

5.3 Efeito sobre o estágio de pré-pupa

5.3.1 Duração do estágio de pré-pupa do grupo controle e dos grupos tratados com diferentes concentrações dos óleos

Apesar de Fraenkel e Bhaskaran (1973), Cepeda-Palacios e Scholl (2002), Barros-Cordeiro et al. (2010), Barros-Cordeiro et al. (2014) e Nascimento et al. (2014) terem realizados estudos a respeito dos termos e definições relacionados ao desenvolvimento intrapuparial dos dípteros muscoides, existem muitas lacunas a serem preenchidas nessa área. Segundo estes autores, o estágio de pré-pupa trata a respeito do período em que a larva madura encerra sua alimentação e realiza sua imobilização.

Até o presente momento, foi encontrado apenas um artigo na literatura que incluiu em seus resultados, a observação deste estágio após as formas imaturas terem sofrido aplicação de algum óleo. Contudo, estes autores levaram em consideração apenas a viabilidade deste estágio e o seu peso, enquanto que no presente trabalho foi levada em consideração a duração deste estágio. Assim, os resultados obtidos pelos autores foram apenas mencionados.

No presente trabalho, os testes realizados com os óleos de *Piper* obtiveram no grupo controle uma média de $1,2 \pm 0,4$ dias, enquanto que no grupo controle DMSO durou $1,1 \pm 0,3$ dias. Nos experimentos realizados *P. aduncum*, a concentração 50, 200, 250 e 350 mg obtiveram a média de $1,0 \pm 0,0$ dias, equivalendo aos menores valores encontrados

para esta etapa. Os maiores valores obtidos foram àqueles registrados para os testes das concentrações 25, 100 e 300 mg ($1,1 \pm 0,2$ dias) (tabela 3).

Nos testes realizados com *Piper* sp., a concentração 25, 100, 150, 200, 250 e 350 mg obtiveram a média de 1,0 dias, com desvio padrão de 0,0, 0,3, 0,3, 0,4, 0,2 e 0,0 dias, respectivamente, equivalendo aos menores valores encontrados para esta etapa. O maior valor obtido foi aquele registrado para os testes da concentração 50 mg ($1,1 \pm 0,5$ dias) (tabela 10).

Silva et al. (2010) testaram diferentes concentrações do extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* sobre *C. macellaria*. Esses autores utilizaram as concentrações 20, 40 e 60 mg/mL, estas foram obtidas a partir de uma solução estoque de 100 mg/mL. O solvente utilizado para a solubilização o (DMSO) e água destilada na proporção de 1:4.

Este bioensaio foi conduzido em câmara climatizada, regulada a 30 °C e 12 horas de fotofase. Os autores não relataram a umidade utilizada. Como estímulo para a realização de posturas foi fornecida carne bovina putrefata aos adultos. Após o abandono das pré-pupas da dieta, estas foram pesadas e separadas em quatro repetições por concentração, contendo 20 pré-pupas em cada. As pré-pupas foram imersas nas respectivas concentrações, assim como na água destilada e no DMSO, constituindo os grupos controle.

Em seguida estas foram colocadas em tubos de ensaios (18 x 150 mm) em grupos de duas pré-pupas por tubo. Os autores observaram os tubos no intervalo de oito horas por dez dias consecutivos, com o intuito de verificar sua viabilidade. Neste experimento os autores utilizaram 80 pré-pupas, totalizando 240 pré-pupas.

Silva et al. (2010) encontraram 87,5 % na concentração 20 mg e 83,75 % tanto na concentração 40 mg, quanto na concentração 60 mg. Com relação ao peso desta forma imatura, os autores encontraram para estas mesmas concentrações 3,0, 2,9 e 2,6 mg, respectivamente. Comparadas aos 93,8 % de viabilidade e 2,7 mg obtidos para este estágio no grupo controle, podemos observar que apesar do peso das pré-pupas terem se mantido semelhantes aos do grupo controle, sua viabilidade foi diretamente afetada pelo óleo ministrado.

Os valores encontrados nos testes realizados no presente estudo mostram que a duração deste estágio influencia diretamente na contagem geral de dias que o ciclo de vida deste inseto possui, assim como o tempo em que ele passa em cada um destes estágios. Acrescentar este tipo de informação poderia solucionar uma série de dúvidas a respeito de qual seria a etapa do desenvolvimento pós-embrionário das moscas mais afetada pelo óleo e

porquê. Também é importante incluir a viabilidade e o peso das pré-pupas após a aplicação do extrato, por auxiliar na escolha do que seria um bom biopesticida.

Por mais que os termos e definições relacionados ao desenvolvimento intrapuparial dos dípteros muscoides tenham sido amplamente discutidos por Fraenkel e Bhaskaran (1973) e Cepeda-Palacios e Scholl (2002) e revisados por Pujol-Luz e Barros-Cordeiro et al. (2010), Barros-Cordeiro et al. (2014) e Nascimento et al. (2014), alguns autores ainda encontram dificuldade na caracterização desta etapa. Silva et al. (2010) não deixaram claro quais foram os critérios que utilizaram para caracterizar a etapa de pré-pupa, o que gera dúvidas a respeito de qual etapa do desenvolvimento os mesmos estavam se referindo.

Nos testes com *P. aduncum*, a concentração 50, 150, 200 e 250mg deste óleo foram as que geraram um menor tempo de duração do estágio de pré-pupa quando comparadas ao grupo controle. Nos testes com PI-02, apenas a concentração 25mg e 300mg que mais discrepam dos resultados encontrados no grupo controle, também reduzindo o tempo de duração deste estágio. Essa análise pode ser feita através da comprovação de uma diferença estatística dada pelo Teste de Tukey ($p < 0,01\%$).

5.4 Efeitos sobre o estágio pupal

5.4.1 Duração do estágio pupal dos grupos controle

Como foi citado anteriormente, diversos fatores estão envolvidos na duração do ciclo de vida dos dípteros muscoides, tais como temperatura e dieta (Kamal 1958; Minkenberg e Helderman 1990). Assim, alguns artigos na literatura voltados para o estudo do ciclo de vida deste grupo de inseto, podem apresentar resultados diferentes daqueles encontrados no presente estudo, seja por apresentar uma metodologia diferente, ou por conta da complexidade que envolve mensurar a duração destas etapas.

No tópico 5.2 deste trabalho (resultados encontrados no período larval), foram citados diversos artigos cujos autores obtiveram durações diferentes para o período larval daquelas encontradas no presente estudo e nos artigos de controle de dípteros muscoides levantados. Esses artigos foram citados para exemplificar que o tempo de duração do período dos dípteros muscoides não apresenta um valor fixo definido, assim como ocorre em outras etapas de seu desenvolvimento.

Por conta disso, não se faz necessário comparar os resultados do período pupal e de neo-larva a adulto do grupo controle do presente estudo com todos os trabalhos existentes sobre isso na literatura. Assim, as informações disponíveis nos trabalhos de controle biológico que utilizaram moscas como inseto-alvo foram as únicas levadas em consideração.

Aferir a duração do estágio pupal dos insetos, após suas larvas terem sido submetidas à aplicação de diferentes extratos de plantas, é crucial para determinar quais as espécies de planta e concentrações testadas que geraram um efeito pupicida significativo. Por mais que algumas larvas não tenham conseguido se alimentar o suficiente, muitas conseguem empupar. Contudo, podem não conseguir passar pelo processo de empupação corretamente (Roper et al. 1996), não emergindo, em alguns casos.

Como já foi mencionado, alguns compostos de plantas são capazes de causar alterações nos sistemas neuroendócrinos do inseto, dificultando seu desenvolvimento (Cabral et al. 2007a; Carriço et al. 2014). A maioria destas substâncias atuam retardando ou acelerando a duração do estágio pupal destes organismos (Cabral et al. 2007a).

A duração média obtida no período pupal dos testes com *P. aduncum* e *Piper* sp. (PI-02) foi de $5,0 \pm 0,8$ dias no grupo controle. Cabral et al. (2007) obtiveram $4,4 \pm 0,6$ dias no grupo controle, enquanto Mendonça et al. (2011) obtiveram aproximadamente 5,5 dias de duração. Pinto et al. (2015b) encontraram $5,2 \pm 0,4$ dias de duração deste estágio no grupo controle.

Os valores encontrados para o grupo controle do presente estudo se aproximam mais daqueles obtidos por Pinto et al. (2015b). Contudo, a faixa de valores possíveis para essa etapa (de acordo com o desvio padrão encontrado pelos autores em seus experimentos) ainda prevê os resultados obtidos por Cabral et al. (2007), mostrando uma margem relativamente padrão de duração deste estágio para a 27 °C. Como Mendonça et al. (2011) não indicou o desvio padrão para a duração desta etapa, não foi possível comparar os resultados obtidos no presente estudo com o destes autores.

Lopes et al. (2014) ao avaliarem os efeitos dos extratos provenientes de *P. scandens* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *C. putoria* observaram uma duração de $4,0 \pm 0,2$ dias deste estágio no grupo controle. Ao trabalharem com esta mesma espécie e condições de temperatura e umidade, Carriço et al. (2014) obtiveram uma média de $3,3 \pm 0,5$ dias no grupo controle, enquanto Pinto et al. (2015b) obtiveram uma média de $4,3 \pm 0,5$ dias.

Pinto et al. (2015b) obtiveram uma média de $4,7 \pm 0,6$ dias no grupo controle, ao trabalharem com *L. cuprina* e $5,4 \pm 0,5$ dias de duração no grupo controle em seus estudos com *M. domestica*. Mello et al. (2010) encontraram $8,9 \pm 0,8$ dias de duração do período larval de *M. scalaris*.

A duração média obtida no período larval dos testes com *P. aduncum* e *Piper* sp. (PI-02) no grupo controle com DMSO foi $4,4 \pm 1,2$ dias. A variação de 0,7 dias entre os dois grupos mostra que este diluente supostamente aceleraria o desenvolvimento intrapuparial de *C. megacephala*.

Os resultados encontrados no presente trabalho se assemelham daqueles obtidos por Cabral et al. (2007). Estes autores encontraram $4,3 \pm 1,2$ dias no grupo controle com acetona. A diferença de 0,04 dias entre ambos os grupos mostra também um desenvolvimento larval mais rápido no grupo com o diluente.

Os trabalhos realizados por Pinto et al. (2015a, 2015b) também apontam essa possível reação. Em seus testes com *C. megacephala* e *C. putoria*, estes autores encontraram $5,18 \pm 0,5$ e $4,30 \pm 0,46$ dias, respectivamente, no grupo controle com DMSO. Os experimentos destes autores com espécies pertencentes a outro gênero também mostram esse tipo de resposta.

Os testes feitos por eles com *L. cuprina* apresentaram uma média de $4,7 \pm 0,6$ dias no grupo controle com DMSO, enquanto que os experimentos com *M. domestica* apresentaram, para este grupo, uma média de $5,3 \pm 0,5$ dias de duração no grupo controle, com DMSO e $4,9 \pm 0,3$ no grupo controle com citral.

Como mencionado anteriormente, nestes artigos, os autores não justificam os possíveis motivos para estas alterações no ciclo do inseto ocorrerem. Contudo, por se tratarem de compostos químicos não-naturais ao inseto, é plausível supor que o simples contato com estes diluentes poderia causar alterações em seus sistemas. Os demais autores não fizeram uso de teste com diluente, de maneira que estes resultados não puderam ser comparados com outros, se não com os artigos citados.

5.4.2 Duração do estágio pupal dos grupos tratados com diferentes concentrações dos óleos

As lignanas e neolignanas são compostos capazes de causar alterações no desenvolvimento de várias espécies de insetos (Harmatha e Dinan 2003). Cabral et al. (2007) ao estudarem a atividade da lignana yangambin em *C. megacephala* obtiveram $5,5 \pm 0,9$ dias

de duração no estágio pupal na concentração 25 mg de deste óleo. Esses resultados se assemelham àqueles obtidos na concentração 150 mg de *P. aduncum* ($5,2 \pm 0,6$ dias) e 250 mg de *Piper* sp. ($5,2 \pm 0,8$ dias) do presente estudo.

Na concentração 25 mg de *P. aduncum* se obteve uma média de $5,9 \pm 1,1$ dias de duração deste estágio, enquanto que esta mesma concentração dos testes com PI-02 proporcionou $4,0 \pm 0,8$ dias de duração. Comparado ao grupo controle ($5,0 \pm 0,8$ dias) e grupo controle com DMSO ($4,4 \pm 1,2$ dias) do presente estudo, podemos observar que a concentração 25 mg de *P. aduncum* foi capaz de retardar o desenvolvimento da pupa de *C. megacephala*, enquanto que a concentração 25 mg de *Piper* sp., acelerou o processo. A concentração 25 mg de *P. aduncum* foi a que mais se aproximou dos resultados obtidos por Cabral et al. (2007).

Mendonça et al. (2011) obtiveram aproximadamente 5,5 dias de duração na concentração 50 mg, 5,0 dias na concentração 100 mg, 5,7 dias na concentração 150 mg, 6,0 dias na concentração 200 mg e 5,8 na concentração 300 mg de *P. amapa*. No presente estudo, a concentração 50 mg de *P. aduncum* obteve $4,2 \pm 0,5$ dias de duração, enquanto que a de *Piper* sp. obteve $3,7 \pm 0,4$ dias. Esses resultados mostram que a concentração 50 mg do óleo de *Piper* sp. consegue retardar mais o desenvolvimento pupal de *C. megacephala* do que esta mesma concentração de *P. aduncum*. A concentração 150 mg de *P. aduncum* e a concentração 250 mg de *Piper* sp. são as que mais se aproximam dos valores obtidos por estes autores ($5,2 \pm 0,6$ e $5,2 \pm 0,8$ dias, respectivamente).

O resultado obtido no grupo controle do presente estudo foi o que mais se aproximou dos valores encontrados por Mendonça et al. (2011) na concentração 100 mg. A concentração 25 mg de *P. aduncum* obteve $5,9 \pm 1,1$ dias de duração para o estágio pupal, se assemelhando aos resultados encontrados por Mendonça et al. (2011) na concentração 150 e 300 mg. A concentração 100 mg de *Piper* sp. obteve $6,1 \pm 0,4$ dias de duração para este estágio, sendo aquela que mais se aproximou aos resultados obtidos por estes autores para a concentração 200 mg.

Os óleos essenciais de *Piper* testados mostraram a mesma atividade do látex extraído de *P. amapa*, porém sobre concentrações menores. Mendonça et al. (2007) constataram que a concentração 200 mg era aquela que mais estendia o estágio pupal da mosca varejeira. Neste trabalho esta concentração foi aquela que desencadeou um período pupal menor, quando comparado às demais.

Pinto et al. (2015b) encontraram para as concentrações 5, 10, 25, 50, 75 e 100 mg (ao óleo essencial puro) de *C. citratus* provenientes do Brasil, respectivamente, $6,1 \pm 0,2$, $6,0 \pm 0,3$, $6,2 \pm 0,6$, $5,7 \pm 0,8$, $5,7 \pm 0,4$ e $6,1 \pm 0,3$ dias de duração no estágio pupal para *C. megacephala*. Nos testes realizados com *C. citratus* provenientes de Cuba, nesta mesma espécie de mosca, obteve-se para estas mesmas concentrações: $6,1 \pm 0,3$, $6,1 \pm 0,4$, $6,2 \pm 0,6$, $5,8 \pm 0,8$, $5,8 \pm 0,3$ e $6,1 \pm 0,3$ dias para o estágio pupal. Os resultados encontrados por estes autores na concentração 5, 10, 25 e 100 mg se aproximam daqueles obtidos na concentração 100 mg de *Piper* sp. ($6,1 \pm 0,4$ dias). Enquanto que a concentração 50 e 75 mg testadas por estes autores obtiveram resultados semelhantes ao encontrado na concentração 25 mg de *P. aduncum* ($5,9 \pm 1,1$ dias).

Esses autores, ao testarem *C. citratus* provenientes do Brasil contra *C. putoria*, encontraram para estas concentrações, $4,6 \pm 0,5$, $4,5 \pm 0,5$, $4,2 \pm 0,4$, $4,5 \pm 0,6$, $4,9 \pm 0,4$, $4,5 \pm 0,5$ dias de duração para o estágio pupal, respectivamente. Em seus testes com *C. citratus* provenientes de Cuba para esta mesma espécie de díptero encontraram: $4,7 \pm 0,5$, $4,5 \pm 0,5$, $4,2 \pm 0,4$, $4,5 \pm 0,7$, $4,9 \pm 0,3$ e $4,5 \pm 0,5$ dias de duração no estágio pupal. Os resultados obtidos para *C. citratus*, de ambos os países, na concentração 5, 10, 50 e 100 mg se aproximam daqueles encontrados no grupo DMSO ($4,4 \pm 1,2$ dias) e na concentração 300 mg de *Piper* sp. ($4,4 \pm 0,6$ dias). Os resultados obtidos por Pinto et al. (2015b) para a concentração 75 mg se aproximam daqueles encontrados na concentração 50 mg de *P. aduncum* ($4,2 \pm 0,5$ dias).

Pinto et al. (2015b) ao testarem *C. citratus* provenientes do Brasil contra *L. cuprina*, encontraram para estas concentrações, $8,6 \pm 0,8$, $10,1 \pm 0,9$, $9,8 \pm 1,0$, $9,7 \pm 0,9$, $8,4 \pm 0,9$, $9,8 \pm 0,8$ dias de duração para o estágio pupal, respectivamente. Em seus testes com *C. citratus* provenientes de Cuba para esta mesma espécie de díptero encontraram: $8,7 \pm 0,9$, $10,1 \pm 0,8$, $9,9 \pm 0,9$, $9,8 \pm 0,9$, $8,4 \pm 0,9$ e $9,7 \pm 0,9$ dias de duração no estágio pupal. Os resultados obtidos para *C. citratus*, de ambos os países não se aproximaram de nenhum valor obtido no presente estudo, por terem apresentado um tempo de desenvolvimento pupal mais longo.

Pinto et al. (2015a) ao testarem *C. citratus* provenientes do Brasil contra *M. domestica*, encontraram para estas concentrações, $7,1 \pm 0,34$, $7,1 \pm 0,3$, $7,2 \pm 0,4$, $7,1 \pm 0,3$, $7,2 \pm 0,4$ e $7,2 \pm 0,4$ dias de duração para o estágio pupal, respectivamente. Em seus testes com *C. citratus* provenientes de Cuba para esta mesma espécie de díptero encontraram: $7,12 \pm 0,32$, $7,1 \pm 0,3$, $7,1 \pm 0,3$, $7,1 \pm 0,3$, $7,2 \pm 0,4$ e $7,2 \pm 0,4$ dias de duração

no estágio pupal. Os resultados obtidos para *C. citratus*, de ambos os países não se aproximaram de nenhum valor obtido no presente estudo, por terem apresentado um tempo de desenvolvimento pupal mais longo.

Como mencionado anteriormente, apesar dos resultados encontrados por estes autores não terem mostraram diferença entre os extratos provenientes do Brasil e os extratos provenientes de Cuba, a espécie de planta utilizada mostrou grandes potenciais inseticidas. A espécie *L. cuprina* e *M. domestica* mostram ser mais susceptíveis aos óleos do que aquelas pertencentes ao gênero *Chrysomya*. No geral, as concentrações de *C. citratus* que apresentaram a mesma resposta do que as concentrações de *P. aduncum* e *Piper* sp. foram menores.

Em seus testes com *C. putoria*, Lopes et al. (2014) encontraram $3,7 \pm 0,5$, $3,8 \pm 0,5$ e $3,9 \pm 0,8$ dias de duração para o estágio pupal na concentração 25 mg, 50 e 75 mg de *P. scandens*. Esses valores se aproximam daqueles encontrados nos testes com *Piper* sp. na concentração 50 mg ($3,7 \pm 0,4$ dias). Estes autores afirmaram que o óleo testado não apresentou alta toxicidade contra *C. putoria*, mas foi capaz de causar pequenas alterações em seu ciclo de vida. Essa característica faz do extrato testado um bom biopesticida, uma vez que basta uma alteração em algum dos estágios para todo o ciclo de vida do inseto ficar comprometido (Lopes et al. 2014).

Carriço et al. (2014) ao realizarem testes com esta mesma espécie de *Chrysomya*, encontraram $4,0 \pm 0,2$, $4,4 \pm 0,4$ e $4,4 \pm 0,4$ dias de duração do período larval nas concentrações 5, 10 e 25 mg de *P. sapota*. Esses resultados se assemelham, respectivamente, àqueles obtidos na concentração 25mg de *Piper* sp. do presente estudo ($4,0 \pm 0,8$ dias) e no grupo controle com DMSO ($4,4 \pm 1,2$ dias). Os óleos de *Piper* e de *P. Sapota* parecem ser capazes de causar grandes alterações no desenvolvimento pós-embrionário de dipteros muscoides. Contudo, podemos observar que a espécie *C. putoria* parece ter uma tendência maior a sofrer retardamento em seu desenvolvimento pós-embrionário do que *C. megacephala*.

Mello et al. (2010) ao trabalharem com a concentração 5, 10 e 25 mg de *E. splendens* contra *M. scalaris* encontraram, respectivamente, $8,2 \pm 0,4$, $8,2 \pm 0,4$ e $8,2 \pm 0,4$ dias de duração do estágio pupal. Nenhum resultado encontrado no presente estudo se assemelhou aos valores encontrados por estes autores. Essa discrepância nos valores pode ser justificada pelo fato das espécies de dipteros testadas pertencerem a famílias diferentes. Esses autores não

observaram diferenças significativas entre as concentrações testadas, apesar de em todas as concentrações, a duração do estágio pupal desse díptero ter sido mais lento.

Esses resultados diferem daqueles observados no presente estudo. Algumas concentrações, como 200 mg de *P. aduncum*, obtiveram um período pupal menor quando comparado ao grupo controle ($2,7 \pm 1,3$ dias), enquanto outras obtiveram um período pupal maior, tais como a concentração 100 mg de *P. aduncum* ($6,4 \pm 0,8$ dias).

Como Gomes et al. (2009) avaliaram apenas a mortalidade larval das moscas das frutas, estes não obtiveram resultados quanto a seus demais estágios. Não foi possível, assim, comparar seus resultados com aqueles obtidos no presente estudo.

Nos experimentos feitos com ambos os óleos, a concentração 100 mg foi a que obteve um maior tempo de duração, enquanto que a concentração 200 mg foi a que obteve um menor tempo de duração. Essa diferença significativamente estatística pode ser realizada através dos resultados obtidos no Teste de Tukey ($p < 0,01\%$).

Para melhor compreender as formas de atuação destes óleos, é necessário realizar mais estudos sobre suas bioatividades. Conhecer detalhadamente as propriedades químicas dos mesmos, bem como a capacidade que cada uma delas possui em gerar alguma atividade inseticida, é primordial para interpretar melhor os resultados obtidos.

5.4.3 Mortalidade no estágio pupal

Conhecer a porcentagem de mortalidade que o óleo testado é capaz de provocar na pupa destes insetos é essencial para determinar a capacidade biopesticida do mesmo. Incluir este tipo de informação auxilia a detectar qual o efeito que aquele extrato causa no inseto: larvicida, pupicida ou inseticida. Em muitos casos, o óleo testado não mata diretamente a larva, contudo pode atuar diretamente sobre seu sistema endócrino de maneira que seu processo de empupação é prejudicado.

Cabral et al. (2007) obtiveram 18 % de mortalidade no grupo controle, 16 % no grupo controle com acetona e 21 % no grupo testado com yangambin. No trabalho destes autores pode-se observar claramente a capacidade tóxica de yangambin sobre as pupas de *C. megacephala*. Assim como a concentração 25 de *P. aduncum* teve (13,5 % de mortalidade pupal), quando comparado ao grupo controle (9,56 % de mortalidade pupal) (tabela 5 e tabela 12).

Nos testes com PI-02, se obteve 8,34 % de mortalidade no grupo controle com DMSO, mostrando que este diluente não foi tão tóxico para as pupas como foi para as larvas. O índice de mortalidade pupal do grupo controle de *C. megacephala* se mostrou naturalmente alto. Por algum motivo, a concentração 25 mg de PI-02 mostrou não causar mortalidade pupal elevada, uma vez que resultou em apenas 3,97 % de mortalidade. Os motivos pelos quais esta amostra facilitou o desenvolvimento das pupas desta espécie precisa ser investigado (tabela 5 e tabela 12).

Analisando os resultados obtidos no presente estudo, vemos que a concentração 25 mg de *P. aduncum* e de yangambina, desencadearam maior mortalidade do que os grupos controle puro e controle com o diluente. Esse resultado mostra que apesar de parte da mortalidade obtida nos grupos tratados estar relacionada com a mortalidade natural encontrada no grupo controle, ou com a mortalidade que o diluente causou, ainda assim, os óleos testados são capazes de provocar uma alteração no estágio pupal de *C. megacephala*.

Caso fossemos comparar os resultados obtidos apenas nos grupos que receberam as concentrações 25 mg de *Piper* e de yangambina, vemos que a concentração 25 mg de yangambin pode ser considerada aquela com a melhor atividade pupicida, seguida da concentração 25 mg de *P. aduncum* e da concentração 25 mg de *Piper* sp.

Como diversas espécies de plantas que apresentam atividade inseticida apresentam ligninas em sua composição, inclusive espécies de Piperaceae (Baldoqui et al. 2009; Mullally et al. 2016), se suspeitou, a princípio de que a capacidade pupicida dos óleos de *Piper* pudesse estar relacionada à presença desta substância química. Entretanto, os testes a respeito da composição química dos óleos não mostraram essa substância na composição de *P. aduncum* e *Piper* sp. (tabela 1 e tabela 2), de maneira que a explicação para a mortalidade permanece inconclusiva.

Mendonça et al. (2011) obtiveram aproximadamente 15 % de mortalidade no grupo controle e nas concentrações 50 e 300 mg, 10 % na concentração 100 mg e 150mg e quase 100 % de mortalidade pupal na concentração 200 mg do látex. Extraído de *P. amapa*. No presente estudo, se encontrou nos testes de *P. aduncum* e *Piper* sp. para cada uma dessas repetições, respectivamente, 27,56 e 9,08 %, 8,88 e 5,25 %, 3,67 e 18,45 %, 30,01 e 30,59 % e 7,59 e 8,89 % (tabela 5 e tabela 12).

A concentração 25 mg de *P. aduncum* foi a que obteve uma mortalidade pupal mais parecida com o grupo controle e com as concentrações 50 e 300 mg do látex (13,5 %). A

concentração 250 mg de *P. aduncum* foi a que mais se assemelhou aos resultados encontrados para a concentração 100 mg do látex (9,88 %) (tabela 5 e tabela 12). Nenhuma concentração levantada no presente estudo atingiu uma porcentagem de mortalidade pupal tão alta quanto à concentração 200 mg do látex.

Como no grupo controle do presente estudo se encontrou 9,56 % de mortalidade pupal, e no grupo controle com DMSO se obteve 8,34 %, as concentrações que obtiveram maior mortalidade deste estágio foram 200 mg da *P. aduncum* (30,01 %) e 200 mg da *Piper* sp. (30,59 %).

Diferente do que foi encontrado por Mendonça et al. (2011), os grupos tratados com as diferentes concentrações dos óleos desencadearam maior mortalidade do que o grupo controle. Das concentrações testadas por estes autores, a 200 mg foi aquela em que se obteve maior mortalidade pupal, semelhante os resultados obtidos para as espécies de *Piper*.

No trabalho realizado por Mendonça et al. (2011), não vemos uma reação dose-dependente nos insetos por conta do látex. Assim como não se pode detectar isso no presente estudo. Assim como aconteceu na mortalidade larval, algumas concentrações menores desencadearam maior mortalidade pupal do que as maiores concentrações. A concentração 50 e 100 mg de *P. aduncum* ilustra essa questão. Enquanto aquela obteve 27,56 % de mortalidade, esta obteve 8,88 %. Nos testes com *Piper* sp. também se observou essa discrepância entre as porcentagens, podendo ser exemplificada também com a concentração 50 e 100 mg. Enquanto aquela obteve 9,08 % de mortalidade pupal, esta obteve 5,25 % (tabela 5 e tabela 12).

Como comentado anteriormente, para melhor compreender este tipo de resposta, estudos voltados para quais mecanismos químicos estão envolvidos na reação das larvas a diferentes tipos de concentração precisam ser realizados. Conhecer como as larvas respondem ao contato dos óleos ministrados poderia esclarecer as reações que as mesmas desencadearam durante o processo de pupariação.

O fato das concentrações testadas terem desencadeado níveis de mortalidade diferente pode estar relacionado às características químicas específicas das famílias, uma vez que as plantas citadas pertencem a famílias diferentes. Por Mendonça et al. (2011) não terem levantado os compostos químicos presentes em *P. amapa*, se torna mais difícil ainda comparar os testes realizados.

Pinto et al. (2015a; 2015b) encontraram para as quatro espécies de mosca trabalhada uma mortalidade pupal abaixo dos 20 % no grupo controle puro e no grupo controle com DMSO. Assim, como nos testes realizados com *P. aduncum* e *Piper* sp. (tabela 5 e tabela 12). Nos testes feitos por Pinto et al. (2015b), a concentração 5 e 25 mg de *C. citratus* proveniente destes dois países (Brasil e Cuba), geraram uma mortalidade abaixo dos 20 % para as pupas de *C. megacephala*. A concentração 10 mg de *C. citratus* proveniente destes dois países obtiveram uma mortalidade na faixa dos 20%, enquanto que as concentrações 50, 75 e 100 mg ultrapassaram essa faixa.

Nos testes com *C. citratus* proveniente do Brasil e de Cuba para *C. putoria*, além destas duas concentrações citadas, as concentrações 10, 50 e 100 mg também se mantiveram com uma mortalidade pupal abaixo dos 20 %. Nos testes com *L. cuprina* a concentração 5 e 75 mg também se mantiveram abaixo dos 20 % de mortalidade pupal. Pinto et al. (2015a) em seus testes com *M. domestica*, encontraram para todas as concentrações um percentual de mortalidade pupal inferior a 20 %. A concentração 150 mg de *Piper* sp. foi a que mais se aproximou destes resultados, por ter apresentado 18,45 % de mortalidade pupal (tabela 5 e tabela 12).

Nos testes feitos por Pinto et al. (2015b) com *C. citratus* proveniente destes dois países contra *C. putoria* e *L. cuprina*, a mortalidade larval da concentração 75 e 50 mg, respectivamente, ultrapassou um pouco a faixa dos 20 %, de maneira que a concentração 250 mg de *Piper* sp. foi a que teve um índice de mortalidade mais parecido com esta concentração (24,02 %).

Nos testes com *L. cuprina* para ambos os óleos, a concentração 10 mg atingiu uma taxa de aproximadamente 30 % de mortalidade, de maneira que a concentração 200 de *P. aduncum* e 200 mg de *Piper* sp. tenham se aproximado mais destes valores (30,01 % e 30,59 %, respectivamente). Ainda no teste com esta espécie, a concentração 25 e 100 mg, de ambos os óleos, apresentaram uma taxa de mortalidade maior que 40 %, de maneira que nenhum resultado encontrado no presente estudo tenha se assemelhado (tabela 5 e tabela 12).

Pinto et al. (2015b) constataram que de uma forma geral, a espécie *M. domestica* foi aquela menos susceptível aos óleos testados, seguida por *C. putoria*. A concentração 100 mg dos testes com *C. citratus* em todas as espécies de moscas testadas foram uma das que mais desencadeou mortalidade pupal, mostrando que possivelmente a solução para impactar drasticamente a população larval desta espécie seja fazer uso do extrato bruto.

Como o presente estudo não incluiu o extrato bruto nos testes, a comparação com os resultados obtidos por Pinto et al. (2015a; 2015b) para este grupo foi impossibilitada. De uma forma geral, os óleos obtidos do *C. citratus* mostraram ser tão tóxicos às pupas quanto aqueles extraídos de *P. aduncum* e PI-02. Possivelmente por apresentarem substâncias similares em sua composição, tais como o cadineno em sua composição.

Lopes et al. (2014) ao trabalharem com *C. putoria*, encontraram 6 % de mortalidade pupal no grupo controle. Nas concentrações 25 e 50 mg a mortalidade pupal foi de aproximadamente 10 %, enquanto que na concentração 75 mg essa porcentagem quase chegou a 100 %.

No presente trabalho não foi realizado teste com a concentração 75 mg. Os grupos controles dos experimentos com *P. aduncum* e *Piper* sp. apresentaram uma mortalidade pupal bem maior do que o grupo controle do trabalho de Lopes et al. (2014). Isto poderia indicar que a espécie *C. putoria* apresenta uma mortalidade pupal natural inferior a *C. megacephala*.

A concentração 25 mg dos testes feitos com *P. aduncum* foi a que mais se aproximou dos 10 % obtidos por Lopes et al, (2014) para esta mesma concentração e para a concentração 50 mg (13,5 %). Não houve concentração cuja mortalidade pupal se aproximasse dos 100 %. De uma forma geral, os óleos obtidos de *P. scandens* mostraram ser mais tóxicos às pupas do que aqueles extraídos de *P. aduncum* e PI-02 (tabela 5 e tabela 12), uma vez que a concentração 75 mg quase impossibilitou todas as pupas de emergirem.

Contudo, muitas concentrações dos óleos de *Piper* testados mostraram efeitos pupicidas satisfatórios. Uma concentração capaz de eliminar as pupas de uma população de insetos não é tida como um bom biopesticida, uma vez que poderia causar a extinção dos mesmos e gerar um desequilíbrio ecológico (Lopes et al. 2014).

Apesar de apresentarem a mesma divisão (Magnoliophyta), os óleos testados provêm de espécies de plantas diferentes. Além disso, a composição química levantada por Lopes et al. (2014) não mostra nenhum componente químico em comum às espécies de *Piper* testadas, o que poderia justificar a falta de similaridade dos resultados.

Carriço et al. (2014) ao testaram *P. sapota* também contra *C. putoria*, obtiveram aproximadamente 10% de mortalidade pupal no grupo controle e na concentração 10 mg do óleo. O grupo controle puro dos óleos de *Piper* testados foi o grupo que apresentou uma mortalidade pupal mais semelhante ao valor encontrado para esta concentração (9,56 %).

Esses autores obtiveram aproximadamente 5,0 % de mortalidade pupal na concentração 5 e 25 mg. A concentração 100 mg de *Piper* sp. foi a que mais se aproximou dos resultados obtidos destas concentrações de *P. sapota* (5,25 %). Assim como os resultados encontrados no presente estudo, aparentemente esta amostra não provocou dose-dependência no inseto-alvo. Contudo, os óleos de *Piper* testados mostraram ter mais atividade pupicida contra *C. megacephala* do que o óleo de *P. sapota* testado por Carriço et al. (2014) sobre o desenvolvimento de *C. putoria*.

Estes autores constataram que *P. sapota* é capaz de causar alterações no desenvolvimento pós-embriônico de *C. putoria*, mas não causa significativa mortalidade pupal. O fato do presente trabalho não ter testado esses tipos de concentrações, assim como os óleos testados pertencerem a famílias diferentes, poderia justificar uma discrepância nos resultados encontrados por estes autores.

Carriço et al. (2014) atribuíram uma alta viabilidade pupal ao peso das larvas. De acordo com Von-Zuben (1998), a espécie *C. megacephala* consegue empupar se obtiver um peso mínimo de 30,1 mg. Como estes autores encontraram esse peso mínimo em *C. putoria* em todos os seus tratamentos, uma espécie dentro do mesmo gênero, as pupas conseguiram ser viáveis.

Mello et al. (2010) ao testarem o latex extraído de *E. splendens* var. *hislopilii* contra *M. scalaris*, encontraram 32,5 % de mortalidade pupal no grupo controle. Este valor se aproximou da concentração 200 mg de *P. aduncum* e PI-02 no presente trabalho. Este alto valor encontrado no grupo controle mostra que esta espécie de díptero também apresenta uma alta taxa natural de mortalidade durante o período pupal.

Esses autores encontraram ainda, 63,5 % de mortalidade para a concentração 5 mg, 51,7 % para a concentração 10 mg e 55,4 % para a concentração 20 mg. No presente estudo não foram constatados valores tão altos de mortalidade pupal, o que indica uma maior atividade pupicida de *E. splendens*. O fato dos óleos utilizados pertencerem a plantas da mesma classe (Magnoliopsida) não exclui o fato de que as plantas utilizadas pertencem às famílias diferentes, o que poderia justificar a diferença entre alguns resultados encontrados.

Por a maioria dos trabalhos estudarem plantas cujas características particulares variavam daquelas presentes em *P. aduncum* e PI-02 (mesmo a *P. marginatum* e *P. purusanu* trabalhada por Gomes et al. 2009), foram encontradas grandes discrepâncias entre os resultados. Além disso, como mencionado anteriormente, a maioria dos trabalhos não tinham

a *C. megacephala* como inseto-alvo, o que dificulta mais ainda a discussão dos resultados obtidos.

5.5 Efeitos sobre o período de neolarva-adulto

5.5.1 Duração do período de neolarva-adulto dos grupos controle

De acordo com d'Almeida et al. (2001), aferir a duração e viabilidade do período de neolarva a adulto dos insetos é primordial para avaliar a eficácia da substância testada. Essas observações permitem a detecção de distorções existentes no período larval e pupal.

A duração média obtida no período de neolarva-adulto dos testes com *P. aduncum* e PI - 02 foi de $9,4 \pm 0,6$ dias no grupo controle. Cabral et al. (2007) obtiveram $8,3 \pm 0,6$ dias no grupo controle, enquanto Mendonça et al. (2011) obtiveram aproximadamente 9,4 dias de duração. Pinto et al. (2015b) encontraram $9,6 \pm 0,6$ dias de duração deste estágio no grupo controle em seus testes com *C. megacephala*.

Os valores encontrados para o grupo controle do presente estudo se aproximam mais daqueles obtidos por Mendonça et al. (2011) e Pinto et al. (2015b).

Lopes et al. (2014) em seus testes com *C. putoria* observaram uma duração de $8,3 \pm 0,5$ dias deste estágio no grupo controle. Ao trabalharem com esta mesma espécie e condições de temperatura e umidade, Carriço et al. (2014) obtiveram uma média de $9,1 \pm 0,5$ dias no grupo controle, enquanto Pinto et al. (2015b) obtiveram uma média de $7,6 \pm 0,8$ dias.

Pinto et al. (2015b) obtiveram uma média de $8,0 \pm 0,7$ dias no grupo controle, ao trabalharem com *L. cuprina* e $11,9 \pm 0,3$ dias de duração no grupo controle em seus estudos com *M. domestica*. Mello et al. (2010) encontraram $12,9 \pm 0,8$ dias de duração do período larval de *M. scalaris*.

A duração média obtida no período de neolarva à adulto dos testes com *P. aduncum* e PI - 02 no grupo controle com DMSO foi $8,0 \pm 1,1$ dias. A variação de dias entre os dois grupos mostra que este diluente supostamente aceleraria o desenvolvimento intrapuparial de *C. megacephala*.

Os trabalhos realizados por Pinto et al. (2015a, 2015b) também apontam essa possível reação. Em seus testes com *C. megacephala* e *C. putoria*, estes autores encontraram $9,5 \pm 0,6$ e $7,5 \pm 0,6$ dias, respectivamente, no grupo controle com DMSO. Os experimentos destes autores com espécies pertencentes a outro gênero também mostram esse tipo de resposta.

Os testes feitos por eles com *L. cuprina* apresentaram uma média de $7,8 \pm 0,5$ dias no grupo controle com DMSO, enquanto que os experimentos com *M. domestica* apresentaram, para este grupo, uma média de $10,6 \pm 1,2$ dias de duração no grupo controle, com DMSO e $7,9 \pm 0,3$ no grupo controle com citral.

Os resultados encontrados no presente trabalho diferem daqueles obtidos por Cabral et al. (2007). Estes autores encontraram $9,0 \pm 0,5$ dias no grupo controle com acetona. A diferença de dias entre ambos os grupos mostra também um desenvolvimento larval mais lento no grupo com o diluente.

Os demais trabalhos não puderam ser comparados, pois não utilizaram controle negativo em seus experimentos, ou seja, não utilizaram grupo controle usando diluente. Pode-se perceber que os diluentes testados são capazes de causar algum grau de alteração no ciclo de vida dos insetos-alvo. Essa característica dos diluentes precisa ser mais estudada para diferenciar o grau de alteração causado nos insetos pela ministração do diluente daquelas causadas pelo óleo.

5.5.2 Duração do período de neolarva-adulto dos grupos tratados com diferentes concentrações dos óleos

Cabral et al. (2007) ao estudarem a atividade da lignana yangambin em *C. megacephala* obtiveram $9,3 \pm 0,5$ dias de duração no estágio de neolarva-adulto na concentração 25 mg de este óleo. Esses resultados se assemelham àqueles obtidos na concentração 150 mg de *P. aduncum* ($9,4 \pm 0,5$ dias) do presente estudo.

Na concentração 25 mg de *P. aduncum* se obteve uma média de $9,1 \pm 0,9$ dias de duração deste estágio, enquanto que esta mesma concentração dos testes com PI-02 proporcionou $7,5 \pm 0,6$ dias de duração, representando a concentração com o menor valor encontrado. Comparado ao grupo controle ($9,4 \pm 0,6$ dias) e grupo controle com DMSO ($8,0 \pm 1,1$ dias) do presente estudo, podemos observar que a concentração 25 mg de *P. aduncum* foi capaz de retardar o desenvolvimento total de *C. megacephala*, enquanto que a concentração 25 mg de *Piper* sp., acelerou o processo. A concentração 25 mg de *P. aduncum* foi a que mais se aproximou dos resultados obtidos na concentração 25 mg do óleo testado por Cabral et al. (2007).

Mendonça et al. (2011) obtiveram aproximadamente 9,3 dias de duração na concentração 50 mg, 9,0 dias na concentração 100 mg, 9,5 dias na concentração 150 mg,

10,0 dias na concentração 200 mg e 10,3 dias na concentração 300 mg de *P. amapa*. No presente estudo, a concentração 50 mg e *P. aduncum* obteve $8,2 \pm 0,5$ dias de duração, enquanto que a de *Piper* sp. obteve $7,7 \pm 0,4$ dias.

Esses resultados mostram que a concentração 50 mg do óleo de *Piper* sp. consegue retardar mais o desenvolvimento pupal de *C. megacephala* do que esta mesma concentração de *P. aduncum*. A concentração 150 mg de *P. aduncum* é a concentração que mais se aproximou dos valores obtidos por Mendonça et al. (2011) para a concentração 50 mg ($9,4 \pm 0,5$ dias, respectivamente).

O resultado obtido no grupo controle e na concentração 150 mg de *P. aduncum* do presente estudo foram $9,4 \pm 0,6$ e $9,4 \pm 0,5$ dias, respectivamente. Estes grupos foram os que mais se aproximaram dos valores encontrados por Mendonça et al. (2011) na concentração 100 e 150 mg. A duração deste estágio encontrada na concentração 200 e 300 mg de *P. amapa* se assemelha àquela encontrada na concentração 100 e 250 mg de *P. aduncum* e *Piper* sp. ($10,4 \pm 0,6$ e $10,3 \pm 24,3$ dias e $10,2 \pm 0,5$ e $10,6 \pm 1,2$ dias, respectivamente).

Mendonça et al. (2007) constataram que a concentração 300 mg era aquela que mais estendia o estágio de neolarva-adulto de *C. megacephala*, enquanto que a concentração 100 mg era a que mais retardava. Diferente do que foi observado por estes autores, nos testes com *P. aduncum*, a concentração 100 mg foi a que apresentou maior tempo de duração para este estágio ($10,4 \pm 0,6$ dias). Nos testes com PI-02, a concentração 250 mg foi a que apresentou maior período de duração para este estágio, com uma média de $10,6 \pm 1,2$ dias.

A concentração 200 mg de *P. aduncum* foi a que apresentou menor valor de duração para este estágio, com $7,5 \pm 1,5$ dias de média. Nos testes com PI-02, a concentração 25 mg foi a que apresentou menor período de neolarva-adulto ($7,5 \pm 0,6$ dias). Esses resultados mostram que os óleos de *Piper* testados, como mencionado antes, não apresentam efeito dose-dependente no inseto.

Pinto et al. (2015b) encontraram para as concentrações 5, 10, 25, 50, 75 e 100 mg (ao óleo essencial puro) de *C. citratus* provenientes do Brasil, respectivamente, $10,8 \pm 0,4$, $10,7 \pm 0,9$, $10,9 \pm 0,9$, $9,6 \pm 0,8$, $9,8 \pm 0,4$ e $10,6 \pm 0,9$ dias de duração estágio de neolarva à adulto para *C. megacephala*. Nos testes realizados com *C. citratus* provenientes de Cuba, nesta mesma espécie de mosca, obteve-se para estas mesmas concentrações: $10,9 \pm 0,5$, $10,7 \pm 0,9$, $11,0 \pm 0,8$, $9,8 \pm 0,8$, $9,9 \pm 0,4$ e $10,6 \pm 0,7$ dias para o estágio de neolarva à adulto.

Os resultados encontrados por estes autores na concentração 5, 10, 25 e 100 mg se aproximam daqueles obtidos na concentração 100 mg de *P. aduncum* ($10,4 \pm 0,6$ dias) e 250 mg de PI-02 ($10,6 \pm 1,2$ dias). Enquanto que a concentração 50 e 75 mg testadas por estes autores obtiveram resultados semelhantes ao encontrado na concentração 150 mg de *Piper* sp. ($9,9 \pm 1,1$ dias).

Esses autores, ao testarem *C. citratus* provenientes do Brasil contra *C. putoria*, encontraram para estas concentrações, $7,1 \pm 0,2$, $7,1 \pm 0,8$, $7,2 \pm 0,5$, $7,4 \pm 0,9$, $7,4 \pm 0,6$ e $7,4 \pm 0,8$ dias de duração para o estágio de neolarva-adulto, respectivamente. Em seus testes com *C. citratus* provenientes de Cuba para esta mesma espécie de díptero encontraram: $7,1 \pm 0,3$, $7,1 \pm 0,7$, $7,3 \pm 0,4$, $7,4 \pm 0,8$, $7,4 \pm 0,6$ e $7,4 \pm 0,8$ dias de duração no estágio de neolarva-adulto. Todos resultados encontrados por estes autores em seus testes com *C. putoria* se assemelham mais aos $7,5 \pm 1,5$ dias encontrados na concentração 200 mg de *P. aduncum*.

Pinto et al. (2015b) ao testarem *C. citratus* provenientes do Brasil contra *L. cuprina*, encontraram para estas concentrações, $1,8 \pm 1,1$, $14,1 \pm 0,9$, $13,9 \pm 1,1$, $13,9 \pm 1,1$, $13,6 \pm 1,1$ e $14,1 \pm 1,2$ dias de duração para o estágio pupal, respectivamente. Em seus testes com *C. citratus* provenientes de Cuba para esta mesma espécie de díptero encontraram: $12,9 \pm 1,5$, $14,2 \pm 0,9$, $14,1 \pm 1,1$, $14,0 \pm 1,1$, $13,6 \pm 1,2$ e $14,0 \pm 1,2$ dias de duração no estágio neolarva-adulto. Os resultados obtidos para *C. citratus*, de ambos os países não se aproximaram de nenhum valor obtido no presente estudo, por terem apresentado um tempo de desenvolvimento de neolarva à adulto mais longo.

Pinto et al. (2015a) ao testarem *C. citratus* provenientes do Brasil contra *M. domestica*, encontraram para estas concentrações, $14,5 \pm 0,5$, $14,5 \pm 0,5$, $14,4 \pm 0,5$, $12,6 \pm 0,5$, $12,6 \pm 0,5$ e $19,5 \pm 0,5$ dias de duração para o estágio de neolarva- adulto, respectivamente. Em seus testes com *C. citratus* provenientes de Cuba para esta mesma espécie de díptero encontraram: $14,4 \pm 0,5$, $14,4 \pm 0,5$, $14,4 \pm 0,5$, $12,5 \pm 0,5$, $12,5 \pm 0,5$ e $19,5 \pm 0,5$ dias de duração no estágio pupal. Os resultados obtidos para *C. citratus*, de ambos os países não se aproximaram de nenhum valor obtido no presente estudo, por terem apresentado um tempo de desenvolvimento pupal mais longo.

Como mencionado anteriormente, os resultados encontrados por estes autores não mostraram diferença entre os extratos. As espécies *L. cuprina* e *M. domestica* mostram ser mais susceptíveis aos óleos do que aquelas pertencentes ao gênero *Chrysomya*. No geral, as

concentrações de *C. citratus* que apresentaram a mesma resposta do que as concentrações de *P. aduncum* e *Piper* sp. foram menores.

Lopes et al. (2014) encontraram $8,3 \pm 0,5$, $8,3 \pm 0,5$ e $8,3 \pm 0,5$ dias de duração total do ciclo de *C. putoria* na concentração 25, 50 e 75 mg de *P. scandens*. Esses valores se aproximam daqueles encontrados nos testes com *P. aduncum* na concentração 50 mg ($8,2 \pm 0,5$ dias). Carriço et al. (2014) ao realizarem testes com esta mesma espécie de *Chrysomya*, encontraram $9,0 \pm 0,2$, $9,4 \pm 0,4$ e $9,4 \pm 0,4$ dias de duração do período de neolarva a adulto nas concentrações 5, 10 e 25 mg de *P. sapota*. Esses resultados se assemelham, respectivamente, àqueles obtidos nas concentrações de 25 e 150 de *P. aduncum* do presente estudo ($9,1 \pm 0,9$ dias e $9,4 \pm 0,5$ dias, respectivamente).

Podemos observar que a espécie *C. putoria*, apesar de pertencer ao mesmo gênero que *C. megacephala*, parece ter uma tendência maior a sofrer uma diminuição de dias de seu desenvolvimento pós-embrionário do que esta espécie.

Mello et al. (2010) ao trabalharem com a concentração 5, 10 e 25 mg de *E. splendens* contra *M. scalaris* encontraram, respectivamente, $12,2 \pm 0,4$, $12,2 \pm 0,5$ e $12,2 \pm 0,5$ dias de duração do estágio de neolarva-adulto. Nenhum resultado encontrado no presente estudo se assemelhou aos valores encontrados por estes autores. Essa discrepância nos valores pode ser justificada pelo fato das espécies de dípteros testadas pertencerem a famílias diferentes.

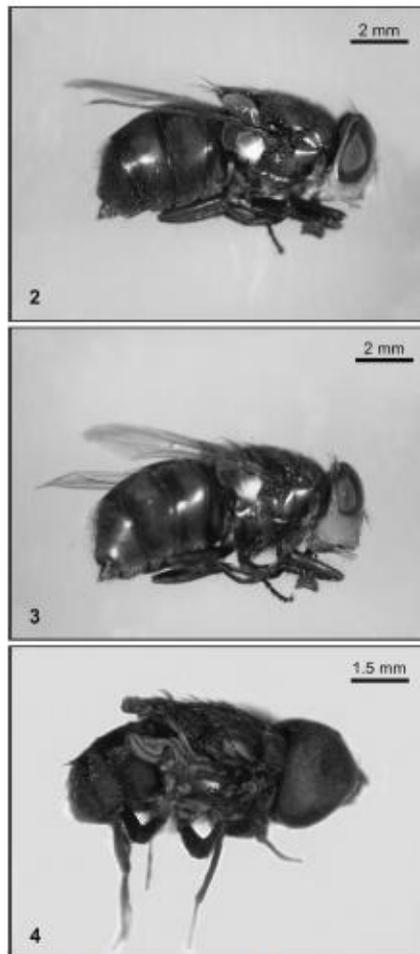
Como Gomes et al. (2009) avaliaram apenas a mortalidade larval das moscas das frutas, estes não obtiveram resultados quanto a seus demais estágios. Não foi possível, assim, comparar seus resultados com aqueles obtidos no presente estudo.

Nos experimentos feitos com o óleo extraído de *P. aduncum*, concluiu-se que a concentração 100mg foi aquela que proporcionou um maior tempo de duração do ciclo de vida de *C. megacephala*, enquanto que a concentração 200mg foi àquela capaz de provocar um encurtamento deste ciclo. Nos testes com PI-02, na concentração 250mg se obteve uma maior duração do período de neolarva a adulto, ao passo que a concentração 25mg obteve um menor tempo de duração deste estágio. Esses resultados puderam ser confirmados através da diferença estatística encontrada no Teste de Tukey ($p < 0,01\%$).

5.5.3 Mortalidade do período de neolarva-adulto e outras observações constatadas neste estágio

Cabral et al. (2007) obtiveram 32 % de mortalidade total no grupo controle, 30 % no grupo controle com acetona e 61 % na concentração 25 mg de yangambina. Esses autores observaram diferentes alterações nas etapas do ciclo de *C. megacephala* em seus testes com o óleo extraído de *O. duckei*. A toxicidade de lignanas já havia sido registrada para insetos, em trabalhos como o de Miyazawa et al. (1998) utilizando *Drosophila melanogaster*.

Assim, Cabral et al. (2007) puderam confirmar que além desta substância ter se mostrado tóxica para *C. megacephala*, como foi para outros insetos, esta ainda foi capaz de interferir em seu sistema endócrino, causando modificações em seu metabolismo e morfologia. De todos os trabalhos levantados, este grupo foi o único que registrou as alterações morfológicas presentes nos adultos. Esse tipo de registro é primordial para uma análise mais apurada dos tipos de alterações que os óleos ministrados são capazes de causar no ciclo de vida do inseto.



Figs. 2-4. *C. megacephala* adult flies, as seen with stereomicroscopy. (2) Control fly. (3) Adult fly presenting light morphological alterations in the head. Note the reduction in eye size and the enlargement of the gena. (4) Adult fly presenting severe morphological alterations. Note the reduced wings and the deformation in the body and mouthparts. Furthermore, the insect still presents a grayish color.

Figura 27 - Alterações morfológicas registrada por Cabral et al. (2007) em testes feitos com a concentração 25 mg do óleo essencial extraído de *Ocotea duckei* contra *Chrysomya megacephala*.

Os autores dividiram as alterações morfológicas em dois tipos: Leve, na qual se observou uma redução no tamanho dos olhos dos insetos adultos e um alargamento de suas genas, e severa, onde se constatou uma redução das asas dos insetos e uma deformação no corpo. No presente estudo, foram utilizadas as categorias: Apenas asas atrofiadas, de maneira que o resto do corpo do inseto permaneceu sem atrofia e totalmente atrofiados, que se assemelharia à categoria “alterações morfológicas severas” de Cabral et al. (2007).

No presente estudo, a maioria dos espécimes atrofiados não conseguiram desinflar o ptilíneo (figuras 23, 24, 26 e 27). Dos espécimes registrados por Cabral et al. (2007), esta característica só é possível de ser observada no adulto pertencente a categoria “com alterações morfológicas severas”.

Assim como foi constatado por esses autores em seus testes com yanganbina, no presente estudo foi observada uma alteração na coloração dos espécimes adultos atrofiados, quando comparados ao grupo controle. A determinação da coloração dos espécimens foi feita em no máximo 3 horas após emergência do adulto, assim como foi feito por Cabral et al. (2007).

Apesar dos tipos de coloração observados, bem como a porcentagem dos adultos que tiveram as mesmas (em cada concentração) terem sido mensuradas, esses valores não foram incluídos no presente trabalho.

Por o presente estudo ter trabalhado com sete concentrações, houve uma grande quantidade de adultos que emergiram no total. Não houve possibilidade de todos os espécimes terem sido fotografados em um curto período de tempo. Por conta disso, muitos espécimes que não foram registrados ainda, escureceram com o passar do tempo.

O registro dos mesmos poderia inviabilizar uma análise verdadeira dos resultados obtidos, uma vez que o número de insetos com coloração mais escura iria sobressair sobre os demais. Levar em conta esses fatores é essencial para estabelecer, em próximos estudos, uma metodologia que permita o registro de todos os espécimes atrofiados antes dos mesmos escurecerem.

Cabral et al. (2007) constataram 20 % de atrofia geral nos espécimes adultos que emergiram de seus experimentos com a concentração 25 mg do óleo. No trabalho de Cabral et al. (2007), se observou 20 % de mortalidade total em seus testes com 25 mg yangambina. Esses resultados se assemelham daqueles obtidos para a concentração 50 mg de PI-02 (22,35 % de mortalidade total).

Esses autores não fizeram uma relação de qual seria a porcentagem de atrofia por categoria atribuída, bem como a relação de machos e fêmeas atrofiados. No presente estudo, a concentração 25 mg de *P. aduncum* obteve 62,26 % de machos e 55,26 % de fêmeas atrofiadas, totalizando 59,34 % atrofiados. Enquanto que esta mesma concentração nos testes com PI-02 encontrou 35,48 % de machos e 37,03 % fêmeas atrofiadas, totalizando 35,48% atrofiados.

Nos testes com a concentração 25 mg de PI-02, as fêmeas foram mais atingidas pelo óleo aplicado topicamente. Essa reação poderia indicar que o extrato testado desta espécie de planta apresenta grandes potenciais inseticidas. Apesar de machos e fêmeas serem responsáveis pela veiculação de enteropatógenos, um óleo capaz de causar mais atrofias em

fêmeas poderia indicar um bom biopesticida, uma vez que iria reduzir a quantidade de casos de míases.

Apesar disso, a concentração 25 mg de *P. aduncum* foi capaz de causar uma mortalidade maior de adultos totais, o que não exclui essa amostra como um bom biopesticida também. Como os espécimes adultos atrofiados não conseguiriam sobreviver na natureza, este extrato poderia ser capaz de reduzir a população destes dipteros muscoides (Greenberg 1971 e 1973; Paiva 1994).

Cabral et al. (2007) não levaram em consideração as atrofia existentes no grupo controle. Mensurar o índice natural de atrofia existente entre os insetos poderia auxiliar melhor a calcular a toxicidade do óleo ministrado. No presente estudo se obteve 22,22 % de mortalidade em machos e 28,45 % mortalidade em fêmeas, totalizando uma média de 37,25 % atrofiados, no grupo controle. No grupo controle com DMSO, se obteve 18,86 % de mortalidade em machos e 14,03 % mortalidade em fêmeas, totalizando uma média de 16,36 % atrofiados.

Os resultados encontrados mostram que aparentemente existe uma tendência natural às fêmeas serem mais susceptíveis à atrofia do que os machos, o que poderia explicar altos índices de atrofia para este sexo em diferentes concentrações. Além disso, apesar do DMSO ter mostrado ser capaz de causar alterações na duração do ciclo de vida de *C. megacephala*, este diluente não é necessariamente tóxico às mesmas. Foi constatado um índice de atrofia maior no grupo controle do que no grupo controle com DMSO.

A concentração 300 mg de *P. aduncum* apresentou a menor porcentagem de atrofia em machos (24,32 %) e em fêmeas (12,50 %). A concentração 25 mg apresentou a maior porcentagem de atrofia em machos (62,26 %) e a concentração 100 mg apresentou a maior porcentagem de atrofia em fêmeas (77,77 %). Em relação ao total de atrofia (machos e fêmeas) com as diferentes concentrações do óleo extraído de *P. aduncum*, a concentração 300 mg apresentou a menor porcentagem de atrofia, com 18,18 %, enquanto que a concentração 25 mg apresentou a maior porcentagem, com 59,34 %.

A concentração 100 mg de *Piper* sp. apresentou a menor porcentagem de atrofia em machos (9,75 %) e em fêmeas (12,50 %). A concentração 150 mg apresentou a maior porcentagem de atrofia em machos (43,33 %) e a concentração 200 mg apresentou a maior porcentagem de atrofia em fêmeas (44,44 %). Em relação ao total de atrofia (machos e fêmeas) com as diferentes concentrações do óleo extraído de PI-02, a concentração 100 mg

apresentou a menor porcentagem de atrofia, com 10,76 %, enquanto que a concentração 200 mg apresentou a maior porcentagem, com 43,07 %.

Esses resultados ressaltam a importância de se realizar testes com diferentes concentrações de extratos, pois pequenas alterações na concentração (como de 100 para 150 mg de PI-02) poderiam mudar drasticamente os resultados encontrados. Estudos voltados para o porquê de algumas concentrações altas dos óleos não serem capazes de impactar tanto o ciclo de *C. megacephala*, como as concentrações mais baixas precisam ser realizados.

No presente estudo se obteve 12,15 % de mortalidade do estágio de neolarva-adulto no grupo controle, 10,6 % no grupo controle com DMSO, 25,4 % na concentração 25 mg de *P. aduncum* e 1,62 % na concentração 25 mg de PI-02. Apesar de o grupo controle apresentar uma mortalidade total alta, os testes com *P. aduncum* indicam que este óleo é capaz de impedir que os espécimes adultos emerjam de suas pupas.

Os motivos pelos quais os testes com a concentração 25 mg de PI-02 terem proporcionado uma alta emergência dos adultos precisam ser mais bem investigados. Esta concentração foi uma das que mais tiveram índices de atrofia (35,48 % atrofiados totais), o que poderia indicar que apesar dos adultos terem emergido, estes não eram viáveis.

Cabral et al. (2007) obteve 0,4 de razão sexual no grupo controle, 0,8 no grupo controle com acetona e 0,4 na concentração 25 mg de yangambina. No presente estudo também se obteve 0,4 no grupo controle, contudo, no grupo controle com o diluente (DMSO) foi encontrado 0,5 de razão sexual. Esses resultados sugerem que em uma população de *C. megacephala* há mais fêmeas do que machos.

A concentração 25 mg de yangambina obteve resultados diferentes desta mesma concentração nos testes com *P. aduncum* e PI-02. Ambas as espécies de *Piper* obtiveram 0,4 de razão sexual, indicando um número maior de fêmeas. Enquanto que o valor encontrado para a concentração 25 mg de yangambina sugere um maior número de machos. A concentração 200 mg de PI-02 foi a que obteve valor semelhante ao teste com yangambina (0,7).

Mendonça et al. (2011) obtiveram aproximadamente 30 % de mortalidade no estágio de neolarva-adulto no grupo controle, 20 % de mortalidade na concentração 50 mg, 25 % de mortalidade na concentração 100 mg, 35 % de mortalidade na concentração 150 e 200 mg e 47 % de mortalidade na concentração 300 mg. No presente estudo, se encontrou nos testes de

P. aduncum e PI-02 para cada uma dessas concentrações, respectivamente, 34,14 e 30,89%, 34,3 e 46,34%, 32,52 e 39,84%, 72,38 e 45,53% e 41,46 e 38,21% (tabela 5 e tabela 12).

Como no grupo controle do presente estudo se encontrou 12,15 % de mortalidade de neolarva-adulto, e no grupo controle com DMSO se obteve 10,6 % as concentrações que obtiveram maior mortalidade deste estágio foram 200mg da *P. aduncum* (72,38 %) e 250 mg da *Piper* sp. (68,29 %).

Os resultados encontrados no grupo controle do trabalho de Mendonça et al. (2011) se assemelham aqueles encontrados para a concentração 50 mg de PI-02 (30,89 % mortalidade total). A concentração 25 mg de *P. aduncum* obteve 25,4 % de mortalidade total, se assemelhando aos resultados encontrados por estes autores para as concentrações 50 e 100 mg.

A concentração 100 mg de *P. aduncum* foi a que mais se aproximou dos resultados encontrados por Mendonça et al. (2011) para as concentrações 150 e 200 mg. Esta obteve 34,3 % de mortalidade total. Os 47 % de mortalidade total encontrados na concentração 300 mg do látex testado por Mendonça et al. (2011) se aproximam dos valores encontrados nos testes com a concentração 100 mg de PI-02 (46,34%). Diferente do que foi encontrado por Mendonça et al. (2011), a maioria dos grupos tratados com as diferentes concentrações dos óleos desencadearam maior mortalidade do que o grupo controle.

Pinto et al. (2015a; 2015b) encontraram para as quatro espécies de mosca testadas, uma mortalidade de neolarva-adulto abaixo dos 20 % no grupo controle puro e no grupo controle com DMSO. Assim, como nos testes realizados com *P. aduncum* e *Piper* sp. (tabela 5 e tabela 12).

A mortalidade desse estágio encontrada para *C. megacephala* e *C. putoria* nos testes feitos com as concentrações 5, 10 e 25 mg de *C. citratus* proveniente do Brasil e de Cuba foi de aproximadamente 40 %. A concentração 300 mg de *P. aduncum* foi a que teve uma mortalidade de neolarva-adulto que mais se aproximou desta, uma vez que apresentou 41,46 % de mortalidade total.

A concentração 50 mg dos dois óleos gerou aproximadamente 45 % de mortalidade para este estágio em ambas as espécies de mosca, se assemelhando dos resultados obtidos na concentração 200 mg de PI-02 (45,53 %). A concentração 75 mg dos óleos obteve uma média de 50 % de mortalidade no estágio de neolarva a adulto, de maneira que a concentração

250 mg de *P. aduncum* seja a que mais se aproxima dos valores obtidos por Pinto et al. (2015b) (51,89 %).

A concentração 100 mg dos óleos mostrou uma média de 80% de mortalidade no estágio de neolarva-adulto dos testes com *C. megacephala* e *C. putoria*, sendo o maior valor encontrado por estes autores. A concentração 200 mg de *P. aduncum* foi a que mais se aproximou deste valor, pois obteve uma mortalidade de 72,38 %.

O presente estudo obteve para as concentrações 25 mg, 25,4 % de mortalidade no estágio de neolarva-adulto nos testes com *P. aduncum* e 1,62 % de mortalidade no estágio de neolarva-adulto nos testes com *Piper* sp. A concentração 50 mg destes óleos gerou, respectivamente 34,14 e 30,89 % de mortalidade. Como o presente estudo não incluiu o extrato bruto nos testes, a comparação com os resultados obtidos por Pinto et al. (2015a; 2015b) para este grupo foi impossibilitada.

Nos testes realizados por estes autores com *L. cuprina* e *M. domestica* nas concentrações 5, 10 e 25 mg, dos óleos provenientes dos dois países, foi encontrado uma média de 60 % de mortalidade total. Se assemelhando a concentração 250 mg de PI-02 (68,29%). As concentrações 50 e 75 mg de *C. citratus* contra *L. cuprina* encontraram aproximadamente 45 % de mortalidade para esse estágio, se assemelhando a concentração 200 mg de PI-02 (45,53 %). Essas mesmas concentrações contra *M. domestica* apresentaram uma média de 70 %, se assemelhando do valor obtido para a concentração 200 mg de *P. aduncum* (72,38 %).

De uma forma geral, os óleos obtidos do *C. citratus* mostraram causar uma diminuição na emergência dos adultos, assim como aqueles extraídos de *P. aduncum* e PI-02. O fato de estas três espécies apresentarem composto similares em sua composição como o cadineno, poderia justificar essas reações.

Lopes et al. (2014) ao trabalharem com *C. putoria*, encontraram 15 % de mortalidade de neolarva-adulto no grupo controle, 25 % nas concentrações 25 e 50 mg e 20 % na concentração 75 mg. No presente trabalho não foi realizado teste com a concentração de 75 mg.

Os grupos controles dos experimentos com *P. aduncum* e *Piper* sp. apresentaram uma mortalidade deste estágio bem menor do que o grupo controle do trabalho de Lopes et al. (2014). Isto poderia indicar que a espécie *C. putoria* apresenta uma mortalidade total natural superior a *C. megacephala*.

A concentração 25 mg dos testes feitos com *P. aduncum* foi a que mais se aproximou dos valores obtidos por Lopes et al. (2014) para todas as concentrações (25,4 %). De uma forma geral, os óleos obtidos no presente estudo mostraram dificultar mais a emergência dos adultos do que aqueles extraídos de *P. scandens*.

Esses autores encontraram 0,5 de razão sexual em todos os grupos de seus experimentos, mostrando que a substância testada não é capaz de interferir no sexo dos adultos. Esses resultados diferem daqueles obtidos no presente estudo. Concentrações como a 100, 200 e 250 mg de *P. aduncum* foram capazes de gerar uma maior porcentagem de machos (0,6), quando comparadas ao grupo controle (0,4).

Os únicos trabalhos que levaram em consideração a razão sexual dos adultos que emergiram de seus testes na análise dos resultados foram o de Cabral et al. (2007) e Lopes et al. (2014). Incluir este tipo de informação em estudos de controle poderia fornecer mais informações a respeito da maneira como o óleo tratado age nos indivíduos testados, uma vez que o mesmo poderia afetar mais fêmeas do que machos, ou vice-versa.

Carriço (2014) ao testar de *P. sapota* também contra *C. putoria*, obtiveram aproximadamente 35 % de mortalidade de neolarva a adulto no grupo controle, 55 % de mortalidade na concentração 5 mg, 30 % de mortalidade na concentração 10 mg e 25 % de mortalidade na concentração 25 mg. No presente estudo não foi realizado teste com a concentração 5 e 10 mg dos óleos testados. A concentração 25 mg de *P. aduncum* (25,4%) foi a que obteve um valor mais parecido com a concentração 25 mg de *P. sapota*.

A concentração 250 mg de *P. aduncum* foi a que obteve um valor de mortalidade mais parecido com a concentração 5 mg testada por Carriço et al. (2014), uma vez que esta obteve 51,89 % de mortalidade. A concentração 50 mg de PI-02 obteve 30,89 % de mortalidade, se assemelhando aos resultados obtidos por estes autores para sua concentração 10 mg.

Assim como os resultados encontrados no presente estudo, aparentemente esta amostra não provocou dose-dependência no inseto-alvo. Contudo, os óleos de *Piper* testados mostraram ter mais atividade inseticida contra *C. megacephala* do que o óleo testado por Carriço et al. (2014).

Mello et al. (2010) ao testar o latex extraído de *E. splendens* var. *hislopilii* contra *M. scalaris*, encontraram 36,0 % de mortalidade de neolarva-adulto no grupo controle. Este valor se aproximou da concentração 100 mg de *P. aduncum* (34,3 %). Este alto valor

encontrado no grupo controle mostra que esta espécie de díptero também apresenta uma alta taxa natural de mortalidade durante o período pupal.

Esses autores encontraram ainda, 63,5 % de mortalidade para a concentração 5 mg, sendo a concentração 250 mg de PI-02 a que mais se aproximou destes resultados (68,29 %). Mello et al. (2010) encontraram 57,5 % para a concentração 10 mg e 58,5 % para a concentração 20 mg, de maneira que a concentração 250 mg de *P. aduncum* foi a que mais se aproximou dos valores obtidos (51,89 %).

Gomes et al. (2009) não avaliaram os efeitos que os óleos de *P. purusanum* e *P. marginatum* apresentaram nas etapas adiante da larval. Assim, os resultados obtidos no período de neolarva a adulto de *C. megacephala* não puderam ser comparados com o trabalho destes autores.

Até o presente momento, os únicos trabalhos existentes na literatura que utilizaram extratos provenientes de *P. aduncum* contra alguma espécie de díptero muscoide foi o de Mee et al. (2009) e Carmona-Hernández et al. (2014). Em ambos os estudos o objetivo foi verificar uma possível atividade inseticida proveniente de extratos de *P. aduncum*, por conta disso, ambos os trabalhos fizeram uso apenas de insetos adultos.

Mee et al. (2009) ao trabalharem com a espécie *M. domestica*, aplicaram 1 mL de diferentes concentrações de *P. aduncum* diretamente sobre o tórax desta mosca. Estas foram observadas por uma hora para avaliar os efeitos dos extratos sobre as mesmas. A mortalidade foi aferida 24 horas após a aplicação dos extratos. Apesar dos autores não relatarem quais concentrações foram testadas, sua metodologia consistiu de 6 réplicas com 25 moscas para cada concentração. Os resultados obtidos foram comparados com o grupo controle, cujas moscas recebiam topicamente Resigen®. Os testes foram realizados na temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

Estes autores constataram uma maior susceptibilidade a alterações comportamentais e fisiológicas em machos do que em fêmeas. Apesar do presente estudo não ter realizado este tipo de análise, foi constatado um maior percentual de atrofia em fêmeas do que em machos. Isso poderia indicar que as fêmeas são mais afetadas por estes extratos quando possuem contato com o mesmo ao longo de seu ciclo do que quando possuem contato com o mesmo apenas na fase adulta.

Contudo, como este tipo de análise não foi levada em consideração, sendo assim se torna difícil comparar os resultados obtidos entre os dois trabalhos. Apesar disso, estes

autores registraram resultados promissores com as diferentes concentrações de *P. aduncum* testadas, o que sugere que mais estudos a respeito da potencial atividade inseticida desta espécie de planta devem ser feitos.

Carmona-Hernández et al. (2014) testaram extratos provenientes das espécies de planta *P. aduncum*, *P. hispidium*, *P. sanctum*, *P. diandrum*, *P. amalago*, *P. nudum*, *P. psilorhachis*, *P. auritum* e *P. umbellatum* contra *D. melanogaster*. Foram utilizados, para cada ensaio, 10 adultos de 2 a 5 dias de vida, sem serem sexados. Estes foram postos em frascos que continham discos de contato (4 cm de diâmetro) impregnados com 200 mL dos extratos. Para *P. aduncum* foram utilizadas as concentrações: 100, 200, 300, 400 e 500 mg/mL.

Das espécies estudadas, *P. aduncum* foi considerada como a terceira mais tóxica e uma das mais promissoras para ser utilizada como bioinseticida, uma vez que apresentou alto grau de mortalidade em concentrações baixas. Apesar do presente estudo não ter incluído testes nos insetos adultos, *P. aduncum* apresentou maior mortalidade no estágio de neolarva-adulto do que PI - 02, ressaltando seu potencial biopesticida.

5.6 Observações gerais sobre os resultados obtidos até o presente momento

Como foi mencionado ao longo da discussão, o fato de que algumas das concentrações baixas de *P. aduncum* e *Piper* sp. terem sido capazes de causar maior mortalidade do que as mais altas, este fato precisa ser melhor investigado. Esse tipo de resultado foi encontrado em quase todos os trabalhos citados que utilizaram a mesma metodologia do presente estudo.

Abdel-Shafy et al. (2009) realizaram testes com diferentes extratos brutos contra larvas de *C. albiceps* e também observaram essa resposta. Segundo os autores, essa reação provavelmente estaria relacionada a capacidade que as larvas de dípteros muscoides terem de empupar mais rapidamente quando são submetidas a estresses, tais como a aplicação de uma alta concentração de extrato. Por conta disso, estas seriam capazes de “se livrar” dos danos causados por estas concentrações, sendo capazes de gerar, assim, adultos mais normais do que aqueles provenientes das baixas concentrações.

Por a maioria dos trabalhos terem estudado plantas cujas características particulares variavam daquelas presentes em *P. aduncum* e *Piper* sp. (mesmo a *P. marginatum* e *P. purusanu* trabalhada por Gomes et al. 2009), foram encontradas grandes discrepâncias entre os resultados. Além disso, a maioria dos trabalhos, além de não ter trabalhado com

C. megacephala, não incluíram em suas discussões o estágio de pré-pupa, razão sexual dos adultos e atrofia existentes entre os adultos, o que dificultou a discussão dos resultados obtidos.

De uma forma geral, os óleos testados no presente estudo mostraram atividades larvicidas, pupicidas e inseticidas potenciais, características que fazem uma substância ser considerada um bom biopesticida. O fato dos testes terem sido realizados com a proporção de 0,5 mL/larva torna os resultados obtidos ainda mais satisfatórios. Isso demonstra que mesmo quando ministrado sobre as larvas em baixas concentrações (para o padrão adotado nos demais artigos), os óleos de *P. aduncum* e *Piper* sp. apresentam toxicidade e capacidade de alterar as etapas do desenvolvimento pós-embrionário de *C. megacephala*.

Para coletar mais informações sobre estes óleos, estudos voltados para a implementação de um controle positivo na metodologia dos experimentos (onde poderiam ser utilizados inseticidas comerciais) precisam ser realizados. Além disso, utilizar ferramentas complementares, como a microscopia eletrônica, poderia auxiliar a detecção de maneira mais aprofundada das alterações morfológicas geradas.

No presente estudo os óleos foram aplicados diretamente sobre as neolarvas, de maneira que todo o ciclo do inseto pudesse ser observado. Apesar disso, estudar os efeitos destas substâncias sobre outras etapas do ciclo de vida de *C. megacephala* poderia ajudar a compreender melhor a maneira como os óleos essenciais afetam fisiologicamente os dípteros muscoides.

6 CONCLUSÕES

1. Evidenciou-se que a massa larval em indivíduos emergidos do sexo masculino foi maior do que nas fêmeas, contudo, todas as concentrações testadas mostraram ser capazes de gerar larvas mais leves de *Chrysomya megacephala*, sendo a concentração 200 mg de *P. aduncum* e de PI-02 a mais efetivas.
2. Ambos os óleos essenciais tiveram um efeito acelerador no tempo de desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala*, provocando uma redução em até 2 dias com um maior efeito no estágio pupal nos tratamentos com as doses de 200 mg/mL para as duas espécies de *Piper* testadas.
3. Todas as concentrações mostraram índices de mortalidade maior às dos grupos controle, sendo que as maiores percentagens de mortalidade larval, pupal e de neolarva-adulto foram encontradas na concentração de 200 mg/mL de ambas as espécies de *Piper* testadas.
4. O estudo da estabilidade da descendência proveniente da colônia de *Chrysomya megacephala* tratada com os óleos de espécies de *Piper*, baseado na razão sexual, evidenciou que a maioria dos grupos tiveram um índice na faixa da normalidade (ao redor de 0,5), porém a concentração 200 mg/mL de *Piper* sp. (PI-02) foi aquela onde houve emergência de um maior número de indivíduos machos.
5. O estudo microscópico da morfologia externa dos adultos emergidos mostrou que ambos os óleos das espécies de *Piper* induzem o aparecimento de malformações no fenótipo dos indivíduos tratados, principalmente em machos, sendo a concentração de 25 mg/mL de *P. aduncum* a de maior efeito indutor atingindo o 59% do grupo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J Econ Entomol 1925. 18: 265-266.

Abdel-Shafy S, El-Khateeb R.M, Soliman MMM, Abdel-Aziz MM. The efficacy of some wild medicinal plant extracts on the survival and development of third instar larvae of *Chrysomya albiceps* (Wied) (Diptera: Calliphoridae). Trop. Anim. Health Prod. 2009. (41): 1741–1753.

Aguiar-Coelho VM, Queiroz MMC, Milward-de-Azevedo EMV. Associações entre larvas de *Cochliomya macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae) em condições experimentais. Rev bras Zool 1995. 12 (4): 983-990.

Aguiar-Santos AM, Medeiros Z, Bonfim C, Rocha AB, Brandão E, Miranda T, Oliveira P, Sarinho ESC. Avaliação epidemiológica de doenças negligenciadas em escolares: filariose linfática e parasitoses intestinais. J Pediatr 2013. 3(89).

Ahid SMM. Apostila Didática em Entomologia Veterinária/ Sílvia Maria Mendes Ahid. - Mossoró: UFERSA 2009. 80p.

Alécio AC, Bolzani VS, Young MCM, Kato MJ, Furlan M. Antifungal amides from *Piper hispidum*. J Nat Prod 1998. 61: 637-639.

Amat E, Vélez MC, Wolff M. Clave ilustrada para la identificación de los géneros y las especies de califóridos. Cald 2008. 30(1): 231-244.

Amatuzzi ML, Barreto MC, Litvoc J, Leme LEG. Linguagem metodológica – Parte 1. Act Ortp Bras 2006 14.

Amorim CZ, Flores CA, Gomes BE, Marques AD, Cordeiro RSB. Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe*. J Ethnopharmacol 1988. 24: 101-106.

Amorim DS, Yeates DK. Pesky gnats: ridding dipteran classification of the nematocera. Studia Dipterol 2006. 13: 3-9.

Andrade EHA, Carreira LMM, Silva MHL, Silva JDS, Bastos CN, Sousa PJC, Guimarães EF, Maia JG. Variability in Essential-Oil Composition of *Piper marginatum* sensu lato. Chemistr Biodiv 2008. 5(1): 197-208.

Andrade EHA, Zoghbi MG, Santos AS, Maia JGS. Essential oil of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *P. regnelli* (Miq.) CDC. J Essent Oil Res 1998. 10: 465- 467.

Andrade JGF, Sá VGM, Lodi S, Godoy BS. Age of *Eucalyptus urograndis* plantations and occurrence of pest insects. Rev Árv 2016. 40(5): 885-892.

Ansueto KRV. Necesidad de la aplicación de la entomología forense, como herramienta para establecer la muerte de una persona em Guatemala. Monografía (Licenciatura em Investigación Criminal y Forense). Universidad Rafael Landívar. Guatemala 2015.

Asprey GF, Thornton P. In: Medicinal Plants of Jamaica. West Indian Med J 1954.

Attokaran M. Natural Food Flavors and Colorants. John Wiley & Sons 2011.

Azevedo RR, Krüger RF. The influence of temperature and humidity on abundance and richness of Calliphoridae (Diptera). Iheringia Ser Zool 2013. 103: 145-152.

Baladan J; Baladan J. Site Bugguide. Disponível em: <http://bugguide.net/node/view/7180> Acessado dia: 24 de Setembro de 2017.

Baldoqui DC, Bolzani VS, Furlan M. Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (Piperaceae). Quim Nova 2009. 32(5): 1107-1109.

Baltazar FN, Cavallari ML, Carvalho E, Tolezano JE, Muñoz DR. Entomologia Forense e Saúde Pública: relevância e aplicabilidade. Bepa 2011. 8(87): 14-25.

Bardelli KC, Kirizawa M, Sousa AVG. O gênero *Piper* L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microbacia do Sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. Hoehnea 2008. 35(4): 553-561.

Barrigossi JAF, Ferreira E. Tratamento de sementes visando o controle de pragas que atacam o arroz na fase inicial da cultura. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. Circ Téc 2002. 54: 6p.

Barrigossi JAF, Martins JFS. Pragas e métodos de controle. In: Sistemas de produção, 7. Cultivo do arroz de terras altas no Estado do Mato Grosso. [S I sn], 2006.

Barros-Cordeiro KB, Pujol-Luz JR. Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório. Pap Avulsos Zool 2010. 50(47): 709-717.

Batista-da-Silva JA, Moya-Borja GE, Queiroz MMC. Ocorrência e Sazonalidade de Muscoides (Diptera: Calliphoridae) de Importância Sanitária no Município de Itaboraí, RJ, Brasil. EntomoBrasilis 2010. 3(1): 16-21.

Bazán-Calderón J, Ventura-Flores R, Kato MJ, Rojas-Idrogo C, Delgado-Paredes GE. Actividad insecticida de *Piper tuberculatum* Jacq. Sobre *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) y *Anopheles pseudopunctipennis* Tehobal (Diptera: Culicidae). An Biol 2011. 33: 135-147.

Benevides PJC, Sartorelli P; Kato MJ. Phenylpropanoic and neolignans from *Piper regnellii*. Phytoc 1999. 52: 339-343.

Bilal H, Hassan SA. Plants secondary metabolites for mosquito control. Asian Pac J Trop Dis 2012. 168-168.

Blitz J, Simpson G. Ultrasonic methods of nondestructive testing (Vol. 2). London: Springer Science & Business Media 1995.

Blythe LL, Craig AM, Christensen JM, Appell LH, Slizeski ML. Pharmacokinetic disposition of dimethyl sulfoxide administered intravenously to horses. *Am J Vet Res* 1986. 47: 1739-1743.

Borg-Karlson AK, Norin T, Talvitie A. Configurations and conformations of torreyol (δ -cadinol), α -cadinol, T-muurolol and T-cadinol. *Tetrahedron* 1981. 37(2): 425-430.

Borror DJ, Delong DM. Introduction to the Study of Insects. In: ESTUDO DOS INSETOS (7ª Ed) Cengage Learning 2011.

Botsaris AS. As fórmulas mágicas das plantas: como utilizar a fitoterapia no tratamento de doenças simples. (2 ed.) Rio de Janeiro: Record: Nova Era 1997.

Bourel B, Callet B, Hédouin V, Gosset D. Flies eggs: a new method for the estimation of short-term post-mortem interval? *Forens Sci Int* 2003. 135(1): 27-34.

Brayton CF. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet* 1986. 76-90.

Cabral MMO, Kelecom A, Garcia ES. Effects of the lignan, pinosresinol on the moulting cycle of the bloodsucking bug *Rhodnius prolixus* and of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. *Fitoterapia* 1999. 70: 561-567.

Cabral MMO, Kollien AH, Kleffmann T, Azambuja P, Gottlieb OR, Garcia ES; Schaub GA. *Rhodnius prolixus*: effects of the neolignan burchellin on *in vivo* and *in vitro* diuresis. *Parasitol Res* 2000. 86: 710-716.

Cabral MMO, Mendonça PM, Gomes CMS, Barbosa-Filho JM, Dias CS, Soares MJ, Queiroz MMC. Biological Activity of Yangambin on the Postembryonic Development of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol* 2007. 44(2): 249-255.

Camargo EP. Doenças tropicais. *Estud Av* 2008. 22(64): 95-110.

Carmona-Hernandez, Fernandez MS, Palmeros-Sanchez B, Lozada García JÁ. Actividad insecticida de extractos etanólicos foliares de nueve piperáceas (*Piper* spp.) en *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 2015. 30: 67-73

Carpenter RJ, Angel MF, Morgan RF. Dimethyl sulfoxide increases the survival of primarily ischemic island skin flaps. *Otolaring Head Neck Surg* 1994. 110: 228-231.

Carriço CB, Pinto ZT, Dutok CMS, Caetano RL, Pessanha RR, Chil-Nuñez I, Mendonça PM, Reys-Turf B, Queiroz MMC, Escalona-Arranz JC. Biological activity of *Pouteria sapota* leaf extract on postembryonic development of blowfly *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) (Calliphoridae). *Rev Bras Farmacogn* 2014, 24: 304-308.

- Carvalho LML, Thyssen PJ, Goff ML, Linhares AX. Observations on the succession patterns of necrophagous Insects on a pig carcass in an urban area of southeastern Brazil. *Agg Int J Forens Med Toxicol* 2004. 33-39.
- Carvalho LML, Thyssen PJ, Linhares AX, Palhares FAB. A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000. 95: 135-138.
- Catts EP, Goff ML. Forensic entomology in criminal investigations. *Ann Rev Entomol* 1992. 37: 253-272.
- Cerretti P, Stireman JO, Pape T, O'Hara JE, Marinho MAT, Rognes K, et al. First fossil of an oestroid fly (Diptera: Calyptratae: Oestroidea) and the dating of oestroid divergences. *PLoS ONE*. 2017. 12(8).
- Chaudhury MF, Alvarez LA, Velazquez LL. A new meatless diet for adult screwworm (Diptera: Calliphoridae). *J Econ Entomol* 2000. 93: 1398-1401.
- Ciccio JF, Ballesteros CM. Constituyentes volátiles de las hojas y espigas de *Piper aduncum* (Piperaceae) de Costa Rica. *Rev Biol Trop* 1997. 45(2): 783-790.
- Cordeiro KBB. Morfologia e desenvolvimento de imaturos de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e de *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). Tese (Mestrado em Biologia animal) UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA. 2014.
- Costa ELN, Silva RFP, Fiuza LM. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. *Acta Biol Leopold* 2004. 26(2): 173-185.
- Courtney GW, Merritt RW. Aquatic Diptera. Part one. Larvae of aquatic Diptera, pp. 687-722. In: *An Introduction to the Aquatic Insects of North America* (4a ed). Kendall/Hunt Publishing Co. Dubuque Iowa 2008. 1158p.
- Cunha SLC, Milward-de-Azevedo EM. Ensaio preliminar de um método de separação de ovo de *Cochliomyia macellaria* (Fabr.) (Diptera-Calliphoridae). *Arq Biol Tecnol* 1994. 37(2): 403-405.
- d'Almeida JM, Fraga MB, FERRO CL. Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae), em dietas artificiais. *Entomol Vect* 2000. 7: 155-162.
- Da-Silva-Xavier A. Desenvolvimento pós-embrionário, microscopia eletrônica de varredura e sequências de DNA de dípteros muscoides da família Sarcophagidae de importância médica-veterinária e forense. Tese (Doutorado em biologia parasitária) FIOCRUZ, Rio de Janeiro 2016.
- Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO. Natural products in crop protection. *Bioorg Med Chem V* 2009. 17: 4022-4034.

Deguerry F, Pastore L, Wu S, Clark A, Chappell J, Schalk M. The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. Arch Biochem Biophys 2006. 454(2): 123-136.

Delgado W, Pachon ME, Celis A, Mendoza C, Cardona JO, Bustamante M, Daza M, Cuca LE. Informe tecnico de avance proyecto “Bioprospeccion participativa de comunidades vegetales asociados a la familia Piperaceae. In: É Veneno ou é Remédio: agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Fiocruz 2003. 157-175.

Delgado W, Pachón ME, Celis A, Mendoza C, Cardona JO, Bustamante M, Daza M, Cuca LE. Informe técnico de avance proyecto “Bioprospección participativa de comunidades vegetales asociados a la familia Piperaceae en la región del Sumapaz medio bajo occidental”. Colciencias-Universidad Nacional de Colombia-Universidad de Cundinamarca, 2007.

Dignani DF. *Peperomia blanda* (Piperaceae): avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista 2009.

Dutok CMS. Segurança e eficácia de extratos obtidos de *Pouteria mammosa* (L.) *cronquist* para o controle de dípteros muscoides. Dissertação (doutorado em Biodiversidade e Saúde) Fundação Oswaldo Cruz 2015.

El-Shazly MM, Nassar MI, El-Sherief HA. Toxic effect of ethanolic extract of *Nerium oleander* (Apocynaceae) leaves against different developmental stages of *Muscina stabulans* (Diptera: Muscidae). J Egypt Soc Parasitol 1996. 26: 461-473.

Engel MS. Insect Evolution. Current Biology 2015. 25(5): 19p.

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): 927-932.

Family Xylophagidae. BugGuide. Disponível em: <<http://bugguide.net/node/view/7180>>
Acesso em: 10 de agosto de 2017.

Faria MVC. Avaliação de ambientes e produtos contaminados por agrotóxicos. In: Peres F, Moreira JC., orgs. É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ 2003. 157-175.

Ferraz ACP, Bosisio DD, Aguiar-Coelho VM. Dieta para larvas de *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). EntomoBrasilis 2011. 4(3): 125-129.

Ferreira MJM, Santos BB, Cunha HF. Flutuação populacional de espécies de *Chrysomya* Robineau-Desvoidy (Diptera, Calliphoridae) em pomar de Goiânia, Goiás, Brasil. Rev Bras Entomol 1979. 23(4): 245-255.

Ferreira RG. Ação antimicrobiana do óleo essencial de *Piper aduncum* e dilapiol em infecções de pele. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica). UFFa. Pará 2015.

Finkler CLL. Controle De Insetos: Uma breve revisão. An Acad Pernamb Ciênc Agro 2013. 8: 169-189.

Fonseca FP, Sabino-Bezerra JR, Vargas PA, Almeida OP, Lopes MA, Santos-Silva AR. Furuncular Myiasis Affecting the Lower Lip of a Young Patient. Braz Dent J 2016. 27(5): 625-628.

Freitas FA, Zanuncio TV, Lacerda MC, Zanuncio JC. Fauna de Coleoptera coletada com armadilhas luminosas em plantio de *Eucalyptus grandis* em Santa Bárbara, Minas Gerais. Rev Árv 2002. 26: 505-511.

Furlanetto SMP, Campos MLC, Hársi CM, Buralli GM, Ishihata GK. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. Rev Microbiol 1984. 15: 170-174.

Furusawa GP, Cassino PCR. Ocorrência e Distribuição de Calliphoridae (Diptera, Oestroidea) em um Fragmento de Mata Atlântica Secundária no Município de Engenheiro Paulo de Frontin, Médio Paraíba, RJ. Rev Biol Ciênc Terra 2006. 6: 152.

Gabre RM, Adham FK, Chi H. Life table of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). Act Oecol 2005. 27: 179-183.

Gomes A. Carrapato-de-boi: Prejuízos e controle. Campo Grande, MS: Embrapa. Gado de Corte 2000, Série 42.

Gomes AF, Santos GT, Câmara DCP. Clima e epidemias de dengue no Estado do Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop 2009. 42(2): 137-140.

Gomes FC, Rodrigues JMG, Vieira MF, Pinheiro CCS. Efeito tóxico do extrato vegetal de *Piper marginatum* e *P. Purusanum*, em larvas de moscas das frutas. XVIII Jornada de Iniciação Científica PIBIC CNPq/FAPEAM/INPA 2009.

González-Coloma A, Escoubas P, Mizutani J, Lajide L. Insect growth inhibitors from *Machilus japonica*. Phytoch 1994. 35: 607-610.

Greenberg B, Szyska ML. Immature stages and biology of fifteen species of Peruvian Calliphoridae (Diptera). Ann Entomol Soc Am 1984. 77: 488-517.

Greenberg B. Flies and Disease, Vol. I: Ecology, classification and biotic association. Princeton Univ, Press, Princeton, NJ 1971. 856p.

Greenberg B. Flies and Disease, Vol. II: Biology and disease transmission. Princeton Univ, Press, Princeton, NJ 1973. 447p.

- Greenberg B. Flies as forensic indicators. *J Med Entomol* 1991. 28(5): 565-577.
- Grimaldi D, Engel, MS. Evolution of the Insects. Cambridge University Press. 2005.
- Grimaldi D, Engel MS. Evolution of the insects. Cambridge University Press 2005.
- Guimarães EF, Giordano LCS. Piperaceae do nordeste brasileiro I: Estado do Ceará. *Rodrig* 2004. 55: 21-46.
- Guimarães EF, Ichaso CL, Costa CG. Piperaceae. 1. Ottonia, 2. Sarcorhachis, 3. Pothomorpha. In: R. Reitz (ed.). *Flora Ilustrada Catarinense*, Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 1978.
- Guimarães EF, Valente MC. Piperaceae - *Piper*. In: R. Reitz (ed.). *Flora Ilustrada Catarinense*, Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 2001.
- Guimarães JH, Prado AP, Linhares AX. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Rev Bras Entomol* 1978. 22(1): 53-60.
- Guimarães JH, Prado AP, Buralli GM. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Rev Bras Entomol* 1979. 23(4): 245-255.
- Gullan PJ, Cranston PS. Os Insetos: Um resumo de entomologia. Editora ROCA. 3ª edição, São Paulo, 2008.
- Halfpeter G, Moreno CE, Pineda EO. Manual para evaluación de la biodiversidad em Reservas de la Biosfera. Zaragoza: Bol SEA 2001. 2: 80.
- Halloran A, Vantomme P. Edible insects: future prospects for food and feed security. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, FAO Viale delle Terme di Caracalla. Roma, Italia. FAO, 2015.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Effects of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Essential Oil and the Major Monoterpene Component Terpinen-4-ol on the Development of Single- and Multistep Antibiotic Resistance and Antimicrobial Susceptibility Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Americ Soc Micro* 2012. 56(2): 909–915.
- Harmatha J, Dinan L. Biological activities of lignans and stilbenoids associated with plant-insect chemical interactions. *Phytochem Rev* 2003. 2: 321-330.
- Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm Res* 2000. 49(11): 619-626.

Hernández JV, Jaffé K. Dano econômico causado por populações de formigas *Atta laevigata* (F. Smith) em plantações de *Pinus caribaea* Mor. E elementos para o manejo da praga. An Soc Entomol Brasil 1995. 24(2).

Imbira AS, Izutani DT, Milhoreto IT. Introdução de *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na Região Neotropical (Diptera, Calliphoridae). Arquiv Biol Tecnol 1977. 20: 35-39.

Instituto Nacional De Metereologia (Inmet)/ Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=tempo Acesso em: 22 dez. 2017.

Irish S, Lindsay T, Wyatt N. Key to Adults of Afrotropical Species of the Genus *Chrysomya* Robineau Desvoidy (Diptera: Calliphoridae). Af Entomol 2014. 22(2): 297-306.

Irvine FR. Woody Plants of Ghana with Special Reference to Their Uses. Oxford University Press, London 1961. 143-144.

Ivbijaro MS, Bolaji OO. Effects of cypermethrin plus dimethoate and extracts of *P. guineense* and *Azadirachta indica* on the pests and yields of Cowpea, *Vigna Unguiculata*. J Agricul Sci 1990. 115(4): 227-231.

James MT. The flies that cause myiasis in man. Washington: U.S. Dept. of Agriculture 1947. 163: 164-172.

Jansen DH. Quando há coevolução? Evolut 1980. 34(3): 611-612.

Jensen S, Hansen J, Boll PM. Lignans and neolignans from piperaceae. Phytochem 1993. 33: 523-530.

Jolivet P. Insects and plants, parallel evolution and adaptations. 2 ed. Florida, Sandhill Crane 1992 192p.

Júnior EB, Júnior CB, Ribeiro RC, Oliveira VH, Limas MED, Moya-Borjas GA. Efeito inseticida de amidas naturais de *Piper* e do derivado sintético Tetraidropiperina sobre *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) e *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). Rev. Bras. Parasitol. 2007. 16(2): 87-91.

Kamal AS. Comparative study of thirteen species of sarcosaprophagous Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) I. Bionomics. Ann Entomol Soc Am 1958. 51: 261-270.

Kapadia VH, Nagasampagi BA, Naik VG, Dev S. Structure of mustakone and copaene. Tetrahed Lett 1963. 28(28).

Kappagoda S, Ioannidis JPA. Prevention and control of neglected tropical diseases: overview of randomized trials, systematic reviews and meta-analyses. Bull. World Health Organ 2014. 92(5).

Karl-Georg F, Franz-Josef H, Johannes P, Wilhelm P, Dietmar S, Kurt B, Dorothea G, Horst S. Flavors and Fragrances In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.

Kim SI, Roh JY, Kim DH, Lee HS, Ahn YJ. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. J Stored Prod Res 2003. 39: 293-303.

Kishore N, Mishra BB, Tiware VK, Tripathi V. An account of phytochemicals from *Plumbago zeylanica* (Family: Plumbaginaceae): A natural gift to human being. Chron Youn Scien 2012. 3(3): 178-198.

Lago JHG, Ramos CS, Casanova D, Morandim AA, Bergamo DC, Cavalheiro A, Bolzani V, Furlan M, Guimarães E, Young M, Kato MJ. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. J Ethnopharmacol 2004. 94: 279-281.

Lawrence GHM. Taxonomia das plantas vasculares. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa 1951. 2: 854p.

Lee RE. Hibernation. In: *Encyclopedia of Insects* (eds. V. Resh and R. Carde) San Diego, Academic Press. 508-509.

Leyva M, Marquetti MC, Tacoronte JE, Scull R, Tiomno O, Mesa A, Montada D. Actividad larvívica de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Rev Biomed. 2009. 20: 5-13.

Li YQ, Zhang DX. Fly pollination of *Antidesma montanum* (Euphorbiaceae) in Hainan, China. Acta Phytotax Sin 2007. 45(2): 217-226.

Lima RK, Cardoso MG, Moraes JC, Abdrade MA, Melo BA, Rodrigues VG. Caracterização química e atividade insetívica do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. sobre a lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Biosci J Uberlândia 2010. 26(1): 1-5.

Lima RK, Cardoso MG, Moraes JC, Carvalho SM, Melo BA, Vieira SS. Composição química e toxicidade de óleos essenciais para o pulgão-verde *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852). Arq Inst Biol São Paulo 2014. 81(1): 22-29.

Lima VP, Serra AL. Análise morfológica comparada da venação das asas da ordem Diptera (Linnaeus, 1758 – Arthropoda, Insecta). ComScientiae Saúde 2008. 7 (4): 525-533

Linhares AX. Sinantropia de dípteros muscóides de Campinas. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - UNICAMP São Paulo 1979. 129p.

- Lomônaco C, Germanos E. Variações fenotípicas em *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) em resposta a competição larval por alimento. Neotrop Entomol 2001. 30(2): 223-231.
- Lopes MBP, Figueiredo MR, Bérenger ALR, Paiva CS, Arranz JCE, Queiroz MMC. Effect of an extract from *Plumbago scandens* L. (malacara) on *Chrysomya putoria* post-embryonic development. Revista Cubana de Plantas Medicinales 2014. 19(1): 433-442.
- Macedo LPM. Fundamentos Básicos de Entomologia: Aspectos Morfológicos dos Insetos. Disponível em: <http://agroecologiaifrn.files.wordpress.com/2010/04/nota-fundamentos-sobre-os-insetos.pdf>. Acesso em: 19 janeiro, 2013.
- Maia A, Direito ICN, Figueiró R. Controle biológico de simulídeos (Diptera: Simuliidae): panorama e perspectivas. Cadernos UniFOA 2014. 25: 89-104.
- Maia JGS, Zohghi MGB, Andrade EHA, Santos AS, Silva MHL, Luz AIR, Bastos CN. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. Flav Frag J 1998. 13: 269-272.
- Mariconi FAM, Guimarães JH, Berti FE. A mosca doméstica e algumas outras moscas nocivas. Piracicaba: FEALQ 1999. 135p.
- Mariluis JC. Notas sobre moscas metalizadas, su importancia sanitaria y ecología (Diptera: Calliphoridae). Rev Soc Entomol 1999. 58: 289-294.
- Martins MB. Guilds of Drosophilids on Forest Fragments. In: R.O. Bierregaard; C. Gascon; T.E. Lovejoy. (Org.). Lessons from Amazonia. The ecology and conservation of a fragmented forest. Yale University, 2001.
- Matsui K, Munskata K. The structure of piperenone, a new insect antifeedant substance from *Piper futokadzura*. Tetra Lett 1975. 15(10): 1905-1908.
- Mcalpine JF, Wood DM. Manual of Nearctic Diptera, Vol. 3. Ottawa, Research Branch, Agriculture Canada, 1989.
- Medeiros ES, Guimarães EF. Piperaceae do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. Bol Bot Univ São Paulo 2007. 25: 227-252.
- Medina N. Uso de extractos botánicos en control de plagas y enfermedades. Avances en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos. M I P (Costa Rica) 2001. 59: 76-77.
- Mee KC, Sulaiman S, Othman S. Efficacy of *Piper aduncum* Extract against the adult housefly (*Musca domestica*). J Trop Med Parasitol. 2009, 32: 52-7.
- Meigen JW. Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten. Schulzische Buchhandlung, Hamm. 1830. 6(24).

- Mello RP, d'Almeida JM, Oliveira SMP. Relações tróficas entre dípteros caliptrados (Calliphoridae, Faniidae, Muscidae e Sarcophagidae) criados em diferentes substratos, no Rio de Janeiro, Brasil. *Entomol Vect* 1997. 4(4): 111-121.
- Mello RS, Ferreira ARS, Queiroz MMC. Bioactivity of latex from *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (Euphorbiaceae) on post-embryonic development of *Megaselia scalaris* (Phoridae). *Vet Parasitol* 2010. 172: 100–104.
- Mendonça PM, Lima MG, Albuquerque LRM, Carvalho MG, Queiroz MMC. Effects of latex from “Amapazeiro” *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) on blowfly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) post-embryonic development. *Vet Parasitol* 2011. 178: 379–382.
- Menezes ELA. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiol 2005. 58p.
- Michelsen V, Pape T. Ulurumyiidae – a new family of calyptrate flies (Diptera). *Syst Entomol* 2017. 42: 826–836.
- Milward-de-Azevedo EMV, Carraro MV, Martins C, Moreira OI, Cruz M, Serafin I. Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) em diferentes temperaturas, sob condições experimentais. *Arquiv Biol Tec* 1996. 39(4): 793-798.
- Minkenbergh OPJM, Helderman CAJ. Effect of temperature on the life history of *Liriomyza bryoniae* (Diptera: Agromyzidae) on tomato. *J Econ Entomol* 1990. 83: 117-125.
- Miranda JE. et al. Potencial inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Piperaceae) sobre *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). *Res Bras Oleag Fib* 2002. 6(2): 557-563.
- Miyakado M, Nakayama I, Ono L. Insecticidal unsaturated isobutylamides: From natural products to agrochemical leads. In: Arnason JT, Philogène BJR, Morand PJ. *Insecticides of plant origin*. Amer Chem Soc 1989. 418p.
- Miyazawa M, Hirota K, Fukuyama M, Ishikawa Y, Kameoka H. Insecticidal lignans against *Drosophila melanogaster* from fruits of *Schisandra chinensis*. *Nat Prod Lett* 1998. 12: 175-180.
- Mullally M, Cayer C, Muhammad A, Walshe-Roussel B, Ahmed F, Sanchez-Vindas PE, Otarola-Rojas M, Meralli Z, Cal V Durst T, Trudeau VL, Arnason JT. Anxiolytic activity and active principles of *Piper amalago* (Piperaceae), a medicinal plant used by the Q'eqchi' Maya to treat susto, a culture-bound illness. *J Ethnopharmacol* 2016. 5(185): 147-154.

- Nascimento WM, Gomes EML, Batista EA, Freitas RA. Utilização de agentes polinizadores na produção de sementes de cenoura e pimenta doce em cultivo protegido. Hort Bras 2012. 30: 494-498.
- Navickiene HMD, Alécio AC, Kato MJ, Bolzani VS, Young MCM; Cavalheiro AJ, Furlan M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. Phytoch 2000. 55: 621-626.
- Nigam SS, Purohit RM. Chemical examination of the essential oil of the leaves of *Piper betle*. Riechstoffs Aromen 1962. 12: 185-190.
- O'Flynn MA. The succession and rate of development of blowflies in carrion in southern Queensland and application of these data to forensic entomology. J Australian Entomol Soc 1983. 22: 137-148.
- Oliveira JCS, Neves IA, Schwartz MOE, Silva LLD, Câmara CAG. Composição química do óleo essencial de *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química 2006.
- Oliveira JD, Alves CCF, Miranda MLD, Martins CHG; Silva TS, Ambrosio MALV, Alves JM, Silva JP. Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. Rev Bras Pl Med 2016. 18(2): 502-510.
- Oliveira MS, Mello RP, Queiroz MMC. Morfologia e duração dos ínstares larvais de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em laboratório. Rev Bras Entomol 2007. 51(2): 239-245.
- Oliveira RL. Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de *Piper hispidum*. Dissertação (mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) UEA, Amazonas 2010.
- Olsen CE, Tyagi OD, Boll PM, Hussaini FA, Parmar VS, Sharma N, Taneja P, Jain SC. An aristolactam from *Piper acutisleginum* and revision of the structures of piperolactam B and D. Phytoch 1993. 33: 518-520.
- Ormeño E, Baldy V, Ballini C, Fernandez C. Production and diversity of volatile terpenes from plants on calcareous and siliceous soils: effect of soil nutrients. J Chem Ecol 2008. 34(9): 1219–1229.
- Paiva DP. Periódico técnico-informativo elaborado pela EMBRAPA–CNPSA Controle integrado de moscas em criações de suínos. Ano II, n. 12, 1994.
- Pape T, Blagoderov V, Mikhail BM. Order DIPTERA Linnaeus, 1758. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. Zootaxa 2011. 3148: 1–237.

Parmar VS, Jain S, Bisht KS, Taneja RP, Jha A, Tyagi O, Prasad AK, Wengel J, Olsen CE, Boll PM. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochem* 1997. 46(4): 597-673.

Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, Tyagi OD, Prasad AK, Wengel J, Olsen CE, Boll PM. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytoch* 1997. 47: 597-673.

Parra JRP. *Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico*. 6ª edição. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, p. 134, 2001.

Penteado SRC, Barbosa LR, Iede ET, Reus FW, Strapasson P, Linzmeier AM, Thomazini MJ. Reconhecimento e Identificação das principais famílias de insetos de importância quarentenária associados a materiais de propagação e/ou madeira. Colombo: Embrapa Florestas, 2009.

Penteado SRC, Trentini RF, Iede ET, Filho WR. Ocorrência, distribuição, danos e controle de pulgões do gênero *Cinara* em *Pinus* spp. no Brasil. *Rer Flor* 2000. 30: 55-64.

Pinho CM. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. VI. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926.

Pinho LC. Diptera. In: Guia *on-line*: Identificação de larvas de Insetos Aquáticos do Estado de São Paulo. Froehlich, C.G. (org.). 2008. Disponível em: <http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/guiaonline>

Pinto ZT, Fernández-Sánchez F, Santos AR, Amaral ACF, Ferreira JLP, Escalona-Arranz JC, Queiroz MMC. Effect of *Cymbopogon citrates* (Poaceae) oil and citral on post-embryonic time of blowflies. *J Entomol Nemat* 2015. 7(6): 54-64.

Pinto ZT, Fernández-Sánchez F, Santos AR, Amaral ACF, Ferreira JLP, Escalona-Arranz JC, Queiroz MMC. Pinto ZT, Fernández-Sánchez F, Santos AR, Amaral ACF, Ferreira JLP, Escalona-Arranz JC, Queiroz MMC. *Braz. J. Vet. Parasitol. Jaboticabal* 2015. 24(1): 36-44.

Pitchon R, dos Reis AP, Silva GCG, Zogheib JB, dos Reis DP. Hymenoptera venom allergy: outpatient aspects and urgency. *Rev Med Minas Gerais* 2014. 24(2): S6-S12.

Pletsch M, Santana AEG. Secondary compound accumulation in plants: the application of plant biotechnology to plant improvement. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CHEMISTRY OF THE AMAZON, 2, 1995. Manaus. Anais. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia 1995. 5: 51-64.

Puccioni-Sohler M, Roveroni N, Ferry CRF, Peralta JM, Tanuri A. Infecção por dengue no sistema nervoso: lições para Zika e Chikungunya. *Arq Neuro-Psiquiatr* 2017. 75(2).

Pujol-Luz JR, Arantes LC, Constantino R. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). *Rev Bras Entomol* 2008. 52(4): 485-492.

Queiroz MMC, Milward-de-Azevedo WMV. Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório. Rev Bras Zool 1991. 8: 75-84.

Rafael JA, Melo GAR, Carvalho CJB, Casari AS, Constantino R. Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. São Paulo, Holos, 2012.

Rand-Luby L, Pommier RF, Williams ST. et al. Improved outcome of surgical flaps treated with topical dimethylsulfoxide. Ann Surg 1996. 224(4): 583-590.

Regnault-Roger C. The potential of botanical essential oils for insects pest control. Integrat Pest Manag Ver 1997. 2: 25-34.

Resh, VH, Cardé RT. Encyclopedia of Insects, 1 ed. Academic Press, San Diego. 2003. 1266 p.

Revilla J. Plantas da Amazônia: Oportunidades econômicas e sustentáveis. Manaus: SEBRAE / INPA, 2000.

Rey L. Parasitologia. Ed. 3 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

Ricklefs RE. A economia da natureza: um livro-texto em ecologia básica. Tradução de Cecília Bueno, Pedro P. de Lima e Silva. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

Robertson JL, Preisler HK. Pesticide bioassays with arthropods. CRC Press, London. 1992.

Rocha JSY. José Lima Pedreira de Freitas e o redimensionamento e controle da doença de Chagas. Ciênc saúde coletiva 2016. 21(8).

Rodrigues WC. Fatores que Influenciam no Desenvolvimento dos Insetos. Entomol Bras 2004. 1(4): 01-04.

Roper C, Pignatelli P, Partridge L. Evolutionary responses of *Drosophila melanogaster* life history to differences in larval density. J Evol Biol 1996. 9(5): 609-622.

Rose RJ, Hodgson DR. Manual of equine practice. Philadelphia: Saunders. P. 532, 1993.

Rosenbaum EE, Herschler RJ, Jacob SW. Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders. J Am Med Assoc 1965. 192: 309-313.

Rozkosny R, Kovak D. First description of the male and the larva of *Camptopteromyia fracticipes* from Malaysia (Diptera: Stratiomyidae). Entomol Seand 1991. 22(3): 297-304.

Salunke BK, Kotkar HM, Mendki PS, Upasani SM, Maheshwari VL. Efficacy of flavonoids in controlling *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae), a postharvest pest of grain legumes. Crop Protection 2005. 24: 888-893.

Santos AMM. Gerenciamento ambiental para o controle de *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) em assentamentos urbanos. 2006. 197 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. 2006. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000393238>> Acesso em: 16/11/2015.

Santos CMD. Biogeografia cladística aplicada à evolução biogeográfica dos Tabanomorpha (Diptera, Brachycera). Tese de doutorado. 2008.

Santos MJP, Borja GEM. Estudo comparativo do Desenvolvimento Pós-embrionário de *Fannia pusio* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Fanniidae) em Diferentes Substratos. Arq Biol Tecnol 1997. 40: 253–261.

Santos MRA, Silva AG, Lima RA, Lima DKS, Sallet LAP, Teixeira CA, Polli AR, Facundo VA. Atividade inseticida do extrato das folhas de *Piper hispidum* (Piperaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). Revista Brasil Bot 2010. 33(2): 319-324.

Santos MRA, Silva AG, Lima RA, Lima DKS, Sallet LAP, Teixeira CA, Facundo VA. Composição química e atividade inseticida do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). Campinas Rev Bras Pl Med 2013. 15(4): 757-762.

São Paulo (estado) Secretaria do Meio Ambiente/coordenadoria de educação ambiental. Fauna Urbana. Cadernos de Educação Ambiental, v. 1, n. 17. Hélia Maria Piedade. São Paulo: SMA/CEA, p. 216, 2013.

Siani AC, Sampaio ALF, Sousa MG, Henriques MGMO, Ramos MFS. Óleos essenciais. Biote Ciênc Desenvol 2000. 16: 38-43.

Silva AB, Batista TFC, El-husny JC. Insetos nocivos à soja no município de Paragominas, PA. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. Embrapa Amaz. Orient. Bolet. Pes. Desenv. P. 16, 2001.

Silva MM. Tese Mestrado Diversidade de insetos em diferentes ambientes florestais no município de Cotriguaçu. Cuiabá – MT 2009.

Silva SLC, Carvalho MG, Gualberto AS, Carneiro-Torres DS, Vasconcelos KCF, Oliveira NF. Bioatividade do extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* mull. arg. (euphorbiaceae) sobre *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). Acta Vet Brasi 2010. 4(4): 252-258.

Silveira LCP, Vendramim JD, Rosseto CJ. Efeito de Genótipos de Milho no Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Soc. Entomol. Brasil. V. 26, n. 2, p. 291-298, 1997.

Simões CMO. et al. (org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 1999.

Sojka EJ, Hope W, Parson D. Dimethyl Sulfoxide update - new applications and dosing methods. Proceed. Am. Assoc. Equine Practit 1990 (36): 683-690.

Stoka AM. Ecdysteroids, juvenile hormones and metamorphosis in triatominae. Chagas Diseases Vect 1987. 2: 71-9.

Sukontason K, Piangjai S, Siriwattananurongsee S, Sukontason KL. Morphology and developmental rate of blowflies *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* in Thailand: application in forensic entomology. Parasitol Res 2008. 102: 1207 – 1216.

Svacha P. What are and what are not imaginal discs: reevaluation of some basic concepts (Insecta, Holometabola). Develop Biol 1992. 154: 101–117.

Tebbs MC. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World 1. Review of characters and taxonomy of *Piper* section *Macrostachys*. Bull Br Mus Bot 1989. 19: 117-158.

Thevan K, Ahmad AH, Rawi CSM, Singh B. Growth of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) Maggots in a Morgue Cooler. J Forens Sci 2010. 55(6): 1656-1658.

Thomanzini MJ, Thomanzini APBW. Levantamento de insetos e análise entomofaunística em floresta, capoeira, e pastagem do Sudeste Acreano. Rio Branco: Embrapa Acre. Bolet. Pesq. Desenv. P. 41, 2002.

Trautwein MD, Wiegmann BM, Beutel R, Kjer KM, Yeates DK. Advances in Insect Phylogeny at the Dawn of the Postgenomic Era. Annu Rev Entomol 2012. 57: 449–68.

Ullyett GC. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. Philosop Trans Roy Societ London 1950. 234: 77-174.

Viegas C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. Quim Nova 2003. 26(3): 390-400.

Vinson SB, Iwantscha GF. Host suitability for insect parasitoids. Ann Ver Entomol 1980. 25: 397–419.

Von-Zuben APB, Donalísio MR. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2016. 32(6).

Watanabe AS, Fonseca LAM, Galvão CES, Kalil J, Castro FFM. Imunoterapia específica com venenos de Hymenoptera: revisão sistemática Sao Paulo Med J V 2010. 128(1).

Wiegmann BM, Yeates DK, Thorne JL, Kishino H. Time flies, a new molecular time-scale for brachyceran fly evolution without a clock. Syst Biol. V. 52, p. 745-56, 2003.

- Wink C, Guedes JVC, Fagundes CK, Rovedder AP. Insetos edáficos como indicadores da qualidade ambiental. *Rev Ciên Agrovet Lag* 2005. 4(1): 60-71.
- Yang P, MA Y, Zheng S. Adulticidal activity of five essential oils against *Culex pipiens quinquefasciatus*. *J Pest Sci* 2005. 30: 84-89.
- Yang ST, Shiao SF. Oviposition preferences of two forensically important blow fly species, *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae), and implications for postmortem interval estimation. *J Med Entomol* 2012. 49(2): 424-435.
- Yeates DK, Wiegmann BM, Coutney GW, Meier R, Lambkin C, Pape T. Phylogeny and systematics of Diptera: Two decades of progress and prospects. *Zootaxa* 2007. 1668: 565–590.
- Yeates DK, Wiegmann BM. Congruence and controversy: toward a higher-level phylogeny of Diptera. *Ann R Entomology* 1999. 44: 397-428.
- Yeates DK, Wiegmann BM. Phylogeny and Evolution of Diptera: Recent insights and new perspectives. In: Yeates DK, Wiegmann BM (eds) *The evolutionary biology of flies*. Columbia University Press, New York. 2005, 14-44p.
- Yuncker TG. The Piperaceae – family profile. *Brittonia* 1958. 10: 1-7.
- Zara A, Santos SM, Fernandes-Oliveira ES, Carvalho RG, Coelho GE. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiol Serv Saude* 2016. 25(2): 391-404.
- Zorzenon FJ. Noções sobre as principais pragas urbanas. *Biol* 2002. 64(2): 231-234.
- Zumpt F. *Myiasis in man and animals in the Old World*. London, Butterworth, 1965.

8 ANEXO

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].**